

© Fondo de Cultura Económica

LA INGENIERÍA GENÉTICA Y LA NUEVA BIOTECNOLOGÍA

Autor: FRANCISCO XAVIER SOBERÓN MAINERO

- [COMITÉ DE SELECCIÓN](#)
- [EDICIONES](#)
- [DEDICATORIA](#)
- [PREFACIO](#)
- [I. EL SUPPLICIO DE TÁNTALO O LA HEBRA INACCESIBLE](#)
- [II. LAS LLAVES DE LA BIBLIOTECA DE LA VIDA: LA NUEVA HERRAMIENTA DE LA INGENIERÍA GENÉTICA](#)
- [III. AISLANDO GENES: CASOS DE LA VIDA REAL](#)
- [IV. LAS REVELACIONES DE LA MOLÉCULA MAESTRA](#)
- [V. ALTERANDO LOS PLANOS DE LA VIDA.](#)
- [VI. LA BIOLOGÍA ESTRUCTURAL Y EL ADN RECOMBINANTE: EN LA FORMA ESTÁ LA CLAVE](#)
- [EPÍLOGO](#)
- [BIBLIOGRAFÍA](#)
- [GLOSARIO](#)
- [ÍNDICE DE RECUADROS](#)
- [COLOFÓN](#)
- [CONTRAPORTADA](#)



COMITÉ DE SELECCIÓN

Dr. Antonio Alonso

Dr. Juan Ramón de la Fuente

Dr. Jorge Flores

Dr. Leopoldo García-Colín Sherer

Dr. Tomás Garza

Dr. Gonzalo Halffter

Dr. Guillermo Haro †

Dr. Jaime Martuscelli

Dr. Héctor Nava Jaimes

Dr. Manuel Peimbert

Dr. Juan José Rivaud

Dr. Emilio Rosenblueth †

Dr. José Sarukhán

Dr. Guillermo Soberón

Coordinadora Fundadora:

Física Alejandra Jaidar †

Coordinadora:

María del Carmen Farías



Primera edición, 1996

Primera reimpresión, 1997

Se prohíbe la reproducción total o parcial de esta obra —incluido el diseño tipográfico y de portada—, sea cual fuere el medio, electrónico o mecánico, sin el consentimiento por escrito del editor.

La Ciencia desde México es proyecto y propiedad del Fondo de Cultura Económica, al que pertenecen también sus derechos. Se publica con los auspicios de la Secretaría de Educación Pública y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

D. R. © 1996 FONDO DE CULTURA ECONÓMICA

Carretera Picacho-Ajusco 227, 14200 México, D.F.

ISBN 968-16-5094-8

Impreso en México

Inicio



DEDICATORIA

A mi esposa AMAPOLA, quien con intuición y generosidad me impulsó y apoyó para escribir este libro.

A mis hijos XAVIER y DANIEL , fuente constante de motivación.

A mis padres, a mis maestros y a mis colegas, porque ellos sembraron la semilla y fertilizaron mi inquietud de conocer.



PREFACIO

Actualmente estamos presenciando un increíble desarrollo de las ciencias biológicas experimentales, y como consecuencia, a partir de estos avances, se han generado grandes expectativas en materia tecnológica.

Periódicamente, todos tenemos la oportunidad de obtener información acerca de los descubrimientos realizados en las diversas áreas de la ciencia, y de las posibles implicaciones que pueden tener en nuestra forma de vida. Por medio de conversaciones con amigos, familiares y asistentes a conferencias en las que he participado, he percibido que hay un gran interés en el significado y alcances de la ingeniería genética y la biotecnología moderna. Aunque también he notado una gran desinformación, y mucha información distorsionada: se habla indistintamente de ingeniería genética, "biogenética", bebés de probeta, manipulación de la raza humana, etcétera.

El propósito de esta monografía es el de comunicar al público interesado en la ciencia la situación actual de la investigación relacionada con la biología experimental moderna, en particular, la derivada del efecto generalizado de la ingeniería genética.

La organización del material pretende describir sólo algunos de los elementos técnicos que han permitido ciertos descubrimientos. De hecho, ya existen publicaciones donde éstos se revisan. El propósito de esta obra es destacar las repercusiones de determinadas tecnologías o conocimientos clave, los de mayor importancia e interés, describiéndolos, según se requiera, para comprender los ejemplos de avances recientes, que se presentarán en el resto del libro.

Es mi sincero deseo que este volumen sirva a dos propósitos: por un lado, compartir con el público lego el entusiasmo y asombro que sentimos los que hemos tenido la suerte de trabajar en este campo, en este momento histórico; por el otro, contribuir a crear una base para que el lector pueda distinguir entre charlatanería y ciencia ficción de los asombrosos avances que son realmente posibles.

Creo que sólo con información puntual, verdadera y comprensible la sociedad puede tomar las decisiones adecuadas respecto a la ciencia que quiere pagar y las normas que deben establecerse en cuanto la nueva tecnología entra en contacto con sus vidas.

Si esta monografía logra conjuntar elementos de interés e información, habrá cumplido sus propósitos esenciales.



I. EL SUPPLICIO DE TÁNULO O LA HEBRA INACCESIBLE

El panorama antes del ADN recombinante

TODOS hemos escuchado hablar del término ingeniería genética. Los medios de información nos bombardean con descripciones de descubrimientos asombrosos, y en ocasiones, plantean escenarios de desastre, propiciados por una maligna intervención del hombre para alterar la naturaleza. En realidad, si lo meditamos con cuidado, el ser humano siempre ha interferido con los procesos naturales propios y de otras especies. ¿De dónde proviene, si no, la gran variedad de razas caninas, por ejemplo? ¿Y no era un serio intrometimiento con el proceso practicar repetidas sangrías al enfermo a la menor provocación? La administración de antibióticos para salvar innumerables vidas humanas, ¿no significa una definitiva interferencia con los procesos naturales? Lo que sí resulta claro es que la capacidad de manipulación, no siempre basada en el conocimiento, está aumentando continuamente. En particular, durante los últimos 15 a 20 años ha sido notable un avance sin precedente en el campo de las ciencias biológicas. Esto se debe fundamentalmente al surgimiento de las técnicas de **ingeniería genética o ADN**

recombinante.¹ 

Una característica importante de la ciencia biológica es que constituye una área de conocimiento relativamente nueva. ¿A qué se debe esto? ¿Cómo es, nos preguntamos, que en la era espacial y de las computadoras, no sabemos curar ni un catarro común? Parte de la respuesta estriba en la inmensa complejidad de cualquier sistema biológico. La célula más simple está constituida por cientos de miles de **moléculas** diferentes, que son entidades pequeñísimas, en continua transformación. Existe además un constante dinamismo en la composición del material viviente, mediado por interacciones moleculares de increíble sutileza, sujetas a una compleja y estricta regulación. Por esta razón, se requirieron instrumentos propios de la era tecnológica (por ejemplo, el microscopio), para empezar a atisbar en la estructura de estos sistemas. Se ha requerido del avance concertado de la física, la química, la ciencia de materiales, y del progreso económico para poder acceder a la tecnología necesaria para el estudio de los sistemas vivientes. Otro hecho destacado es que la investigación científica tiene la particularidad de ir acumulando preguntas que no es posible resolver con la tecnología del momento; pero en cuanto ésta progresa, se agolpan las soluciones de muchas preguntas y, rápidamente, surgen otras nuevas. Una de estas técnicas o metodologías, que establece un parteaguas en la capacidad de indagación sobre los seres vivos es, precisamente, la ingeniería genética.

Para entender cabalmente la importancia central de esta nueva metodología es útil revisar algunos conceptos básicos sobre las moléculas de la vida y lo que se conocía antes de que surgiera esa disciplina.

LAS MOLÉCULAS DE LA VIDA

A través de varios miles de millones de años de evolución, la diversidad biológica nos resulta apabullante y asombrosa. Cada organismo vivo, desde un ser humano hasta una pequeña planta, una bacteria o una mosca, parece ser una invención única y diferente. Si observamos con cuidado, sin embargo, detectamos muchos elementos en común. La clasificación de los seres vivos en reinos, órdenes, géneros, etc., obedece precisamente a esta clara noción de que los organismos vivos se parecen unos a otros. En el nivel molecular, los seres vivos se parecen increíblemente. Es de la combinación y concierto de interacciones de los mismos tipos de moléculas que un ser vivo difiere de otro. Esto es similar al caso de las computadoras (especialmente los programas que corren en ellas), que pueden diferenciarse notablemente unas de otras, a pesar de estar constituidas por circuitos o instrucciones muy similares.

Las moléculas de la vida surgieron hace quizá 3 o 4 mil millones de años. Sus características y sus interacciones fundamentales han sido alteradas muy poco en todo este tiempo. De manera similar al crecimiento y evolución de una ciudad, un ser vivo no se puede "reinventar" continuamente. La evolución ha ocurrido partiendo de lo que ya hay, con modificaciones paulatinas. En la Roma de hoy distinguimos calles que transitó Julio César; en nuestras células hay funciones moleculares afines surgidas hace 3 mil millones de años.

¿Cuáles son estas moléculas centrales, unificadoras? En lo que resta de este capítulo, me propongo describir algunas de ellas, pero antes debo hacer algunas aclaraciones al lector.

Para entender los fenómenos biológicos no se requiere, como en otras disciplinas (por ejemplo, la física o la química), el manejo de conceptos abstractos o el dominio de las matemáticas. Por otra parte, la complejidad de los sistemas biológicos sí necesita un vocabulario especial. Más aún, la amplitud y profundidad con la que comprenden hoy los biólogos la naturaleza es realmente impresionante. Confío en que las descripciones de naturaleza técnica, inevitables para hablar un lenguaje común y para que la presentación del material que nos ocupa no resulte trivial, sean accesibles al lector. Creo que la recompensa de cubrir los pasajes más rudos será una percepción más cabal de la belleza y relevancia de los recientes descubrimientos. Como dijera Albert Einstein: "Las cosas deben ponerse tan simples como sea posible. Pero no más simples."

Ácidos nucleicos

El fenómeno de la herencia es discernible por cualquier observador, pero su fundamento químico-biológico no fue siquiera sospechado hasta épocas relativamente recientes. Por ejemplo, los genes eran entidades abstractas en los trabajos pioneros del monje austríaco Gregorio Mendel.

La historia de los avances del conocimiento y los experimentos cruciales que dieron origen a la identificación del material genético es extremadamente interesante e ilustrativa. Aunque desde principios de siglo se estudiaban preparaciones biológicas con la idea de identificar sustancias responsables de sus notables cualidades, no fue sino hasta los años cuarenta que los investigadores estadounidenses Avery, McLeod y McCarty sugirieron, cautelosamente, que el material hereditario podría estar contenido en la sustancia llamada ácido nucleico. Durante los siguientes cinco años, trabajando con sistemas de separación y análisis relativamente primitivos, los investigadores del campo de la genética bioquímica demostraron, de manera inequívoca, que tal era el caso.

El escenario estaba listo para el desarrollo de una de las investigaciones más relevantes en la historia de la biología. El multicitado descubrimiento de la estructura tridimensional del ácido desoxirribonucleico (ADN), realizado por Watson y Crick, y cuya culminación fue en 1953, merece siempre una mención especial.

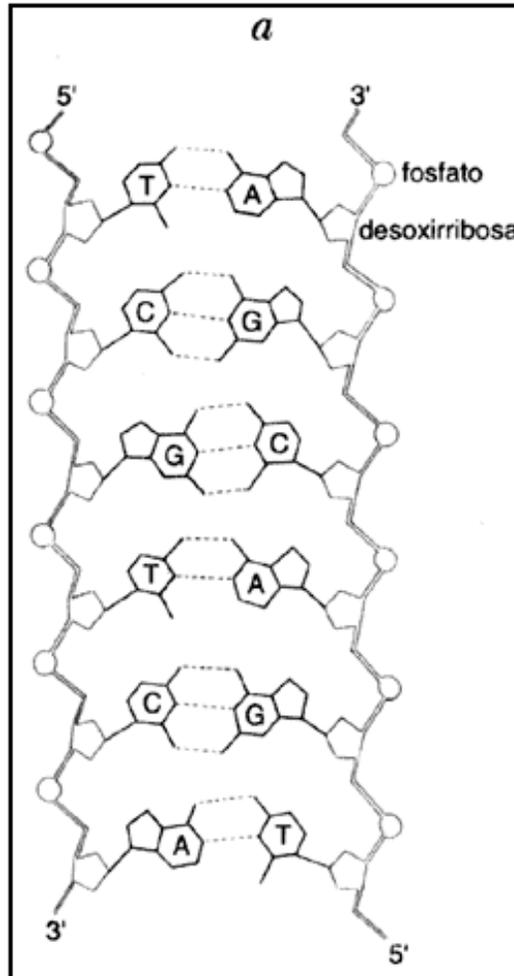
Este trabajo muestra varios conceptos que son piedra angular en la investigación biológica moderna. En primer lugar, los experimentos realizados se basaron en los adelantos de la física. Se utilizaron rayos X y conceptualizaciones teóricas para inferir, a partir de patrones de manchas, la estructura de la muestra de ADN analizada (véase en el capítulo VI una descripción más extensa sobre la técnica de cristalografía de rayos X). En segundo lugar, se hace notar la convicción de que, de la forma tridimensional de las moléculas biológicas se pueden obtener importantes ideas respecto a la función de las mismas. En tercer lugar, se destaca la confianza de que hay elementos y principios universalmente aplicables a todo ser vivo, cuando se hace el análisis a nivel molecular. En su investigación, Watson y Crick reunieron información sobre las propiedades de difracción de rayos X del material recientemente identificado como portador de la herencia. Al utilizar también datos generados por los químicos sobre la naturaleza básica de esta molécula, se dieron a la tarea de proponer un modelo que fuera consistente con estas observaciones. Los resultados de sus investigaciones fueron publicados en 1953 en la revista *Nature*, en una sola página. Es así como hoy día sabemos que los genes están constituidos por un polímero de entidades químicas, los nucleótidos arreglados en forma de escalera de caracol, bautizado con el nombre de *ácido desoxirribonucleico* (ADN).

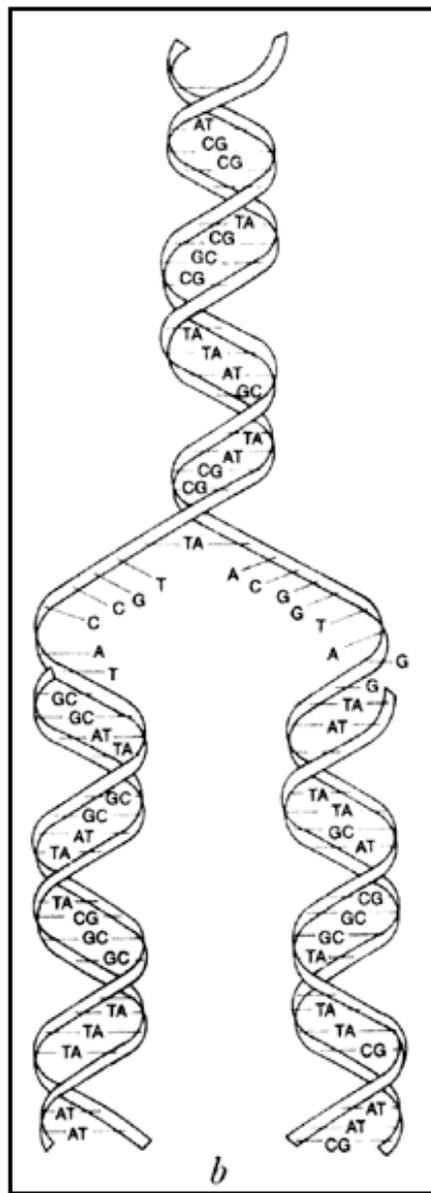
La estructura molecular de los ácidos nucleicos sugirió de inmediato algunas de sus notables propiedades (véase el recuadro I.1).

RECUADRO I.1. Estructura y Replicación del ADN

El ácido desoxirribonucleico o ADN, está formado por dos cadenas. Puede ser descrito como un polímero constituido por cuatro diferentes monómeros. El esqueleto es igual en todos los casos: un azúcar (desoxirribosa) y un fosfato. Del esqueleto se desprenden las bases, que pueden ser A (adenina), G (guanina), C (citosina) o T (timina). Cada una de las cadenas integra una molécula, porque esta unida por enlaces fuertes (o covalentes), mostrados por medio de líneas continuas como se muestra en la figura RI.1a. La disposición de las bases permite, además, que una cadena tenga afinidad por otra, siempre

y cuando ésta corra en el sentido opuesto y su secuencia de bases haga que se mantenga la complementariedad entre las bases (A frente a T y G frente a C). Esta afinidad se debe a la formación de enlaces débiles (no covalentes) llamados puentes de hidrógeno, que se muestran con líneas punteadas en la figura antes mencionada. Estos enlaces se pueden hacer y deshacer con relativa facilidad. Como puede apreciarse en la figura RI.1b, esto significa que la información codificada en la secuencia está duplicada: cada una de las hebras contiene toda la información. Así, cuando las cadenas se separan, cada una puede servir para regenerar la cadena opuesta. Este proceso se llama *replicación*, y explica de inmediato cómo la molécula de ADN es capaz de transmitir información de padres a hijos.



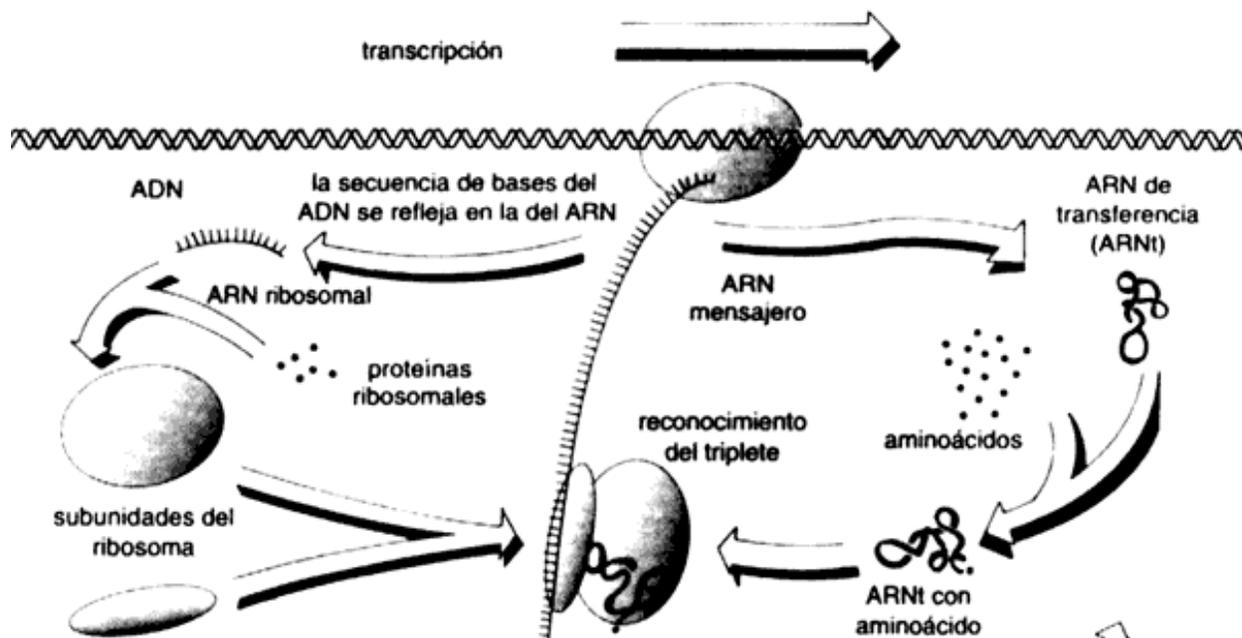


La complementariedad de las bases constituyentes de los ácidos nucleicos permite almacenar y transferir información. La duplicación de estas moléculas se basa precisamente en dicha propiedad. Si pensamos detenidamente en las características fundamentales de las moléculas de ADN, observamos otros aspectos muy interesantes: son moléculas químicamente monótonas, como inmensos rosarios con sólo cuatro tipos de cuentas. El cromosoma de la bacteria más simple tiene, por ejemplo, una longitud de alrededor de 600 mil pares de bases; los 23 distintos cromosomas de una célula humana contienen mucho más ADN: ¡están constituidos por aproximadamente 3 mil millones de pares de bases! Imaginemos que miramos un collar de un millón de cuentas de cuatro tipos desde cierta distancia, y que vemos otro, también de un millón de cuentas, arregladas en otro orden. ¿Cómo podríamos distinguir uno de otro? Sabemos que hay información muy valiosa en el orden de esas cuentas, pero, ¿cómo tener acceso a ella? Antes del surgimiento del ADN recombinante, la monotonía química del ADN constituyó un obstáculo casi infranqueable para el progreso del conocimiento en este campo.

A pesar de lo anterior; por medio de un gran número de experimentos, que no consistían en la purificación de moléculas de ADN específicas, ni su caracterización o análisis directo, se pudieron sentar las bases de su funcionamiento fundamental. Así pues, sustentándose en pruebas de muchos tipos, se estableció lo que se ha dado en llamar "dogma central de la **biología molecular**" (véase el recuadro 1.2).

RECUADRO I.2. La expresión de la información genética

La información contenida en la secuencia del ADN requiere convertirse en forma y función. El ADN constituye las instrucciones, es decir; los planos; son necesarios herramienta y materiales para ejecutar lo que dicen los planos. La maquinaria celular convierte la información del ADN en proteínas específicas, una proteína por cada gene. Así, un gene no es más que un segmento determinado dentro de alguna larga molécula de ADN (como una canción dentro de la cinta de un casete). La información fluye del ADN hacia la proteína, pasando por un intermediario, el **ARN (ácido ribonucleico)**, muy similar al ADN, y con las mismas propiedades de apareamiento que éste en el proceso llamado *transcripción*, en el cual se van agregando una por una las bases del ARN, copiando la secuencia del ADN. Posteriormente, se ensamblan las moléculas de proteína, haciendo corresponder un aminoácido por cada tres bases. Todo un conjunto de moléculas y **organelos** participa en este proceso de **traducción**. Hay una correspondencia inequívoca entre la secuencia del ADN y la de la proteína para la que codifica, dada por el **código genético**. Este código relaciona el idioma de cuatro letras de ADN, tomando grupos de tres en tres, con el idioma de las proteínas, constituido por 20 letras o monómeros.



El concepto de que la información fluye de ADN a otra molécula similar; el ARN, y de aquí hacia las proteínas, hace entrar en escena a los otros actores protagónicos del conjunto de las macromoléculas biológicas: las proteínas. La breve descripción del próximo inciso se refiere a ellas, pero antes de iniciarlo, describiremos otra propiedad fundamental de los ácidos nucleicos: su capacidad de **hibridación**. Las moléculas de ácidos nucleicos tienen la propiedad de reasociarse si son separadas y, en general, de encontrar y asociarse con otras moléculas cuya secuencia sea complementaria. Veamos con más cuidado este concepto.

La complementariedad que pueden tener dos hebras de ácido nucleico se puede ilustrar si imaginamos una hebra con la siguiente secuencia: 5' CAGTGAATTCAATCGAT 3' y otra con la secuencia 5' ATCGATTGAATTCAGT 3' (los números 5' y 3' marcan los extremos de las hebras que corren en sentido antiparalelo, como se ilustra en el recuadro I.1). Estas dos especies moleculares son complementarias, es decir; si las colocamos una frente a otra, en sentido antiparalelo (tal y como se encuentran en las moléculas de ADN naturales), tenemos:

5' CAGTGAATTCAATCGAT 3'

3'GTCACTTAAGTTAGCTA5'

y observamos que frente a C (abajo de la C, en la representación mostrada), hay siempre G y viceversa, y frente a A, hay siempre T, y viceversa.

Podemos hacer dos consideraciones importantes respecto al ejemplo anterior. ¿Qué ocurriría si colocamos estas dos moléculas en un mismo tubo de ensayo? ¿Qué tan probable es encontrar una secuencia de ADN igual (o complementaria) a otra, dependiendo de su tamaño?

Respecto a la primera consideración se puede predecir que, bajo ciertas condiciones, estas dos moléculas se unirían para formar una sola entidad: se aparearían o hibridarían. Por lo que toca a la segunda pregunta, podemos hacer un cálculo simple que nos indica que si tenemos cuatro símbolos, para un arreglo o "palabra" de longitud 18, existen 4^{18} combinaciones, es decir; unas 68 mil millones. Si se compara con el lenguaje escrito, observamos que, en efecto, las combinaciones de símbolos generan muy pronto secuencias únicas. No nos sorprendería que, por ejemplo, una frase tal como "en Xochimilco mañana" (a pesar de ser una frase corta, que tiene sentido y es correcta) no se encontrara en ninguno de los libros editados por el Fondo de Cultura Económica. Similarmente, en todo el **genoma** humano, la secuencia de ADN de nuestro ejemplo podría no encontrarse. O si se encontrara una vez, sería muy poco probable que hubiera una segunda. Esto quiere decir que la propiedad de hibridación confiere a los ácidos nucleicos una capacidad de reconocimiento molecular altamente específica.

Aunque la propiedad de hibridación, o encontrar su complemento, de los ácidos nucleicos fue conocida desde hace mucho tiempo, no fue sino hasta el surgimiento del ADN recombinante que se pudo utilizar como herramienta para detectar secuencias de ADN o ARN (es decir; para aislar y cuantificar genes; véanse los capítulos III y VI).

Proteínas

Si observamos el proceso de expresión del material genético (véase el recuadro I.2), observamos que, a partir de un código almacenado en moléculas químicamente monótonas (ADN), se obtienen entidades moleculares individuales, que resultan muy distintas unas de otras: las **proteínas**. Es notable que en este proceso hay una correspondencia directa, lineal, entre la secuencia de bases del ADN, y la secuencia de aminoácidos de una proteína (las reglas de correspondencia se conocen como **código genético** (véase el recuadro I.2). La diferencia entre estos dos polímeros biológicos estriba en que, en los ácidos nucleicos los constituyentes o monómeros son sólo cuatro, y sus propiedades fisicoquímicas son muy similares; en cambio, las proteínas están constituidas por 20 tipos distintos de monómeros, con propiedades fisicoquímicas muy distintas. La consecuencia de esta diferencia es que los ácidos nucleicos tienden a estructurarse en largas hebras, cuyas propiedades generales son muy parecidas, independientemente de la secuencia. Las proteínas, por su parte, son moléculas con gran personalidad fisicoquímica.

Al estar constituidas las proteínas por diferentes aminoácidos, su secuencia determina que la hebra de una de ellas se pliegue en el espacio de manera específica. Así, aunque los genes que contienen las instrucciones (o codifican) para dos proteínas distintas son estructuralmente muy parecidos entre sí, las dos proteínas pueden tener estructura, propiedades y funciones totalmente distintas. Las proteínas se pliegan, obedeciendo a gran número de interacciones, cada una de magnitud relativamente pequeña, para formar estructuras específicas, características de cuya forma depende su función en última instancia (véase el capítulo VI).

Las proteínas son, pues, la herramienta de los genes, el brazo ejecutivo de la maquinaria celular; todo lo que existe en la biosfera resulta, en consecuencia, del trabajo concertado y regulado de las proteínas, dirigidas e interactuando con los genes y con el entorno.

Estas máquinas moleculares son capaces de llevar a cabo las más diversas funciones. Mediante la generación de polímeros con diversas secuencias, la evolución biológica ha producido proteínas capaces de transportar otras moléculas (por ejemplo, oxígeno en la hemoglobina de la sangre); de constituirse en materiales resistentes, flexibles o contráctiles (pelo, tendones, músculos); de transmitir información y alterar procesos (hormonas como la insulina, toxinas como la causante del tétanos o venenos de serpientes, arañas y alacranes); de transformar otras moléculas al catalizar reacciones químicas (**enzimas**).

Las enzimas son proteínas que merecen mención especial. Dentro de una célula viva existen miles de sustancias diferentes, que potencialmente pueden sufrir transformaciones químicas muy diversas. De hecho, sólo algunas de estas reacciones podrían ocurrir en condiciones suaves y a temperatura ambiente. La célula, sin embargo, sufre una constante transformación. Esto se debe al trabajo de las enzimas. Su capacidad **catalítica** consiste en que, al interaccionar con sus "moléculas blanco", es decir; aquellas a las que van a modificar (llamadas **sustratos**), facilitan transformaciones químicas específicas, sin alterarse ellas mismas en el proceso: una enzima cataliza o induce una transformación particular en miles de moléculas de sustrato sobre las que actúa en forma sucesiva. Así, de la acción concertada de las enzimas resulta un proceso continuo de transformación química, que es el responsable de la aparición de forma, función y adaptación al medio.

Es claro, entonces, que en cualquier fenómeno biológico las interacciones llevadas a cabo por las proteínas desempeñan un papel preponderante. De hecho, con gran intuición, en 1838, el químico holandés Gerardus J. Mulder fue quien dio nombre a estas sustancias utilizando la raíz griega *protos*, que significa: primordial o "de la mayor importancia". Resulta paradójico que quizá la mayoría de las veces, al escuchar la palabra proteína, pensamos en un componente de nuestros alimentos, y olvidamos la complejidad y la gran riqueza de funciones e información que encierran estas moléculas biológicas.

Carbohidratos, lípidos, esteroides, vitaminas, alcaloides, antibióticos...

Ciertamente, cuando hablamos de moléculas biológicas nos referimos a muchos compuestos que no son proteínas ni ácidos nucleicos. Gruesos tomos de bioquímica atestiguan la existencia de los muchos miles de moléculas y reacciones químicas que se llevan a cabo en cualquier ser vivo. Está por demás decir que una descripción de todas estas moléculas y sus funciones está mucho más allá del propósito de este libro y de mis capacidades. Creo, sin embargo, que no es arbitrario dedicar más espacio a explicar las propiedades de genes y proteínas, y mencionar solamente que hay innumerables compuestos esenciales que, organizados, transformados y reclutados por las proteínas, dan lugar al fenómeno de la vida.

SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LAS BIOMOLÉCULAS

Es usual que mis amigos, muchos de los cuales no son especialistas en ciencia, me pregunten con incredulidad: "bueno, ¿y cómo se ve a los genes?", "¿cómo saben que en un tubo de ensayo hay proteínas?", "¿cómo separan estos materiales, unos de otros?"

Como ya se mencionó anteriormente, es precisamente el avance metodológico el que permite responder preguntas y el que después capacita a formular otras nuevas. En la historia del desarrollo científico se puede observar la asombrosa capacidad del ingenio humano para intuir fenómenos que no ha podido observar directamente, y emitir avanzadas hipótesis respecto al funcionamiento de la naturaleza. Al mismo tiempo, se puede observar que es sólo mediante el uso de métodos, a veces extremadamente complejos, y de una tesonera experimentación, que estas hipótesis se pueden finalmente validar o descartar.

De la descripción de algunos de estos métodos se puede inferir, quizá, una sensación de lo que es una parte importante del diario quehacer de un científico experimental. De esta misma descripción podemos también deducir la noción fundamental de la importancia del surgimiento de las técnicas de ADN recombinante.

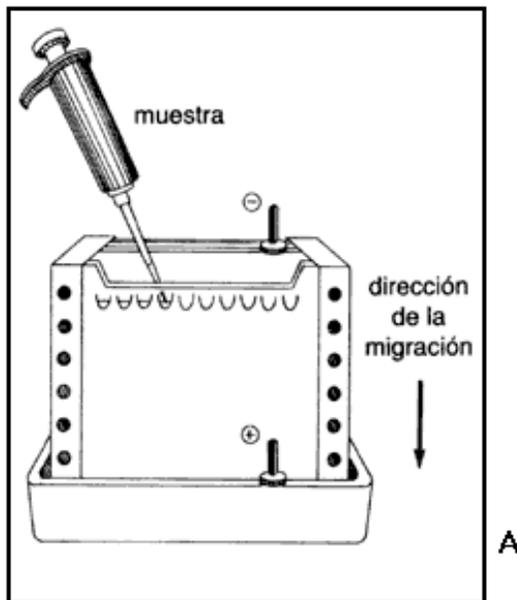
SEPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS

Imaginemos a los científicos alemanes Haus y Edward Buchner, quienes en 1897 investigaban las propiedades del proceso fermentativo, usando preparaciones derivadas de levaduras. A partir de un extracto de estos cultivos podían observar transformaciones sorprendentes, sin que hubiera ya células vivas. Se agregaba azúcar y, al cabo del tiempo, se notaba la aparición de alcohol. ¿Cómo podrían ellos identificar los componentes responsables de la reacción en la compleja muestra que tenían? En su época, los hermanos Buchner sólo contaban con pocas posibilidades, sin embargo, pudieron determinar que la reacción química que convertía el azúcar en alcohol dependía de dos "factores" presentes en el extracto. Uno de ellos se inactivaba al hervir la muestra, y otro, al **dializarla** (separar sus componentes por tamaño molecular de un lado u otro de una membrana). Conforme el fenómeno era estudiado, nuevas hipótesis se formulaban, y nuevos métodos se iban diseñando para contestar las preguntas formuladas. Tuvieron que pasar muchas décadas antes de que fuera claro lo que estaba ocurriendo, una vez que se acumularon conocimientos y nuevas metodologías. Estos experimentos iniciales, sin embargo, iban señalando el camino y pavimentándolo para el avance futuro.

Actualmente, en cambio, existen muy diversos y complejos métodos para separar y caracterizar biomoléculas. Los métodos modernos se basan en alguna propiedad molecular que, al interaccionar con el dispositivo experimental da origen a la separación. Ya mencionamos que el tamaño molecular se puede utilizar para realizar esta acción. En la actualidad disponemos de técnicas como la cromatografía de exclusión, la centrifugación y la electroforesis (véase el recuadro I.3) para la separación por tamaños. Afortunadamente, las proteínas son moléculas con tamaños muy variables y bien definidos. Una electroforesis del extracto de levadura mencionado revelaría un patrón de múltiples componentes, en el que se pueden ir identificando proteínas individuales.

RECUADRO I.3. Las técnicas de separación de las biomoléculas

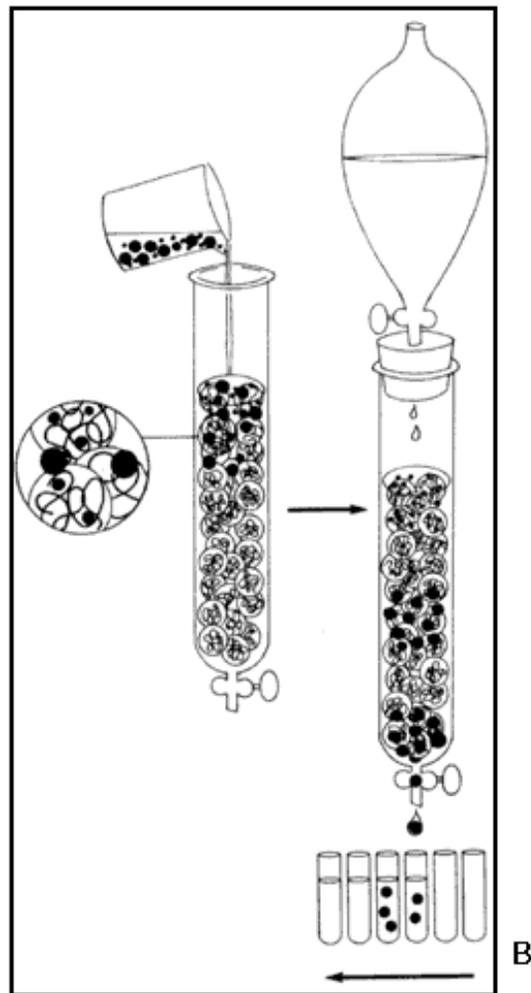
Hay diversas técnicas que se utilizan rutinariamente en el ADN recombinante. Una de las más frecuentes es la electroforesis (figura RI.3A). Esta técnica se aplica para el análisis de ADN y de proteínas y nos permite, en una de sus versiones, separar estas moléculas de acuerdo con su tamaño.



El principio de la técnica es muy simple: si sometemos una molécula con carga electrostática (afortunadamente tanto el ADN como las proteínas tienen esta característica) a la acción de un campo eléctrico, las moléculas tenderán a moverse: las de carga negativa hacia el electrodo positivo y las de carga positiva hacia el electrodo negativo. La velocidad a la que se mueven dependerá de la carga que tengan y del tamaño que sean. Además, se puede mejorar la separación poniendo obstáculos en su camino (un enrejado de moléculas filamentosas, por ejemplo). Aquí, las moléculas más pequeñas se podrán mover más ágiles y rápidamente que las grandes. Al detener el proceso de electroforesis se obtiene un patrón o acomodo de bandas, cuya distancia del punto de inicio de la corrida corresponda a su tamaño molecular.

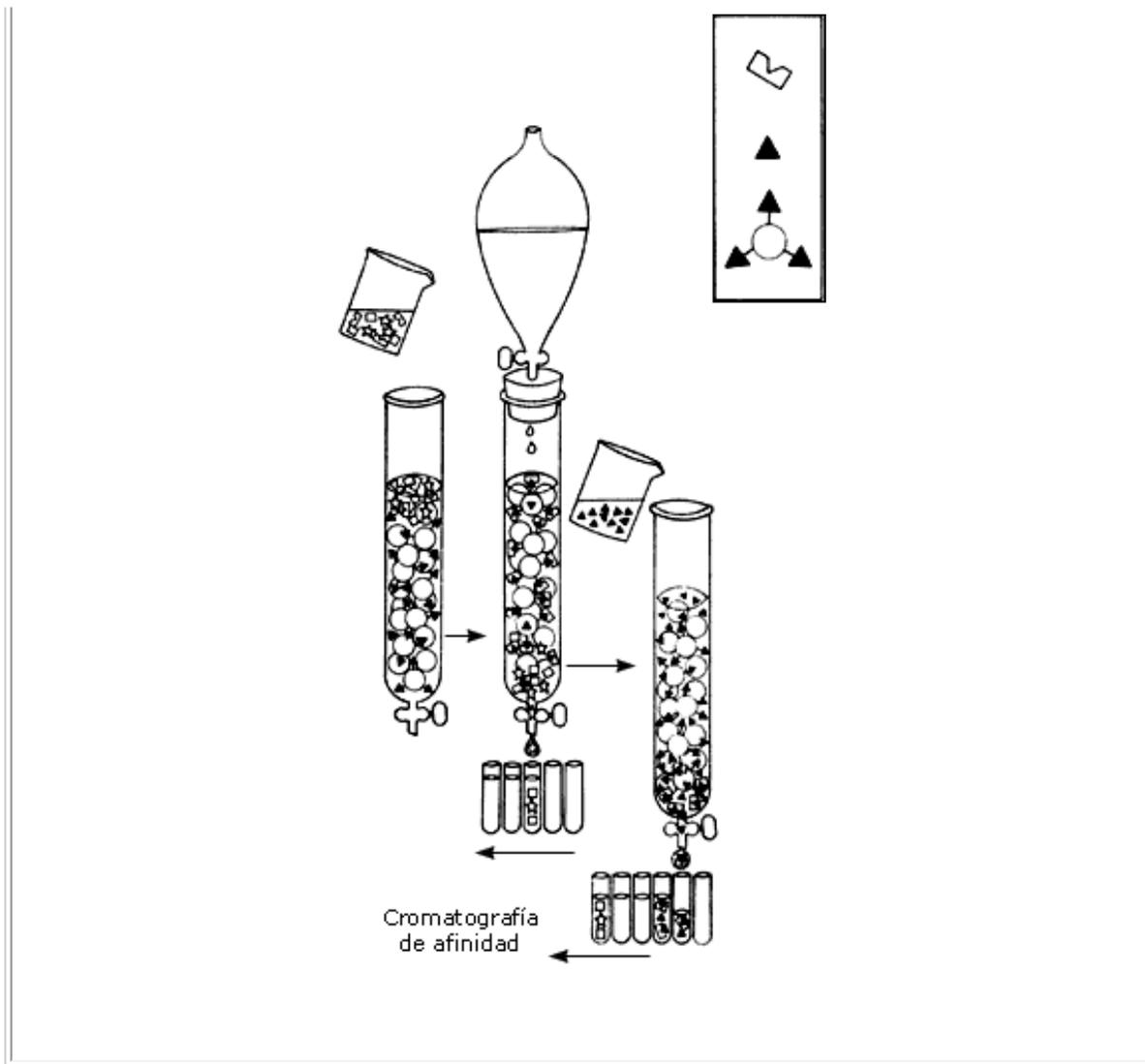
En la actualidad se utilizan varios polímeros que forman tales enrejados o mallas, y además impiden la difusión o pérdida de resolución de la separación. Estos polímeros forman geles, especie de gelatinas que permiten mantener un registro estable de las moléculas que se mueven dentro de ellos.

De manera análoga, en la cromatografía de exclusión (figura RI.3B) se puede colocar en una columna una suspensión o pasta de partículas con agujeros microscópicos y hacer fluir una solución con las moléculas a separar por esta columna. Las moléculas más pequeñas se irán introduciendo en los orificios, lo cual retarda su movimiento. Las moléculas grandes, que no caben en todos los agujeros, se retardarán menos. Si vamos colectando el fluido al final de la columna, irán apareciendo las moléculas separadas: primero las más grandes y al final las más pequeñas.



Otro principio de gran importancia en los procesos de separación es explotar la diferente afinidad de unas moléculas por otras. El procedimiento consiste en fijar un material que se une fuertemente a una proteína a un soporte sólido (por ejemplo, algo que se parezca a su **sustrato**). Estas moléculas que se unen a proteínas, específicamente, se denominan *ligandos*.

Al hacer pasar una solución con una mezcla de proteínas por una columna que contenga este soporte, la proteína que es de nuestro interés se quedará adherida, mientras que las otras pasan de largo. Si después agregamos una solución con abundante *ligando libre*, la proteína se despegará de la columna, pues ahora el sitio de unión lo ocupa el ligando que no está sujeto, y ya pura, se puede recuperar. Este proceso se denomina *cromatografía de afinidad* (figura RI.3c).



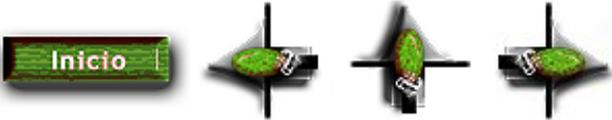
Otra importante propiedad que ayuda a la separación de las proteínas es su actividad. Cada proteína tiene una actividad particular que, en muchos casos, se puede medir. Si imaginamos que sometemos una muestra de saliva a un proceso de separación por tamaño molecular; y colectamos 100 fracciones en el proceso, ¿cómo sabemos en qué fracción está la actividad, por ejemplo, que degrada los azúcares? Si contamos con un método fácilmente visualizable, por ejemplo, una reacción química que origine un compuesto colorido, podemos ensayar esta reacción en cada uno de los tubos, y así conoceríamos el tamaño del componente activo de la saliva, y lo tendríamos parcialmente purificado.

De maneras similares a las descritas, se fueron identificando muchos de los componentes que constituyen a los seres vivos, y se les fueron asignando actividades. En los años setenta ya se disponía de la secuencia de **aminoácidos** de proteínas y de una descripción muy fina de su estructura, incluso en el nivel de resolución atómica (véase el capítulo VI).

Separación y análisis de los ácidos nucleicos

Como ya se mencionó, los ácidos nucleicos tienen apariencia de largas hebras de unidades básicas. Aunque, en principio, las técnicas de separación usadas para las proteínas también son aplicables para los ácidos nucleicos, aquí nos encontramos ante un problema: los genes no son entidades moleculares aisladas, con propiedades físicas o químicas que los diferencien. Así, hasta la mitad de los años setenta, la estructura de los genes se había inferido sólo de manera general. Por medio de técnicas genéticas y de síntesis *in vitro* de polímeros de nucleótidos, se había podido definir el fundamento del almacenamiento, transmisión y expresión de la información genética; ¡pero no se había podido aislar o purificar; ni se conocía la secuencia de ningún gene en particular. Las técnicas de separación tenían una utilidad muy marginal, en tanto no se dispusiera de un ADN de tamaño manejable y

naturaleza uniforme. El avance de este campo de la ciencia dependía críticamente de poder darle la vuelta a este problema. La sensación era, sin embargo, de desesperación al no ver una posible salida. Parecía no haber modo de tener acceso al genoma. La comunidad científica se encontraba sujeta al suplicio de Tántalo: sabía lo que buscaba y sabía que era extremadamente importante, pero no podía alcanzarlo.



[Nota 1] 

1. Al final del libro se incluye un glosario de términos y siglas que puede ser útil al lector.

Inicio

II. LAS LLAVES DE LA BIBLIOTECA DE LA VIDA: LA NUEVA HERRAMIENTA DE LA INGENIERÍA GENÉTICA

La nueva herramienta: posibilidad de aislar, caracterizar y manipular los genes

LA INFORMACIÓN ya mostrada en los recuadros I.1 y I.2 sobre la estructura y función básica de los genes se conocía desde finales de los años sesenta. Más aún, la labor de los bioquímicos había producido un gran cúmulo de conocimientos respecto de los conjuntos de reacciones químicas que ocurren dentro de los seres vivos. Las vías metabólicas fundamentales para la generación de energía y la biosíntesis de la mayoría de los compuestos esenciales para la vida ya estaban establecidos.

Este conocimiento se basaba en la aplicación inteligente de métodos de ensayo y purificación de enzimas clave, y de la identificación y análisis de sus **sustratos** y productos. Al mismo tiempo, otras disciplinas como la inmunología y la genética, realizaban avances y eran actividades de gran complejidad y finura.

La *biología molecular*, sin embargo, se encontraba en un punto en el que su desarrollo se había hecho muy lento. Una vez sentadas las bases fundamentales de la replicación y expresión de la información genética, el siguiente paso era desentrañar; en forma detallada, los mecanismos de regulación de la expresión genética.

Todas las vías metabólicas, la expresión de anticuerpos, la actividad de los virus, en fin, todas las manifestaciones del fenómeno viviente, están, en última instancia, orquestados por la expresión ordenada y regulada de los genes, por medio de la producción de proteínas específicas.

El extraordinario proceso por el cual una sola célula, el huevo fecundado, da origen a un organismo complejo, es decir; las etapas de diferenciación celular; constituía un reto extremadamente atractivo, pero a la vez formidable. No se esperaba poder descifrarlo a un paso siquiera aceptable sin la capacidad de hacer una disección del genoma, de irlo analizando pieza por pieza.

Un descubrimiento clave inició el cambio dramático que conocemos hoy como ingeniería genética o ADN recombinante: en 1970 Hamilton Smith y Daniel Nathans descubren una *enzima* capaz de reconocer y cortar el ADN en secuencias específicas, que les valió el Premio Nobel de fisiología o medicina, compartido con Werner Arber, en 1978.

Este descubrimiento (consecuencia de un hallazgo accidental, en el que los investigadores profundizaron con gran sentido) dio origen a una sucesión de nuevos descubrimientos y potenció el desarrollo de toda una serie de otras disciplinas y metodologías. En este capítulo revisaremos los fundamentos de algunas de las más importantes.

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Muchos microorganismos producen enzimas que modifican y digieren o rompen el ADN. Estos sistemas, llamados de *modificación-restricción*, son análogos a un sistema inmune, los cuales probablemente evolucionaron como un mecanismo de protección de los microorganismos contra infecciones virales. En efecto, las bacterias, por ejemplo, son infectadas por virus, llamados *bacteriófagos*, que inyectan su propio ADN en la célula bacteriana para después controlar su maquinaria celular y redirigirla hacia la síntesis de sus propios componentes, dando como resultado final la ruptura de la célula y la liberación de cientos o miles de nuevos virus. En algunas bacterias el ADN propio está modificado en ciertas secuencias. Una enzima de modificación se desliza sobre la hebra de ADN, y cada vez que se topa con su secuencia blanco, por ejemplo GAATTC, introduce un pequeño grupo químico en la adenina (A) central. Otra enzima, la enzima de restricción, también se desliza en la hebra de ADN, y si encuentra la secuencia GAATTC, corta el ADN en esa posición. La enzima, sin embargo, no corta el ADN modificado, por lo que efectivamente es capaz de degradar el ADN extraño que puede entrar a la célula, sin alterar el ADN propio.

Hoy en día conocemos miles de diferentes enzimas de restricción, provenientes de otros tantos distintos microorganismos. Más de cien distintas secuencias pequeñas de ADN pueden ser rotas, específicamente, por medio del uso de la adecuada enzima de restricción.

Otra interesante propiedad de las enzimas de restricción es que, en general, reconocen secuencias palindrómicas, es decir; secuencias que son iguales si se leen en una dirección, o en la dirección contraria. Por ejemplo:



es una secuencia palindrómica. Cuando actúa la enzima que reconoce y corta esta secuencia, llamada *EcoRI*, genera segmentos de ADN con extremos que se proyectan fuera de la doble cadena:



Estos extremos se denominan *cohesivos* o *pegajosos*, porque tienden a aparearse o **hibridarse** nuevamente. En realidad, cualquier extremo de ADN generado por un corte con *EcoRI* puede **hibridarse** o aparearse con otro extremo generado por la misma enzima.

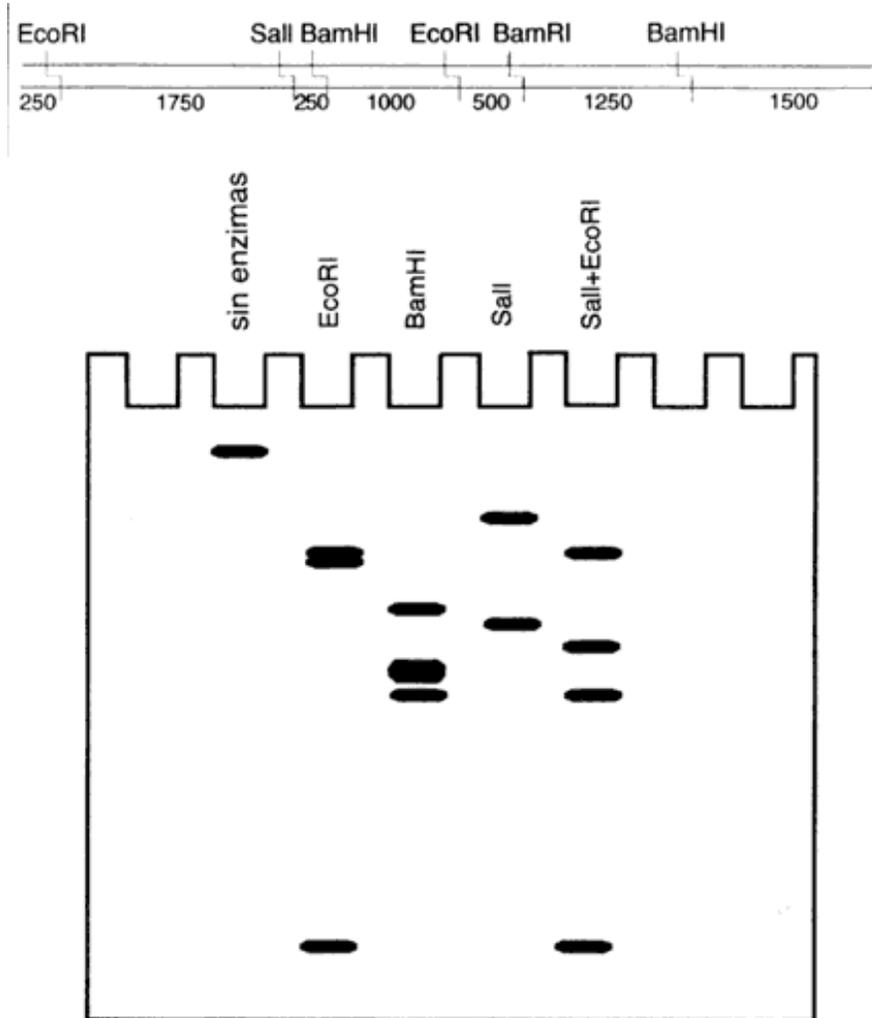
Los descubridores de las primeras enzimas de restricción pronto se dieron cuenta de que su acción sobre el ADN (comúnmente llamada "digestión") producía un conjunto definido de diferentes segmentos. Esto es particularmente fácil de detectar si la digestión se efectúa sobre una molécula pequeña; y tales moléculas existen en la naturaleza. Por ejemplo, ciertos virus están constituidos por **genomas** muy pequeños. El virus SV40 (que ocasiona cáncer en los simios) contiene una molécula de ADN circular de unos 5 mil pares de bases. Muchas bacterias portan pequeñas moléculas de ADN, llamadas *plásmidos*, que llevan información accesoria a su **chromosoma**. Estas moléculas pueden tener también sólo unos miles de nucleótidos. Si se somete el producto de digestión de una de estas moléculas a una separación por electroforesis, después de utilizar la enzima de restricción, se observa un *patrón de bandas*, que corresponde a los fragmentos de ADN de tamaños correspondientes a la distancia entre un sitio y otro. El principio del proceso es análogo a la separación de proteínas (véase el recuadro II.1).

Súbitamente, el ADN dejó de ser una sustancia monótona y frágil, donde purificar un segmento específico resultaba una tarea ardua o imposible. Al poder generar segmentos específicos, con las enzimas de restricción, la molécula de la vida quedó a merced del biólogo molecular. Es como si alguien jalara la cinta de un casete de audio, la amontonara desordenadamente y luego nos pidiera que separáramos el segmento que contiene una canción. Sería útil disponer de unas tijeras que cortaran la cinta cada vez que apareciera la sucesión de notas *si, la, sol, do, re, mi*, y después un ayudante acomodara los segmentos resultantes, de acuerdo con su tamaño. O imaginemos lo difícil que sería identificar un artículo de la enciclopedia, si está escrito sobre un listón de varios kilómetros de largo. Cómo se facilitaría la tarea si nuestras tijeras encontraran automáticamente, por ejemplo, la palabra "obtener", y ahí cortaran el listón. Luego nuestro ayudante nos presentaría 20 o 30 cajas, cada una conteniendo pedazos de listón clasificados de acuerdo con su tamaño.

RECUADRO II. 1. *La separación de los ácidos nucleicos*

Cuando se utiliza la electroforesis, es posible visualizar la acción de las enzimas de restricción. Si se colocan muestras que contienen ADN de diversos tamaños en los pozos de un gel en forma de placa, y se aplica corriente eléctrica, la diferencia de velocidad de migración de estas moléculas las distribuirá, por separado, al cabo de un tiempo, dentro del gel. Si después se agrega una sustancia que se hace luminosa al interactuar con el ADN y bañarse con luz ultravioleta, directamente se puede observar el patrón de distribución de las bandas constituidas por las moléculas de diversos tamaños, por medio del cual es factible deducir sus respectivas dimensiones.

Al usar diferentes enzimas de restricción, se generan diferentes segmentos. Por ejemplo, si la secuencia reconocida por la enzima Sall aparece en la molécula del ejemplo una vez, cortaría el segmento en dos partes. Si la secuencia reconocida por *EcoRI*, aparece dos veces, generaría tres pedazos. Al usar las dos enzimas simultáneamente, se producirían cuatro segmentos.



CONCEPTO DE CLONACIÓN MOLECULAR

Como ya mencionamos, los fragmentos generados por las enzimas de restricción tienen además la propiedad de reasociarse unos con otros, por medio de sus extremos cohesivos. Cuando los investigadores de la genética bacteriana conocieron estas enzimas de reciente caracterización, a principios de los años setenta, se dieron cuenta de algo sumamente importante: si se reasocia un segmento de restricción proveniente de un organismo con otro segmento, generado por la misma enzima pero proveniente de otro organismo, se obtendría una molécula híbrida o quimérica, una molécula de ADN recombinante. De hecho, dado que el ADN de todos los organismos vivos tiene una naturaleza química idéntica, no deberían existir limitaciones para recombinar el ADN de cualquier origen. Algunos investigadores intuyeron el monumental potencial de este concepto. Los laboratorios de Paul Berg, Stanley Cohen (en la Universidad de Stanford) y de Herbert Boyer (en la Universidad de California, San Francisco) se dieron así a la tarea de hacer que este concepto se convirtiera en realidad.

Para reasociar dos moléculas de ADN es necesario reconstituir el enlace fosfodiéster (un enlace covalente, fuerte), y aquí entra en acción otra enzima que había ya sido descrita para entonces: la ADN ligasa. De esta forma podían tomarse las dos moléculas, reasociarlas (hibridizarlas) y luego ligarlas, se obtiene una molécula continua, recombinante, la cual, sin embargo, es algo inerte en tanto no sea introducida a una célula que la *transcriba* y *traduzca* (véase el recuadro I.2). Además, algo muy importante: esta molécula debe ser capaz de perpetuarse (replicarse dentro de la célula). De otra manera se diluiría y perdería irremisiblemente después de que la célula se dividiera. Finalmente, era necesario identificar las células en las que el ADN recombinante se hubiera introducido y establecido.

Así tenemos los elementos esenciales de la técnica de ADN recombinante (véase el recuadro II.2):

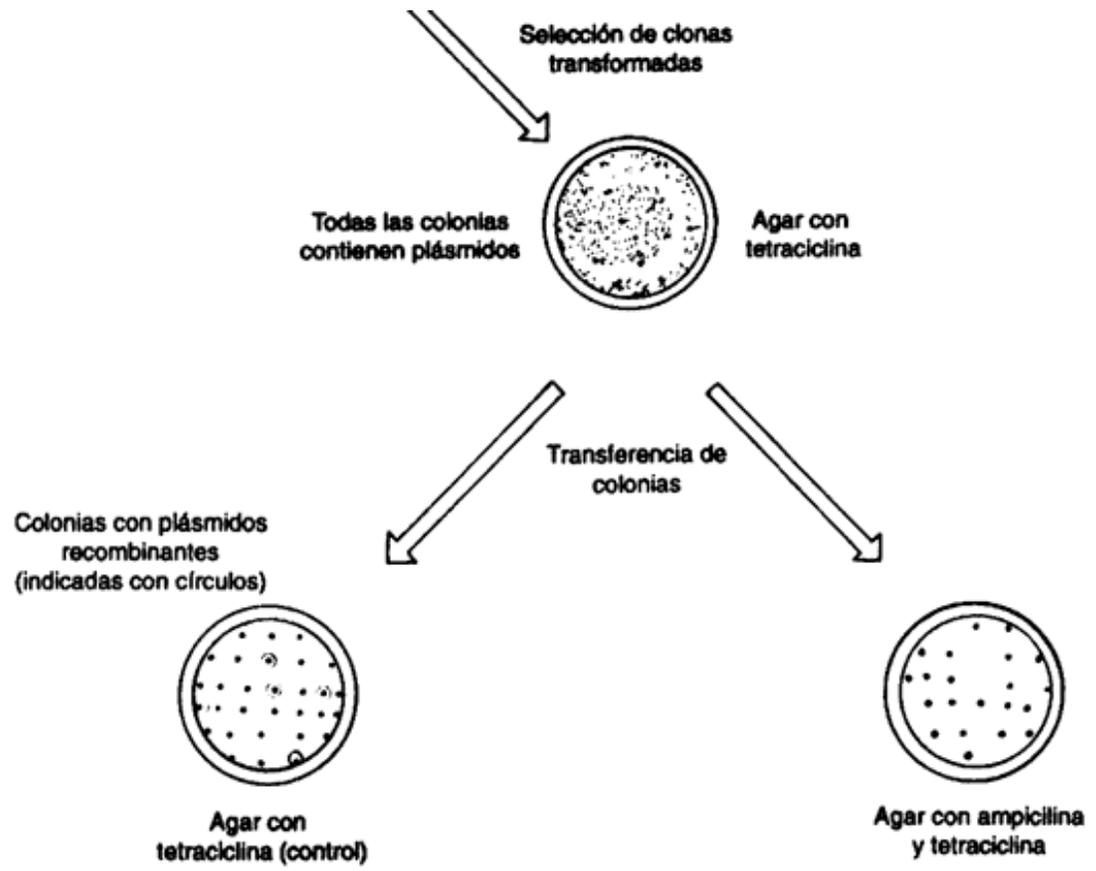
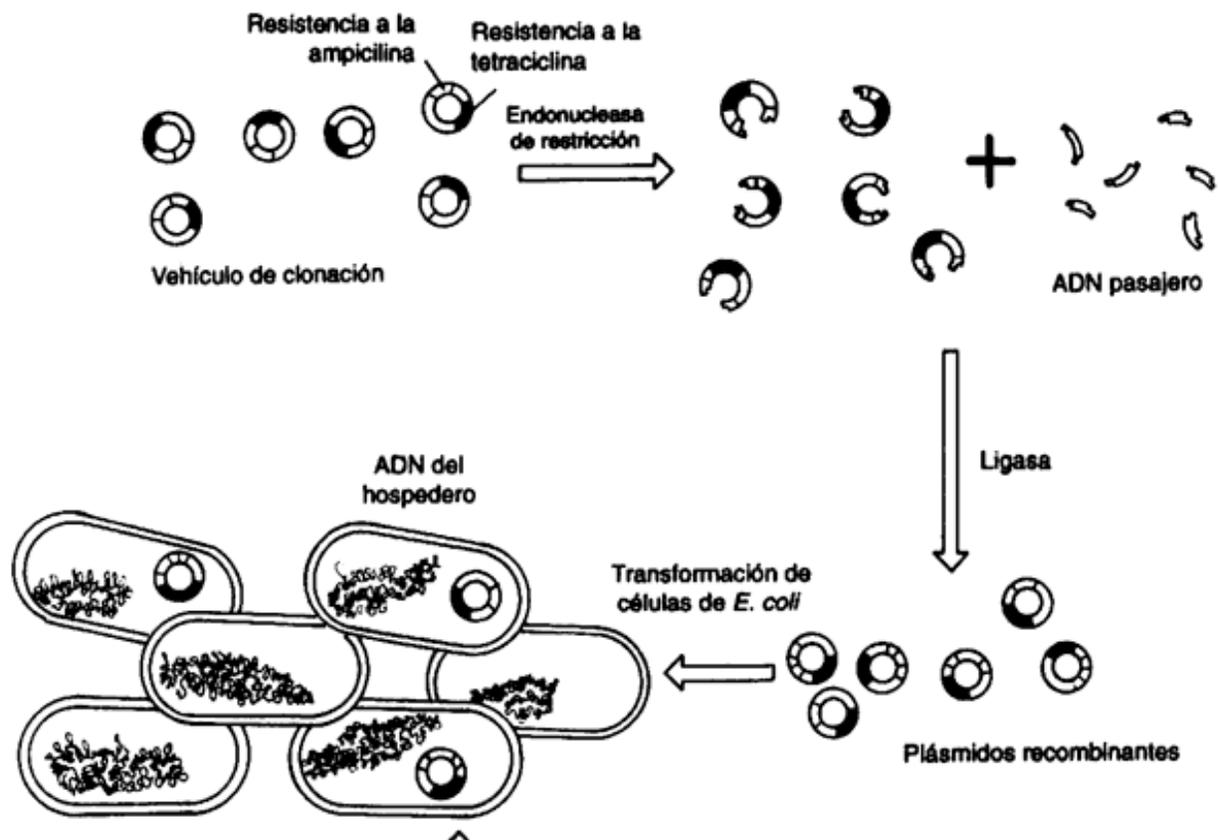
- **Obtención de fragmentos específicos de ADN (enzimas de restricción).**
- **Ligación (o reasociación covalente) de las moléculas para obtener hebras continuas de ADN (enzima ligasa).**
- **Mecanismo para introducir al interior de células vivas el ADN recombinante (*transformación*).**
- **Mecanismo para asegurar la replicación e identificación de la molécula recombinante dentro de la célula (vehículo molecular).**

El primer experimento en el que se puso en práctica este concepto, realmente simple, que se conoce como **clonación molecular** se logró al utilizar plásmidos bacterianos como vehículos y ADN, también bacteriano, como pasajero.

RECUADRO II. 2. *Los procedimientos básicos del ADN recombinante*

El producto de la digestión del ADN con endonucleasas de restricción está constituido por muchos fragmentos específicos, cuyos extremos son compatibles o cohesivos unos con otros. Estos fragmentos se ligan después a un segmento especial de ADN, el vehículo de donación (usualmente un plásmido), que fue cortado con la misma enzima. Las moléculas recombinantes resultantes contienen un ADN vehículo o vector y un ADN pasajero, constituyendo una nueva molécula circular continua.

Estas moléculas se introducen a células bacterianas y se seleccionan por medio de "genes marcadores" presentes en el vehículo de donación. Dentro de su secuencia de ADN los vehículos de donación contienen señales que inducen la replicación del ADN, y otras que producen, típicamente, resistencia a algún antibiótico. Así, las células que reciben una molécula recombinante la perpetúan en su interior, y se pueden detectar porque ésta confiere a la célula la capacidad de sobrevivir en presencia del antibiótico.



Uno de los primeros vehículos moleculares de donación, el plásmido denominado pBR322, fue construido por el doctor Francisco Bolívar, investigador mexicano que se encontraba trabajando en su postdoctorado, a mitad de los años setenta, en la Universidad de California, San Francisco. Este plásmido se ha usado innumerables veces y servido de base para la construcción de la mayoría de los vehículos más modernos de donación. Por la participación del doctor Bolívar en estas investigaciones, aunado a sus otras aportaciones a la ciencia mexicana e internacional, fue galardonado con el premio internacional Príncipe de Asturias en el área científica, en 1992, que otorga el gobierno español.

Consideremos ahora las consecuencias de un experimento de donación molecular. Los segmentos de ADN que se encontraban dispersos en largas y monótonas hebras de ADN, resultan ahora disociados en segmentos específicos, y cada uno puede ser perpetuado independientemente. Disponemos ahora de una biblioteca genómica o **genoteca**, que podemos mantener indefinidamente con sólo mantener vivas las células bacterianas que albergan los plásmidos recombinantes. Igualmente, una vez seleccionada una clona de la genoteca, pudimos cultivar las células y obtener cantidades ilimitadas de ADN para su posterior manipulación y caracterización. La elusiva purificación de genes específicos se vuelve una realidad.

Como ya se mencionó, las repercusiones de estos primeros experimentos fueron visualizadas rápidamente, pues incluían también posibles riesgos y problemas, lo cual dio origen a un importante debate, iniciado por la propia comunidad científica (véase el recuadro II.3).

RECUADRO II.3. *El debate inicial sobre el ADN recombinante*

Una de las formas más interesantes de comunicación dentro de la comunidad científica internacional es la que ocurre informalmente, por medio de llamadas telefónicas, visitas, seminarios, etc. Por este conducto existen redes de científicos que están bastante bien enterados de lo que se está desarrollando en otros laboratorios de las áreas competidoras o afines a la propia. Así se supo que se llevarían a cabo experimentos que pretendían crear una molécula de ADN quimérica, lo cual unía material genético de un virus, causante de cáncer, con el de una bacteria natural del colon humano (*Escherichia coli*), antes incluso de que se realizaran. Estos experimentos fueron diferidos, pues la preocupación de algunos miembros de la comunidad puso en marcha una serie de conversaciones y correspondencia que llamaba la atención sobre los posibles riesgos de seguir adelante con este tipo de práctica. Fue así como un grupo de científicos decidió organizar un comité que evaluara las posibles consecuencias y riesgos que significaban este tipo de experimentos, durante una reunión científica celebrada en junio de 1973. Para abril de 1974, el comité presidido por Paul Berg (véase en este capítulo "Concepto de clonación molecular",) llegó a la conclusión de que era necesario establecer una moratoria que suspendiera la actividad de recombinación *in vitro* de ADN hasta que se publicaran reglas precisas. En febrero de 1975 se realizó la célebre conferencia de Asilomar, en California, de la que emanaron restricciones importantes acerca de las precauciones que deberían tomarse para efectuar diversos tipos de experimentos relacionados con el ADN recombinante.

Los hechos antes relatados son notables por dos aspectos. En primer lugar, los científicos de ese campo decidieron suspender temporalmente y reglamentar la ejecución de experimentos que revestían enorme interés para ellos y para el avance del conocimiento. En segundo lugar, las cartas emitidas y las recomendaciones muestran una gran capacidad prospectiva. Se ponderaron los riesgos, consignando claramente que éstos eran de carácter especulativo,

por lo que se diseñaron mecanismos de confinamiento, tanto biológico como físico, para reducir los riesgos al mínimo.

El debate acerca del ADN recombinante continúa desde entonces. Hay grupos que han mantenido una oposición constante; las acciones de los gobiernos incluyen la creación de reglas detalladas y estrictas. El tiempo, sin embargo, ha probado ya que el balance entre los riesgos y los beneficios de la experimentación en ingeniería genética es abrumadoramente positivo. De hecho, ninguno de los desastres previstos ha tenido siquiera visos de convertirse en realidad. Aparentemente, la probabilidad de crear por accidente un organismo vivo peligroso es muy baja: los organismos ocupan nichos a los que se han adaptado durante millones de años y compiten muy favorablemente con variantes creadas en el laboratorio.

Si el temor de crear organismos monstruosos causantes de epidemias incontrolables o de diseminar enfermedades parece haber sido infundado. Lo que sí ha surgido es toda una serie de problemas éticos, resultado del poderío que confiere al género humano esta metodología. Como suele pasar, no es el accidente, sino la deliberada acción de los individuos lo que conduce a las mayores preocupaciones y trastornos en la sociedad. (En el Epílogo de este libro se hace una reflexión más detallada acerca de este tema).

Durante la década siguiente, en un proceso continuo y creciente de desarrollo metodológico, se constituyó un verdadero arsenal de diferentes herramientas biológicas que aumentaron notablemente la capacidad de aislar; caracterizar y manipular los genes. (La descripción de algunas de las técnicas básicas más importantes se destaca en lo que resta del capítulo. En el capítulo siguiente se ven ejemplos de su aplicación y se describen otras técnicas importantes)

EL ADN SINTÉTICO

Desde la época de los experimentos pioneros en que se definió el código genético fue necesario elaborar moléculas de ácidos nucleicos no naturales. Se inició entonces el desarrollo de las técnicas para sintetizar o fabricar químicamente el ADN. El desenvolvimiento de la química orgánica, que precedió al de la biología molecular; había establecido desde tiempo atrás la naturaleza química de los ácidos nucleicos. Se requirió, sin embargo, un periodo relativamente largo para perfeccionar adecuadamente las técnicas para sintetizar el ADN de manera práctica. Desde fines de los años sesenta, Har Gobind Khorana logró la tarea titánica de elaborar químicamente un pequeño gene a partir de sus precursores básicos (los nucleótidos A, G, C y T). Este trabajo hizo al doctor Khorana merecedor del Premio Nobel de fisiología o medicina en 1968. Los siguientes quince años fueron necesarios para que una técnica laboriosa, que requería la participación de químicos especializados, se convirtiera en una tarea simple y automatizada, al alcance de cientos de laboratorios del mundo. Actualmente, mediante síntesis química se obtienen miles de fragmentos de ADN cada día. El factor clave para la simplificación del procedimiento consistió en lograr la síntesis en fase sólida, que es susceptible de ser adaptada a una máquina automática (véase el recuadro II.4). Las limitaciones de esta técnica sólo permiten sintetizar directamente fragmentos de ADN de un tamaño menor a unas 100 bases, por lo que normalmente se les conoce como oligonucleótidos (o simplemente oligos). De cualquier manera, utilizando las propiedades de hibridación del ADN y de la enzima ADN ligasa, se pueden construir grandes trechos de ADN de doble cadena.

Al disponer de oligos, cuya secuencia está definida por el investigador, se abren posibilidades para crear genes con completa libertad, y también para modificar, en principio sin limitación alguna, a los genes naturales (véase el recuadro II.4). (En secciones sucesivas se verán algunas más de las múltiples aplicaciones de los oligos sintéticos.)

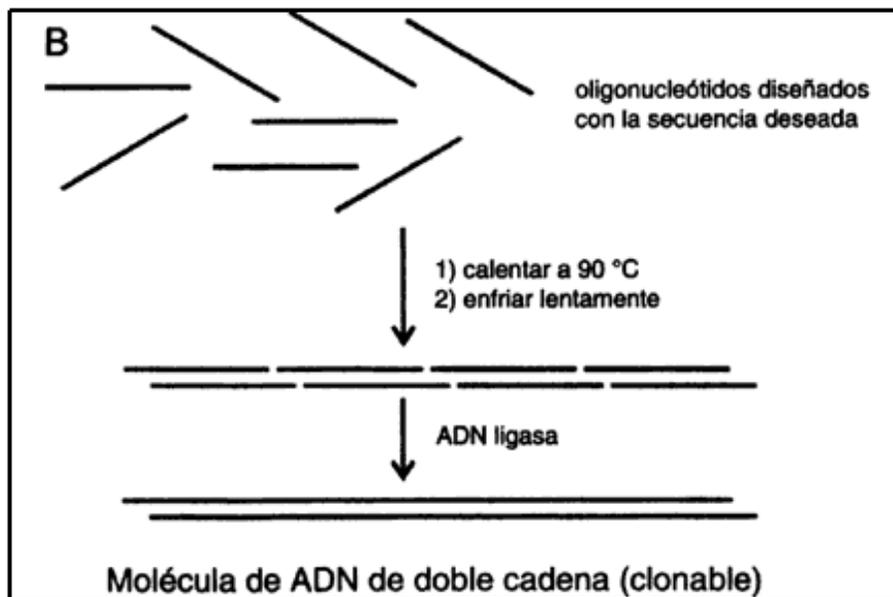
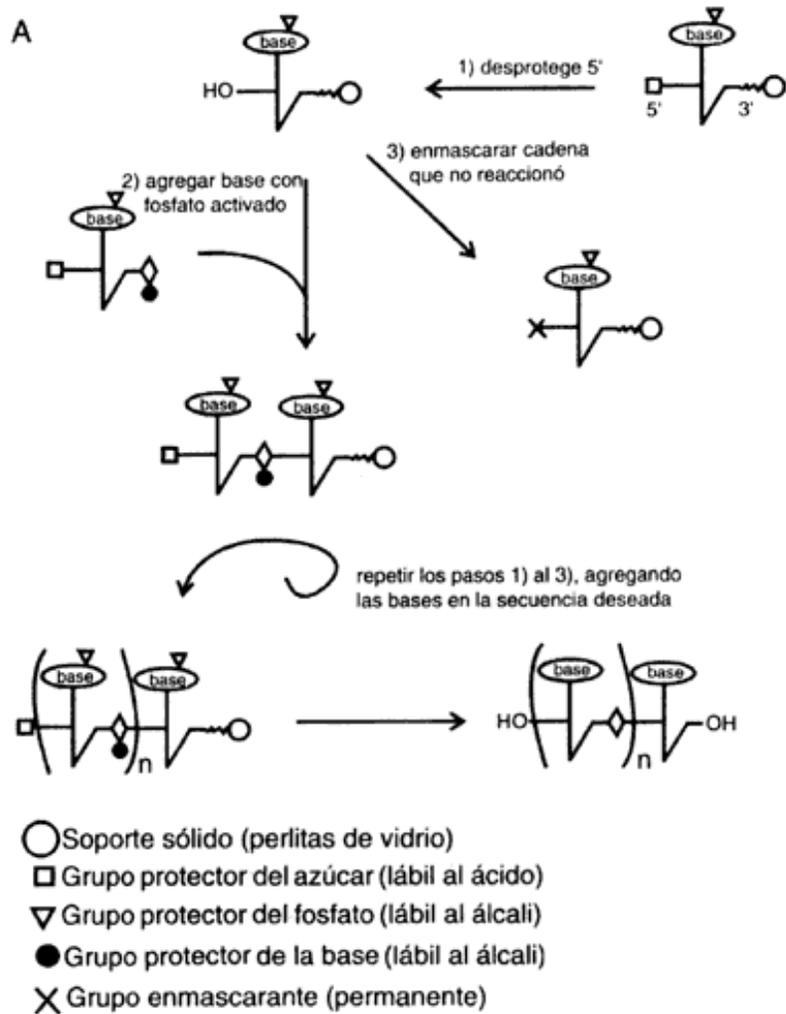
RECUADRO II.4. *El ADN sintético y sus aplicaciones*

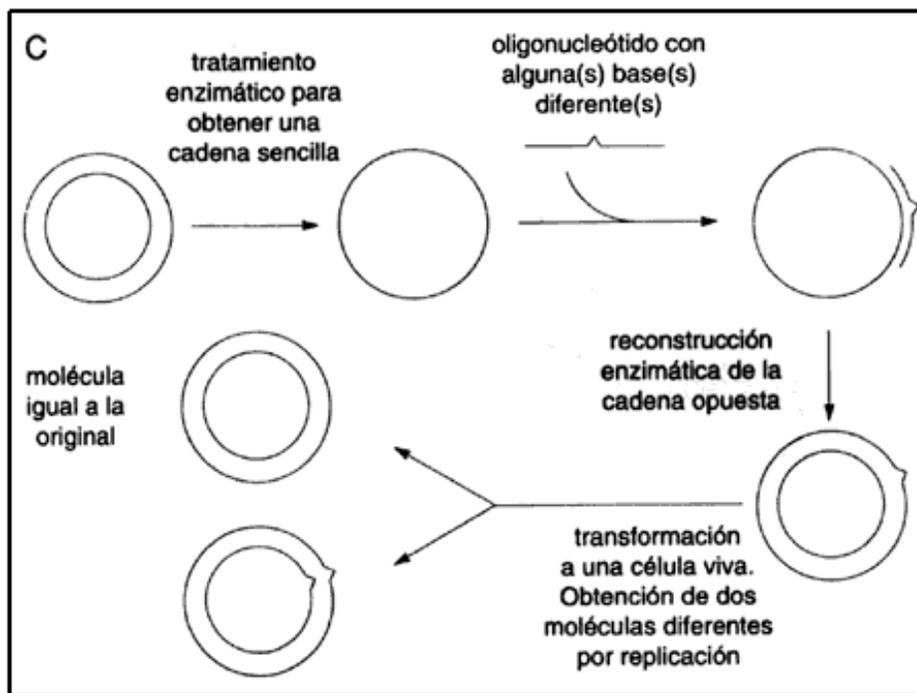
Para un químico, la tarea de sintetizar moléculas de ADN representa varios retos. El objetivo es ensamblar secuencias definidas, a partir de los cuatro nucleótidos A, G, C y T. Muchos años de trabajo, de varios laboratorios, han culminado en los sintetizadores robóticos que se usan hoy en día, y con los que se producen miles de oligos para las más diversas aplicaciones.

Una vez resuelto el problema de enmascarar selectivamente los grupos químicos presentes en los nucleótidos, se pueden hacer reaccionar ordenadamente, para ir produciendo la secuencia. En la actualidad se utiliza el método en fase sólida, en el que la cadena de ADN va creciendo adherida a pequeñas partículas de vidrio. En la síntesis automatizada, una máquina, constituida por válvulas y botellas controladas por una computadora, va inyectando diversas soluciones al reactor que contiene el vidrio. Cíclicamente se activa el oligo, se le hace reaccionar con la base siguiente y se lava.

Con esta técnica se puede llegar; prácticamente, a oligos de hasta 50 o 100 nucleótidos de longitud.

Entre las aplicaciones más frecuentes y útiles de oligos sintéticos se encuentra la construcción de genes, que se logra hibridando oligos complementarios los cuales reconstruyen el ADN dúplex con la secuencia diseñada. Otro enfoque de gran utilidad se denomina *mutagénesis dirigida*. En este caso, el oligo se usa para alterar específicamente una pequeña región dentro de un gene natural clonado.





ENZIMAS ÚTILES PARA MANIPULAR EL ADN

Hasta el momento hemos mencionado a la ADN ligasa, una importante enzima que permite ligar o unir moléculas de ADN. La investigación sobre la fisiología de los ácidos nucleicos ha proporcionado, además, una serie de enzimas que se utilizan ampliamente para manipular los ácidos nucleicos en el tubo de ensayo, y que forman parte importante de las herramientas del ADN recombinante. Cada una de estas enzimas, al igual que las endonucleasas de restricción, cumple un papel dentro de la célula viva, para alterar el material genético (por ejemplo, para repararlo, replicarlo, degradarlo, recombinarlo, etc.). en el laboratorio se pueden usar estas enzimas, después de purificarlas de sus fuentes naturales, para efectuar transformaciones útiles a los propósitos del experimentador. Por ejemplo, la enzima *transcriptasa reversa*, que naturalmente producen ciertos virus para invadir el genoma de sus células blanco (véase el recuadro IV.3), se utiliza ampliamente para clonar genes a partir de sus **ARN mensajeros** (véase el capítulo siguiente).

Dado que el propio desarrollo del ADN recombinante, ha potenciado, a su vez el desarrollo de herramientas moleculares, hoy en día contamos con un enorme número de enzimas y reactivos que permiten gran versatilidad en la manipulación del ADN.

SECUENCIACIÓN DEL ADN

Una consecuencia inmediata de la clonación molecular es que permite disponer de cantidades ilimitadas de cantidades específicas de ADN pasajero se encuentra formando parte de un plásmido, es factible separarlo fácilmente del resto del ADN celular, que se encuentra en el cromosoma bacteriano, una molécula mucho más grande. A partir de un cultivo de *E. coli*, se puede separar suficiente ADN plasmídico para caracterizarlo. Una vez que se dispuso de genes individuales purificados, el escenario estaba listo para la siguiente etapa.

Walter Gilbert, en la Universidad de Harvard, y Frederic Sanger, en Cambridge, Inglaterra, se dieron a la tarea de desarrollar técnicas para determinar la más importante característica del ADN, su secuencia de bases. Pocos años después lograron su objetivo, y compartieron el Premio Nobel de química en 1980. Las técnicas de secuenciación actuales (véase el recuadro II.5) son usadas abundantemente e, inclusive, han sido automatizadas. A la fecha,

genes de las más diversas fuentes han sido secuenciados, acumulando una base de datos que representa cientos de millones de nucleótidos: Esta cantidad crece a paso inexorable y se espera que lo haga cada vez más aceleradamente (véase la sección sobre la secuenciación del genoma humano, en el capítulo IV).

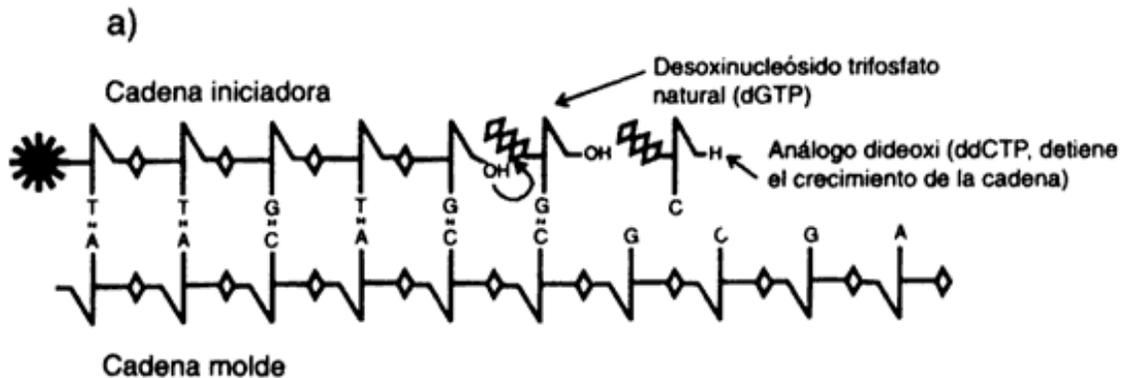
RECUADRO II. 5. Procedimiento para obtener la secuencia del ADN

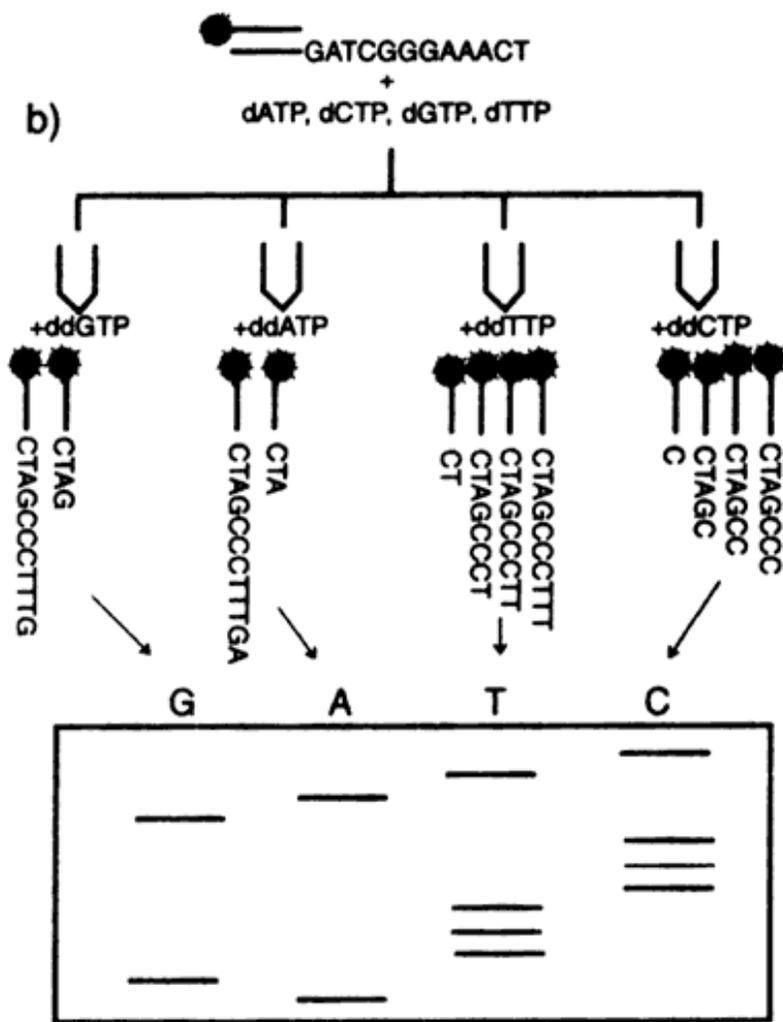
A partir de un gene donado se pueden seguir hoy en día diversos procedimientos para deducir su secuencia nucleotídica. Hasta ahora se han empleado casi exclusivamente, los métodos de Maxam-Gilbert y el de Sanger; los cuales tienen en común generar una colección de fragmentos con un extremo común, y el otro termina en una de las cuatro bases. En el método de Maxam-Gilbert se utilizan reacciones químicas específicas para lograr este objetivo. En el método de Sanger se emplean reacciones enzimáticas.

En la figura se ilustra el método enzimático. A partir de un oligo marcado se inicia una reacción de replicación *in vitro*. Esta reacción procede hasta encontrar un nucleótido terminador, que no permite que la cadena replicada siga creciendo. Se efectúan cuatro reacciones, una para cada base de ADN que contiene el nucleótido terminador correspondiente, y se termina con cuatro colecciones de fragmentos marcados, cada una constituida por fragmentos que terminan en A, G, C o T, respectivamente.

El análisis del tamaño de estos fragmentos, mediante electroforesis en gel, revela de inmediato un patrón de bandas, que corresponde directamente a la secuencia que se encuentra enfrente del oligo iniciador.

En el capítulo IV, "Nuevas técnicas de secuenciación p. 101, se relatan nuevos métodos que prometen revolucionar la técnica de secuenciación del ADN.





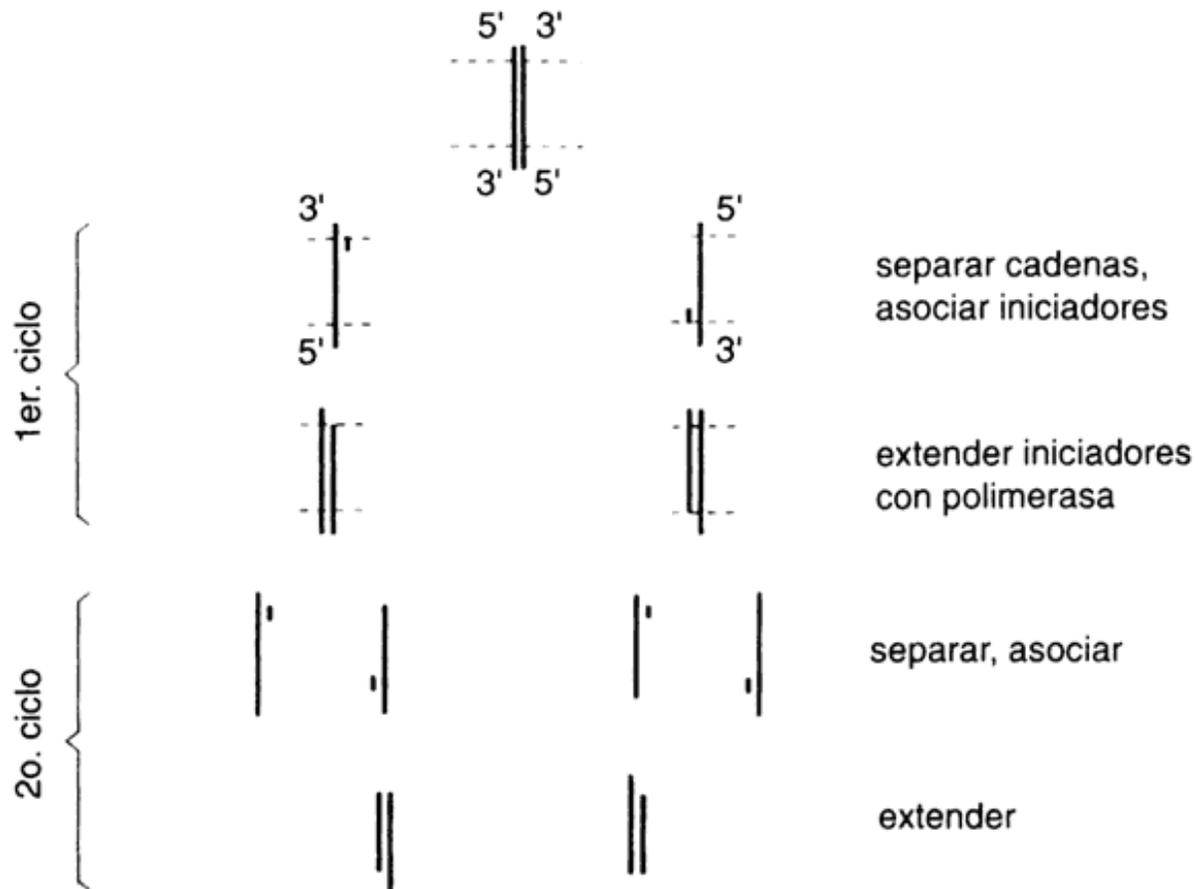
LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA

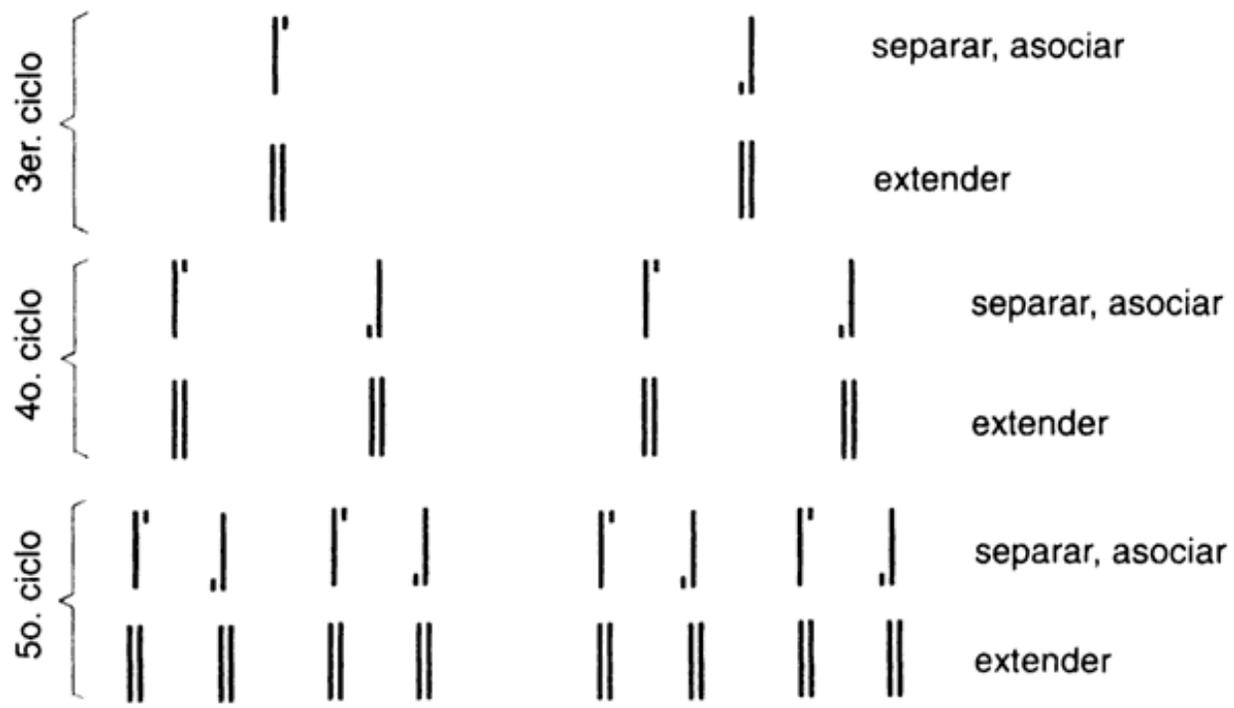
Otro de los avances metodológicos más importantes es la *reacción en cadena de polimerasa* (PCR, siglas en inglés *polymerase chain reaction*). Este procedimiento constituye un ejemplo sumamente interesante de la importancia de la metodología en el desarrollo científico. También ilustra la manera como ocurren muchos de los descubrimientos: a partir de intuiciones que integran conocimientos que han estado disponibles durante cierto tiempo.

En efecto hacia 1985 —con el ADN recombinante ya plenamente establecido como una técnica aplicada rutinariamente por cientos de laboratorios en el mundo—, Kary Mullis, quien a la sazón trabajaba para la compañía Cetus, en San Francisco, California, tuvo una súbita inspiración mientras manejaba su auto y se dirigía hacia una cabaña en la que se disponía descansar el fin de semana. Como muchos otros investigadores, Mullis se encontraba desarrollando aplicaciones para los oligos sintéticos. Concibió entonces la idea de que combinando el uso de los oligos con varios ciclos de replicación *in vitro* se podía amplificar, es decir; obtener en gran cantidad, un segmento de ADN específico (por ejemplo, un gene en particular).

Pero veamos con más calma en qué consiste la idea (figura II.1). La enzima ADN polimerasa participa en la replicación del ADN (recuadro I.I). Para convertir una molécula de ADN de doble cadena en dos moléculas idénticas, la enzima requiere que las cadenas de la molécula inicial se separen, para así tener un molde disponible.

Además, la enzima requiere un segmento de ADN con un extremo libre, que sirve para cebar o iniciar la reacción de replicación y los nucleótidos precursores. Si se colocan estos sustratos en un tubo de ensayo, la ADN polimerasa puede incorporar uno por uno los nucleótidos correspondientes, es decir, frente a una A en el molde, adicionará T en la cadena creciente; frente a G, C, etc. En realidad, éste concepto era perfectamente conocido y aplicado desde mucho antes de que se concibiera la técnica de la PCR. Lo original de la idea de la concepción de Mullis fue pensar qué sucedería si se aplica este procedimiento en ciclos sucesivos, en una reacción en cadena. Los oligos sintéticos, en virtud de su propiedad de hibridación de los ácidos nucleicos, definen los puntos de partida para el copiado de las cadenas de ADN. Si se colocan dos oligos cuya secuencia define los extremos de un segmento determinado de ADN, se hacen hibridar con las hebras del molde, previamente separadas, y se someten a una reacción con ADN polimerasa, de lo que resultarán dos moléculas cuyos extremos están definidos por los oligos y que corren en sentido opuesto. Las cadenas resultantes son complementarias entre si: existen ahora el doble de moléculas con la secuencia que demarcan los oligos. ¿Qué pasa si ese proceso se repite, cíclicamente? ¡El resultado es lo que se denomina un crecimiento exponencial! En el siguiente ciclo de separación de cadenas, hibridación con los oligos y reacción con ADN polimerasa, se obtendrán cuatro moléculas de la región entre los oligos. Los ciclos subsiguientes generarán 8, 16, 32, 64 moléculas, y así sucesivamente. Para comprender mejor las implicaciones de un proceso exponencial, recordemos la fábula del inventor del ajedrez. Se cuenta que un rey quedó tan asombrado de lo interesante que resultaba el juego, que ofreció recompensar al súbdito que se lo enseñó. Este le pidió "solamente" un grano de trigo por el primer cuadro del tablero, dos por el segundo, cuatro por el tercero, y así sucesivamente. El rey, sin hacer cálculos, accedió de buen grado. Por desgracia para el rey, todas las cosechas de trigo del mundo fueron insuficientes para completar la solicitud del inteligente vasallo. Sólo por el cuadro 30 se requerían 1 073 741 824 granos de trigo.





Así, con la técnica de la PCR se pueden amplificar segmentos específicos de ADN para crear muchos millones de moléculas a partir de unas cuantas, o incluso de una sola. Para esto se requirió adaptar el concepto básico haciendo uso de ADN polimerasas provenientes de microorganismos termófilos (que crecen a temperaturas de más de 70 grados en manantiales termales). De otra manera, la enzima se inactivaba cada ciclo, pues se requiere aplicar calor para separar las moléculas del ADN molde. Hoy día un ciclo puede tomar cinco minutos o menos, por lo que el proceso de amplificación se lleva a cabo en menos de dos horas (normalmente 20 o 30 ciclos son suficientes).

Nuevamente nos encontramos ante un concepto bellamente simple. Lo sorprendente es que los elementos técnicos y conceptuales necesarios para esta invención estuvieron disponibles por varios años antes de que Kary Mullis los desarrollara.

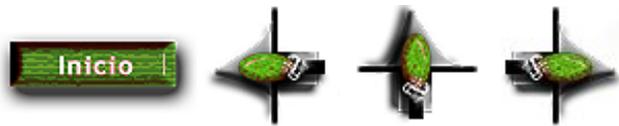
La aplicación de la PCR, en sí misma, constituye un avance revolucionario en la investigación biológica moderna. Uno de los más espectaculares ejemplos que ilustran la potencia de esta técnica es el rescate y secuenciación de ADN prehistórico (realidad que sustenta la historia de ciencia ficción *Parque Jurásico* de Michael Crichton). (En capítulos siguientes consideraremos otras aplicaciones en las que la PCR desempeña un papel indispensable.)

OTRAS TÉCNICAS IMPORTANTES EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL MODERNA

En los capítulos que siguen hablaremos de las muchas maneras en que los investigadores aplican métodos específicos para lograr sus objetivos de aislar, caracterizar y manipular genes y sus productos. Cada problema requiere echar mano de las técnicas más modernas y avanzadas. Efectivamente, en la práctica, la labor de un científico está fuertemente condicionada por las técnicas experimentales de que dispone y puede manejar.

Así, entre el gran número de técnicas que no mencionamos en este capítulo, algunas harán su aparición cuando se describan aplicaciones específicas. Observaremos cómo se utiliza reiteradamente la propiedad de reconocimiento molecular, de asociarse específicamente tras moléculas. ¡Realmente el científico moderno tiene las herramientas para encontrar una aguja en un pajar! Trataremos de resaltar también cómo los avances de tecnologías que

proviene de disciplinas diferentes son incorporadas ávidamente por los biólogos. Su uso les permite prosperar en las respuestas a las preguntas que se están formulando.



Inicio



III. AISLANDO GENES: CASOS DE LA VIDA REAL

HASTA el momento hemos descrito una serie de manipulaciones que ocurren de manera muy simple. En las épocas pioneras del ADN recombinante, la donación de cada nuevo gene resultaba ser un hecho importante. En este capítulo, conforme se presentan ejemplos de aislamiento y caracterización de genes específicos, iremos viendo cómo entran en juego los diferentes problemas que se requiere resolver. Más interesante aún, es que podremos explorar las formas ingeniosas y la gran cantidad de trabajo que se ha requerido para sortear estos problemas. Actualmente, el aislamiento de ciertos genes es una tarea sencilla, casi rutinaria. Específicamente, la relativa simplicidad de los **genomas** de bacterias presenta pocas dificultades al arsenal de técnicas contemporáneas. El caso de un gene humano, sin embargo, es una historia muy distinta. Un gene humano se encuentra disperso en alguno de los 23 cromosomas, constituyendo quizá menos de la diezmilésima parte del mismo. Aun cuando hoy día conocemos la secuencia de miles de genes humanos, fruto del esfuerzo de muchos laboratorios de todo el mundo, el aislamiento de ciertos genes clave sigue ocupando los titulares de revistas científicas. Para comprender la admiración que inspira la culminación de una de estas empresas, revisaremos una serie de procedimientos que se han diseñado para el aislamiento de genes.

DIVERSOS NIVELES DE COMPLEJIDAD

Como se mencionó, los organismos unicelulares, los microorganismos, contienen cantidades mucho menores de material genético que los organismos superiores. Esto no impide que constituyan un grupo extremadamente diverso entre los seres vivos. Existe, pues, una enorme riqueza en los genes de estos organismos que se han adaptado a vivir en los más variados y extremos ambientes. El interés de los científicos por el mundo microbiano mantendrá un paso acelerado en la búsqueda del conocimiento sobre las características de sus genes y su regulación. Adicionalmente, dada su simplicidad relativa, estos organismos constituyen excelentes modelos para estudiar la forma como los genes orquestan la actividad de las células: las bacterias usualmente tienen genomas con menos de cinco o 10 millones de pares de bases; muy simples si las comparamos con el genoma de un vertebrado, de más de mil millones de pares de bases.

Pasemos ahora a tratar un aspecto quizá poco conocido respecto a la ciencia biológica experimental. Se dice que la diferencia entre un ingeniero y un científico es que el primero resuelve los problemas que necesitan ser resueltos, mientras que el segundo, aquellos que pueden ser resueltos. En su búsqueda de conocimiento, el científico requiere seleccionar preguntas que sean abordables. El conocimiento se va construyendo paso por paso, de manera creciente, por lo que hay preguntas que no pueden ser resueltas en tanto no se tengan fundamentos previos. Desde luego, siempre estamos tironeados por dos fuerzas: las del interés por resolver preguntas que nos son cercanas (porque atañen a la naturaleza humana o a las enfermedades que nos aquejan, por ejemplo), y las de la curiosidad por resolver problemas fundamentales que sabemos que se deben rendir pronto con las herramientas y conocimientos de los que ya disponemos. Esto hace que los proyectos científicos se dividan en básicos y aplicados. En realidad, cada día están más cercanos los grupos que cultivan ambas modalidades: incluso muchos científicos abordan tanto problemas básicos como aplicados. Los proyectos de investigación básica formulan preguntas fundamentales, y deben diseñar los sistemas experimentales que permitan resolverlas. En el curso de la historia de la ciencia biológica, se han desarrollado "modelos" que son particularmente atractivos para responder ciertas preguntas. Así, por ejemplo, Mendel estudiaba las leyes fundamentales de la genética con la planta de chícharo: él podía distinguir características determinadas por los genes con gran facilidad, los chícharos eran lisos o rugosos, amarillos o verdes. En tiempos más recientes se han ido escogiendo otros modelos, cada uno con atractivos particulares.

En el nivel más simple se estudian las bacterias y sus virus. La bacteria favorita, cuyo estudio estableció el desarrollo de la biología molecular, es *Escherichia coli*, el bacilo del colon humano. Las variedades originalmente estudiadas ni siquiera causan enfermedades ni son particularmente benéficas para el hombre. Su atractivo deriva de su relativa simplicidad y de que se reproducen a gran velocidad, duplicándose cada 20 minutos. En el siguiente nivel se encuentran otros organismos unicelulares: las levaduras. Aquí se pueden encontrar fenómenos distintos, propios de organismos más complejos. Las levaduras son organismos **eucariontes**, por lo que su organización genética es mucho más cercana a la de plantas y animales que a la de las bacterias. Continuando en la escala ascendente de complejidad encontramos otro organismo modelo, un gusano llamado *Caenorhabditis elegans*. ¿Por qué escoger este organismo como modelo? Nuevamente, no es patógeno ni resulta benéfico. La razón se

debe a que es un organismo pluricelular en el que se pueden estudiar fenómenos de diferenciación o especialización de células para crear tejidos y órganos, aunque todos ellos muy simples: cada uno de estos gusanitos está constituido por 1090 células exactamente. El genoma de este organismo está estudiándose intensamente y probablemente será el primer genoma de un organismo pluricelular del que conozcamos su secuencia completa. En niveles sucesivos de complejidad existe una planta modelo, *Arabidopsis thaliana*; la mosca de la fruta (*Drosophila sp.*) y el ratón (*Mus musculus*). Lo que aprendemos de estos organismos modelo es de incalculable valor para poder enfrentar los problemas de estudio y manejo de especies de importancia aplicada. Dada la asombrosa similitud de unos organismos y otros, a nivel de sus moléculas fundamentales, los genes que se aíslan del ratón, de la mosca de la fruta, y hasta de las bacterias, nos proporcionan mucha información de nuestros propios genes, o de los del trigo y el maíz.

En las siguientes secciones se describen los diversos enfoques que se han desarrollado para estudiar los genes de los diversos organismos, y se irá viendo cómo las técnicas que ha sido necesario implementar, responden precisamente a sus diferentes niveles de complejidad.

AISLAMIENTO DE GENES POR COMPLEMENTACIÓN

Los primeros genes microbianos fueron aislados mediante el principio de la complementación. Este procedimiento se fundamenta en el trabajo previo de los genetistas que, desde mucho tiempo atrás, habían caracterizado indirectamente a los genes. El trabajo clásico en genética microbiana implicaba el aislamiento y caracterización de bacterias mutantes, es decir, variantes que se generan espontáneamente o por un tratamiento químico o físico. Por ejemplo, una bacteria mutante puede haber perdido la capacidad de alimentarse con cierta sustancia, digamos el azúcar galactosa. Esto significa que algún gene relacionado con el proceso de asimilación de la galactosa está alterado. La genética clásica operaba con la convicción de que había habido un cambio en algún lugar del cromosoma bacteriano, precisamente donde se localizaba un gene (una entidad abstracta, para el caso) que debería codificar probablemente para una enzima, que quizá era responsable de catalizar la conversión de la galactosa en otra sustancia, más adelante en la cadena de asimilación. Desde luego que mediante pruebas indirectas se llegaba a deducir una gran cantidad de información alrededor de los genes, pero nada podía compararse a la posibilidad de observar directamente la secuencia del gene de interés. ¿Qué podríamos hacer para aislar este gene? Una vez que se dispone de las técnicas de clonación molecular, el proceso es conceptualmente sencillo.

Primero se requiere crear un conjunto de clonas que contengan segmentos de un tamaño adecuado. Lo que se hace es someter una preparación del ADN total de la bacteria en cuestión (de la **cepa silvestre** que contiene el gene normal que nos interesa) a la acción de alguna enzima de restricción. La reacción se controla para generar segmentos de unos 5 a 10 mil pares de bases, cada uno capaz de contener unos cuantos genes. Esta colección de fragmentos se liga a un vector de clonación (véase el recuadro II.2) y se introduce a células de la cepa mutante (la que era incapaz de crecer en galactosa). Si colocamos algunos miles de células así transformadas en una caja con medio nutritivo (claro, donde el nutrimento sea galactosa), es probable que crezca alguna de ellas: la que recibió el segmento que contenía el gene funcional; correspondiente al gene mutante. Este gene ya no es más una entelequia. Se encuentra en un segmento pequeño, insertado en un plásmido del que se pueden preparar grandes cantidades. Este gene ha sido *aislado*, o purificado.

En los albores del ADN recombinante, aun este método directo y simple adolecía de un buen número de dificultades técnicas. Desde que se disponía de la clona con el gene de interés, hasta que se determinaba su secuencia nucleotídica, podían pasar muchos meses. Hoy día, el aislamiento y secuenciación de un gene microbiano puede ser una tarea de unas cuantas semanas.

AISLAMIENTO DE GENES USANDO ADN SINTÉTICO

Si reflexionamos un momento sobre la técnica de complementación anteriormente descrita, observaremos que se requieren dos aspectos cruciales para utilizarla: debemos poder llevar a cabo una **transformación** (introducción estable de genes) del organismo en cuestión, y debemos ser capaces de hacer depender su crecimiento de la adquisición del gene de interés. Estas condiciones no ocurren, ni con mucho, en todos los casos. De hecho, la capacidad de transformar organismos diferentes a *E. coli* ha sido desarrollada paulatinamente en los últimos 15 años y, aun cuando esto ya sea posible para muchos organismos, las dificultades que representa y los bajos rendimientos obtenidos hacen poco viable el uso generalizado de este método en el aislamiento de genes.

Se requería, diseñar otras estrategias capaces de localizar los genes. Es claro que, dado que el ADN de todos los organismos tiene la misma naturaleza química, resulta en principio igual de simple hacer un banco o colección de clonas con el ADN de uno u otro organismo. Una primera diferencia estriba en que, mientras más complejo sea el organismo, más clonas necesitaremos para representar su **genoma** o, dicho de otra manera, necesitaremos buscar en muchas más clonas para tener una buena probabilidad de encontrar un determinado gene. Una cuenta sencilla nos persuade rápidamente de las diferencias: si cada clona hecha en un vector de donación simple contiene 5 000 pares de bases, necesitaremos unas 1 000 clonas (o un poco más, por razones estadísticas) para cubrir cinco millones de pares de bases, que es el tamaño aproximado de un genoma microbiano. En cambio, para representar el genoma humano, necesitaríamos cerca de un millón de clonas. Para paliar este problema se han desarrollado vectores de clonación, que pueden incorporar cantidades mucho mayores de ADN, indispensables para el estudio de genomas más grandes (véase el capítulo siguiente).

Una vez resuelto el problema de cómo obtener un número manejable de clonas, ¿cómo hacemos para distinguir cuál de ellas (digamos entre algunos miles) contiene el gene que nos interesa? Una aproximación se apoya en varios conceptos que ya hemos descrito. En primer lugar; sabemos que las proteínas son codificadas por los genes, y que por mucho tiempo fueron más fáciles de purificar; en realidad, es muy probable que nos interese aislar los genes que codifican para las proteínas que hemos estudiado durante mucho tiempo. A partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína, se puede inferir la secuencia de ADN que la codifica (aunque de manera aproximada, dada la "degeneración" del código genético). Utilizando este conocimiento se pueden diseñar oligonucleótidos sintéticos cuya secuencia sea complementaria al gene correspondiente. Aquí entra en juego la asombrosa capacidad de asociación específica de las moléculas de ADN (descrita en el capítulo I, "Ácidos nucleicos"). Así que, en principio, utilizando un pequeño segmento de ADN sintético (digamos de unas 20 bases), podríamos hacerlo hibridar con nuestro conjunto de clonas y detectar su asociación específica con el gene que codifica para la proteína de la cual inferimos su secuencia (véase el recuadro III.1).

RECUADRO III.1. Aislamiento de genes usando oligonucleótidos sintéticos

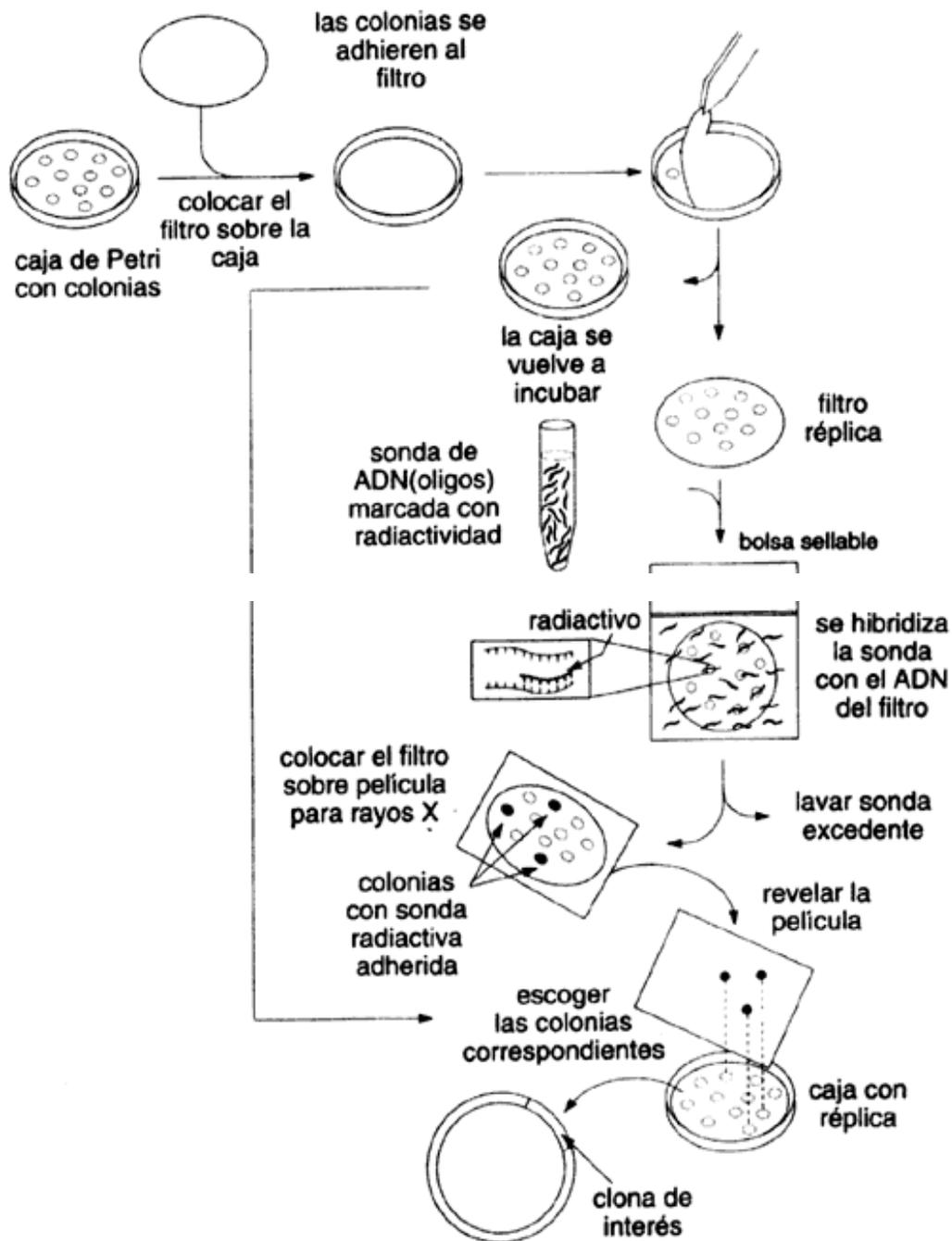
Así como existen procedimientos para secuenciar el ADN, también los hay para secuenciar proteínas. Los métodos, que no describiremos en este libro, fueron desarrollados mucho antes que los aplicados al ADN. ¡Nada menos que por Frederic Sanger! Por este trabajo obtuvo un primer Premio Nobel de química en 1958.

A partir de la secuencia de aminoácidos de una proteína, podemos deducir la secuencia del ADN que la codifica, utilizando el código genético (en realidad, sólo de manera imperfecta, debido a que un mismo aminoácido puede ser codificado por más de un *tripleto* o *codón*). En todo caso, en ciertas regiones favorables se puede esperar que la secuencia deducida corresponda muy cercanamente a la original.

Si se sintetiza un oligo con esta secuencia y se marca radiactivamente, tenemos una sonda o detector que mediante una hibridización (véase en el capítulo I, "Ácidos nucleicos") nos permite detectar su secuencia complementaria. Cuando se emplea esta sonda, se puede analizar el contenido de las células de las colonias derivadas de una genoteca (véase en el capítulo II, "Concepto de clonación molecular").

Este enfoque es general, dado que a partir de una secuencia de ADN particular se pueden encontrar secuencias asociadas a ésta, sea porque se le parecen mucho o porque son contiguas o se le traslapan. Por ejemplo, se puede diseñar una sonda con base en la secuencia de un gene de rata para intentar detectar un gene humano.

También se puede utilizar una sonda cuya secuencia corresponde al extremo de un fragmento donado para detectar otras clonas que tengan esa misma secuencia, pero que se extiendan mas allá de la clona original.



Esto se ha logrado para un gran número de genes.

En la actualidad, el uso de oligonucleótidos sintéticos se ha hecho muy complejo. Muchos genes se aíslan utilizando variantes de la técnica básica mencionada. La acumulación de datos sobre secuencia de genes de diversos organismos (véase el capítulo siguiente) permite utilizar un determinado gene de rata para aislar el gene correspondiente humano. En efecto, en muchos casos los genes de especies cercanas, por ejemplo mamíferos, son suficientemente parecidos para hibridar mutuamente, aunque de manera imperfecta. Asimismo, el empleo de la *reacción en cadena de polimerasa* permite, en muchos casos, obviar inclusive el paso de obtener una biblioteca de genes. ¡Los genes pueden aislarse, en ocasiones, simplemente amplificándolos directamente a partir de una muestra mínima de material biológico!

ASLAMIENTO DE GENES UTILIZANDO ANTICUERPOS

Hemos descrito ya dos métodos para aislar genes. Quedan todavía muchos casos en los que las condiciones no

son favorables para utilizarlos. Por ejemplo, hay ocasiones en las que la proteína cuyo gene correspondiente queremos aislar no se puede purificar en gran cantidad. Además, los métodos para determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína son bastante laboriosos. Afortunadamente, el sistema inmunológico nos permite utilizar otro fenómeno de reconocimiento molecular para localizar genes interesantes.

Desde hace muchos años, los investigadores del campo de la inmunología han utilizado animales de laboratorio para obtener anticuerpos específicos contra sustancias de interés. Las proteínas, en particular; cuando son extrañas a un animal, inducen en éste la producción de anticuerpos. Estas moléculas son, a su vez, proteínas con características muy interesantes (véase el capítulo siguiente). Baste decir; por el momento, que los anticuerpos pueden ser usados como reactivos que reconocen, en medio de mezclas complejas, las sustancias específicas que indujeron su producción. Imaginemos que inyectamos una proteína de interés en un conejo. A partir del suero sanguíneo de este conejo podemos obtener anticuerpos dirigidos contra dicha proteína. Ahora podemos utilizar estos anticuerpos, de manera análoga a como se usaron los oligonucleótidos, para detectar en nuestro banco de donas aquella que contenga el gene que codifica para la proteína de interés.

En este punto quizá algún lector haya detectado un pequeño problema: el ADN de todos los organismos es similar, pero la manera como éste se expresa para formar proteínas específicas debe ser muy diferente; de hecho, de la diferencia del control de la expresión de los genes deriva en gran parte la diferencia entre unos organismos y otros. En efecto, la biblioteca genómica que requerimos utilizar para hacer una "inmunobúsqueda", tiene que ser una biblioteca de expresión, es decir, una en la que la donación de los genes se realice de tal manera que haya señales propias de la célula recipiente (normalmente *E.coli*), que induzcan la *transcripción* y la *traducción* del segmento de ADN clonado.

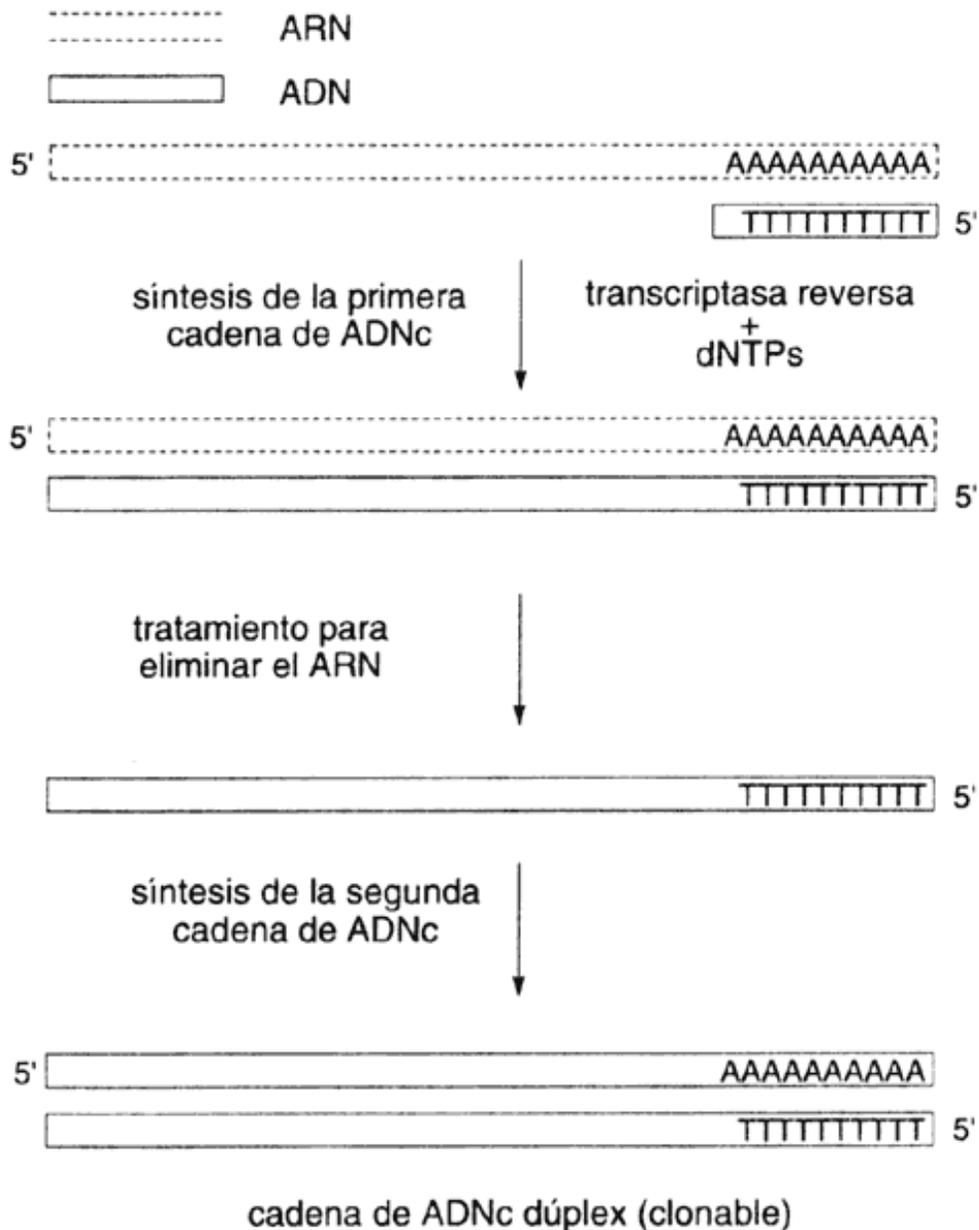
AISLAMIENTO DE GENES UTILIZANDO SUS ARN MENSAJEROS

Llevamos tres métodos descritos para el aislamiento de genes. En principio, estas técnicas podrían ser usadas para obtener incluso genes humanos (o para el caso, de cualquier otro organismo superior). Nuevamente, las cosas son más complicadas de lo que parecen.

A finales de los años setenta, los trabajos pioneros de Phillip Sharp y Richard Roberts sorprendieron a la comunidad científica con un asombroso descubrimiento. Para describir en qué consistió lo insólito del descubrimiento, antes necesitamos explicar ciertas características de estos experimentos, que ilustran algunos de los métodos más útiles para aislar genes de organismos complejos. Sharp y Roberts estaban a la caza de un gene de un vertebrado, que codifica para la ovoalbúmina, la proteína más abundante del huevo de gallina. Establecer como meta inicial un gene como éste tiene una importante razón de ser: un gene cuyo producto es el mayoritario en un determinado tejido vivo resulta más fácil de aislar. Esto se debe a que en el tejido respectivo se encuentran abundantes copias del gene en forma de ARN mensajero (véase el recuadro I.2). De hecho, si se purifica ARN mensajero del oviducto de gallina, la mayor parte de esta preparación estará constituida por el mensajero que codifica para la ovoalbúmina. Surge sin embargo un problema: las técnicas de clonación reclaman la disponibilidad de ADN, no de ARN, para poder replicar y mantener moléculas recombinantes. Se hace necesario entonces utilizar un procedimiento que convierta la información de ARN a ADN. Es decir, que copie una hebra de ARN y la "transcriba", de manera reversa hacia ADN. Esto es, en principio, posible: la información (codificada en la secuencia) esta en la molécula de ARN. Lo que se requiere es una enzima que realice la copia, pero que acepte como molde al ARN, y como **nucleótidos** para incorporar a los del ADN. Tal enzima existe en la naturaleza: en los retrovirus (variedad a la que pertenece el virus del SIDA: véase el capítulo siguiente). Usando una preparación que contenga esta enzima, la *transcriptasa reversa*, sobre el ARN, se obtiene el llamado ADNc, o ADN complementario. El ADNc puede ser clonado igual que cualquier otro ADN. En el recuadro III.2 se ilustra el proceso de preparación de ADNc.

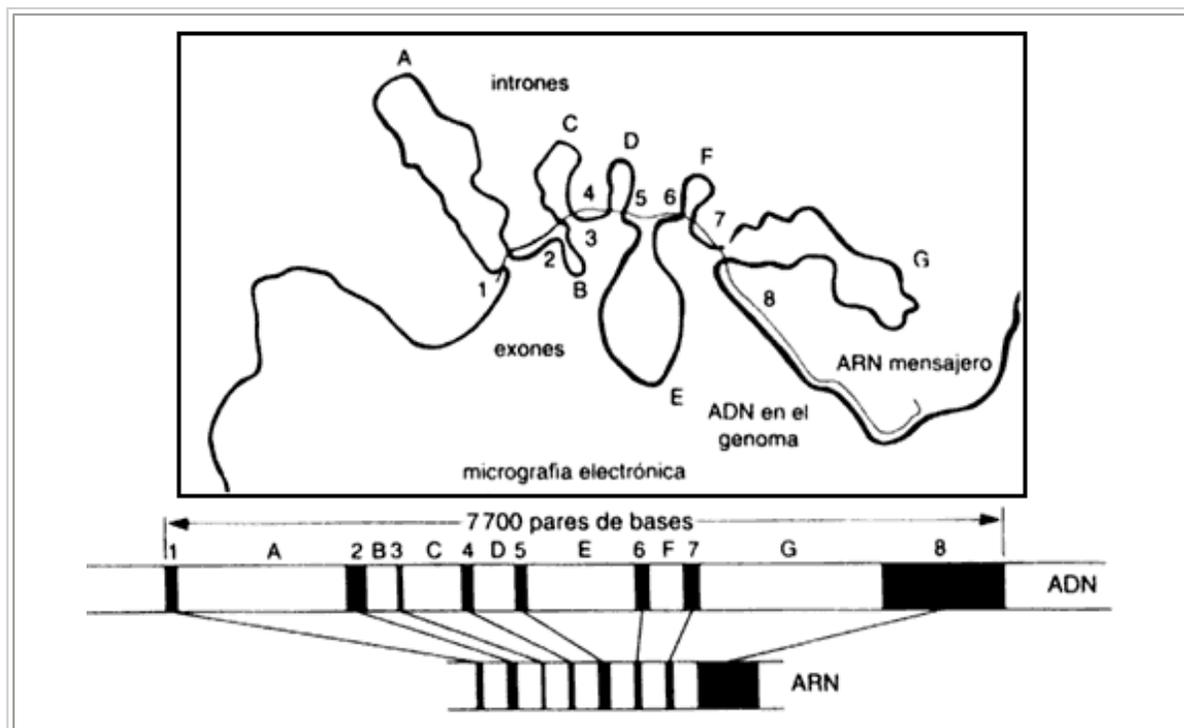
RECUADRO III.2. Obtención del ADN complementario

El procedimiento que permite obtener ADN a partir de ARN es de extrema utilidad. La información que se encuentra en forma de ARN mensajero es de una complejidad mucho menor a la que se encuentra en el ADN de los cromosomas. El proceso de transcripción (véase el recuadro I.2) convierte únicamente una pequeña fracción de la información en ARN, y esta fracción expresada corresponde a los genes que son relevantes para la función celular específica del tejido de donde se obtiene el ARN mensajero. Las técnicas de ADN recombinante no proveen, sin embargo, la capacidad de donar ARN directamente. Se emplea por lo tanto una técnica que utiliza una serie de reacciones enzimáticas, *in vitro*, para convertir el ARN mensajero en ADN de doble cadena, listo para ser donado. El principal componente para lograr este procedimiento es la enzima llamada *transcriptasa reversa*. Esta enzima es capaz de copiar un molde de ARN para fabricar ADN, agregando las bases complementarias una por una, en un proceso similar a la **replicación**. Normalmente lo que se desea es copiar sólo el ARN mensajero, el cual, a su vez se encuentra en la célula seguido de una cola de adeninas. Por esto, se agrega un pequeño segmento de ADN constituido por varias timinas, y se logra así un inicio o cebado de la cadena, específico sobre los mensajeros. Un tratamiento alcalino o enzimático permite eliminar el ARN que sirvió como molde original y se forma luego una segunda hebra de ADN, con lo que se completa la copia clonable.



cadena de ADNc dúplex (clonable)

Ahora sí, estamos en condiciones de describir la sorpresa encontrada por Sharp y Roberts. En efecto, ellos pudieron localizar clonas que contenían ADN, complementario al mensajero de ovoalbúmina. Una vez disponiendo de este material, pudieron utilizar la propiedad de hibridización de los ácidos nucleicos para rastrear el gene original a partir de ADN, aislado directamente de los cromosomas. Al comparar las donas de ADNc y de ADN genómico se observó que éstas no coincidían exactamente. ¡El ADN genómico contenía segmentos adicionales de ADN, al interior del gene! Estos segmentos se denominaron **intrones** (véase la figura III.1), y subsecuentemente fueron encontrados en casi todos los genes de organismos **eucariontes**. Este descubrimiento se adicionó a otro concepto ya firmemente establecido por investigaciones anteriores: el **genoma** de organismos superiores contiene mucho más ADN que el necesario para codificar las proteínas indispensables para la función celular. De hecho, hasta el 95% del ADN de organismos superiores está constituido por secuencias sin función aparente (véase el capítulo siguiente).



Podemos comprender entonces que la complejidad de un **genoma** del ser humano es mucho mayor que la de una bacteria o de una levadura. Aislar genes humanos se parece mucho más a buscar una aguja en un pajar. Es por ello que se han desarrollado muy diversos y complejos métodos, cuya descripción rebasa los propósitos de este libro, para lograr este objetivo. Claramente, el método del ADNc permite acceder a cualquier gene que se exprese abundantemente en algún tejido en particular. El tamaño de una colección representativa de clonas de ADNc será siempre mucho menor que el de una colección de clonas derivada directamente del **genoma**.

En este punto quizá nos preguntemos: ¿algunos de los genes más interesantes e importantes no podrían ser de los que se expresan en pequeñas cantidades? La respuesta es rotundamente sí, pero aun este tipo de genes se han ido rindiendo a la tenacidad e imaginación de los investigadores. Un ejemplo muy interesante para ilustrar la cacería de un gene difícil es el caso de aquel cuyo defecto es responsable de la enfermedad llamada *fibrosis quística*, descrito en la siguiente sección.

AISLAMIENTO DE GENES RESPONSABLES DE ENFERMEDADES HEREDITARIAS

Quizá la mayoría de nosotros relacionamos el concepto de genética con atributos específicos de personas, animales o plantas, observables directamente. La herencia es evidente en el parecido de los hijos con sus padres, el color de los ojos, cierta marca de la piel, etc. De igual manera, existe un gran número de problemas de salud donde el componente hereditario es muy claro. La presencia de individuos enfermos se correlaciona de manera muy precisa, inclusive predecible, con determinadas familias. Es posible que muchos de nosotros identifiquemos como enfermedades hereditarias algunas de las más conocidas: la hemofilia, la enfermedad de Huntington, la anemia falciforme, la fenilcetonuria o la fibrosis quística. Muchas de las enfermedades hereditarias más conocidas pueden ser causadas por el defecto de un solo gene. Aunque las técnicas clásicas de la genética humana podrían haber establecido este hecho, la posibilidad de identificar el gene preciso, su producto proteico, y la lesión causante de la enfermedad, constituyen formidables retos que solo ha sido posible conquistar a partir del surgimiento del ADN recombinante. A la fecha se han identificado las funciones metabólicas defectuosas (es decir, la alteración de la actividad de alguna enzima) para unos 600 de los 3 500 defectos monogénicos descritos. De muchas de estas enfermedades ya se ha logrado aislar el gene responsable utilizando diversas técnicas, incluyendo las antes descritas. En esta sección explicaremos de manera más precisa lo que se requirió para obtener el gene responsable de la fibrosis quística.

Esta enfermedad ha sido claramente detallada desde hace más de 60 años. Su manifestación clínica consiste en la producción de sudor muy salado, aunado a deficiencias respiratorias y digestivas. Esta enfermedad se encuentra con bastante frecuencia en ciertas poblaciones humanas, por ejemplo del norte de Europa o entre los estadounidenses de raza negra. Se manifiesta como de *caracter autosomal recesivo*, lo que quiere decir que afecta por igual a hombres y mujeres, y que se requiere tener los dos genes defectuosos (el paterno y el materno) para que ocurra la enfermedad. En las poblaciones afectadas se puede presentar en uno de cada 25 mil recién nacidos. ¡El gene defectuoso llega a estar en uno de cada 25 individuos! De manera similar al caso de muchas otras enfermedades, el tratamiento de la fibrosis quística consiste en paliar; en la medida de lo posible, la problemática asociada. Así, mediante un cuidadoso seguimiento de la dieta, la exploración del tórax, y otras medidas, se ha podido elevar la calidad de vida de los enfermos. Es claro, sin embargo, que para poder atacar mejor la enfermedad sería extremadamente útil conocer su causa última, a nivel molecular. Disponer del gene permitiría, además, identificar fácilmente a los portadores asintomáticos, es decir; a los que tienen sólo un gene defectuoso (en el capítulo V se hace una descripción sobre el diagnóstico genético).

Para el caso de otras enfermedades hereditarias, se ha podido recurrir al conocimiento de la función precisa afectada y así identificar sistemas que expresan abundantemente el gene en cuestión, inclusive en otros animales. A partir de estos sistemas es posible obtener ADNc y, eventualmente, aislar el gene. Desafortunadamente, en el caso de la fibrosis quística no existía ninguna forma de enriquecer el ARN mensajero correspondiente: no se había logrado identificar la función metabólica afectada. Un numeroso conjunto de investigadores en varios países se dieron a la tarea de aislar el gene mediante la técnica de clonación posicional. El primer paso en esta técnica requiere un análisis de asociación entre marcadores genéticos previamente establecidos y el gene defectuoso. El trabajo acumulado de muchos años ha permitido construir un mapa más o menos grueso de diversas marcas, existentes en los cromosomas humanos. Estos mapas se han ido refinando y complicando al utilizar técnicas de ADN recombinante y forman una importante base para los esfuerzos que desembocarán finalmente en la secuenciación completa del genoma humano (véase el capítulo V). Mientras este objetivo no se haya logrado, se requiere utilizar la información fragmentaria disponible para identificar genes específicos de gran interés. El análisis de asociación se lleva a cabo utilizando muestras de ADN de numerosos pacientes afectados por la fibrosis quística, así como de sus familiares. Se puede inferir que aquellos marcadores que se heredan simultáneamente con la fibrosis quística están asociados físicamente con ésta (es decir; en el mismo cromosoma y cerca del gene). Esta asociación física indicó que el gene de la fibrosis quística se encontraba en el brazo largo del cromosoma 7, entre los marcadores denominados MET y D7S8. La tenaz y laboriosa búsqueda de varios años empezaba a rendir frutos. La aguja ya no se encontraba en un pajar; sólo en una carretilla de paja: ¡los marcadores identificaban un segmento de cromosoma de alrededor de un millón y medio de pares de bases. Este segmento tiene menos del 1% de la longitud del cromosoma 7, pero todavía es demasiado largo; en él caben muchos genes y mucho ADN espaciador (podemos notar que un segmento de este tamaño es equivalente a un tercio del genoma de una bacteria como *E.coli*). En pasos subsiguientes se identificaron sistemáticamente clonas pertenecientes a esta región del cromosoma 7. Mediante ingeniosas técnicas denominadas *saltos* y *caminados cromosomales*, después de varios meses de intenso trabajo se logró identificar el gene. En el proceso también fue necesario emplear ADN de bovino, ratones, cuyos y pollos, donde se infería, con base en criterios evolutivos, que debía existir un gene similar, pero

no sus secuencias adyacentes. Finalmente, se solidificó la inferencia de que el gene identificado era el que se buscaba al localizar una clona de ADNc, obtenida de glándulas sudoríparas, que hibridizaba con la región definida mediante el análisis posicional. El gene de la fibrosis quística se encuentra distribuido en 250,000 pares de bases, constituido por 24 exones y codifica para una proteína de 1480 aminoácidos.

Esta notable muestra de la investigación genética molecular moderna nos permitió ejemplificar los procedimientos desarrollados para lograr el aislamiento de genes particularmente elusivos. En capítulos subsiguientes describiremos algunas de las muchas cosas que pueden hacerse cuando se dispone de genes aislados, incluyendo los nuevos conocimientos y alternativas posibles para la terapia de la fibrosis quística.



IV. LAS REVELACIONES DE LA MOLÉCULA MAESTRA

Consecuencias de la revolución metodológica en la adquisición de conocimiento.

EN LAS secciones anteriores he intentado proveer al lector de un marco conceptual adecuado para comprender de una manera más precisa las múltiples aplicaciones del ADN recombinante. Quizá con el material proporcionado hasta el momento se pueda tener una noción de la potencialidad extraordinaria de esta metodología. Este capítulo y el siguiente estarán orientados a describir algunas de las áreas en las que las aplicaciones del ADN recombinante han tenido influencia. Trataré de concentrarme en aquellas que resultan más evidentes, interesantes o potencialmente importantes por su magnitud en nuestra concepción del mundo o en nuestra forma de vida. Quisiera hacer incapié en que esta relación de aplicaciones es, por necesidad, extremadamente limitada: la ingeniería genética ha influido virtualmente en todo el espectro de la investigación biológica experimental.

Recuerdo haber leído una aseveración hecha por un científico unos pocos años después de que se iniciara la epidemia mundial del SIDA, quien afirmaba que si esta enfermedad hubiera hecho su aparición antes del surgimiento del ADN recombinante, seguiríamos buscando su causa debajo de las piedras.

A riesgo de ser repetitivo, quisiera también hacer comentarios acerca de mi perspectiva personal sobre la importancia del ADN recombinante. Mi experiencia en el campo de la investigación científica se inició a finales de la década de los setenta. En esos años la ingeniería genética estaba en su infancia, y se empezaba a establecer en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Cuando reparo en una serie de aspectos relativos al quehacer científico tal como eran hace 15 años, y los comparo con la situación actual, no ceso de sorprenderme. Cuando reviso (como una de mis actividades semanales) el cúmulo de conocimientos que aparece en la literatura científica, ésta es comparable a un verdadero alud. Los resultados que se reportan en un solo artículo habrían requerido de varios años de trabajo hace una década. Me parece que un cálculo conservador podría indicar que la velocidad a la que se pueden desarrollar nuevos conocimientos en biología experimental es unas 10 veces mayor de la requerida en el momento que inicié mi trabajo como científico. Estamos en un punto en el que quizá la limitante empieza a ser la capacidad de la comunidad científica para asimilar e integrar los conocimientos generados. Es posible, también, que estemos cercanos al punto en el que la velocidad de crecimiento en la acumulación de conocimientos empiece a disminuir por razones económicas: ¿se requerirá destinar una proporción excesiva de recursos humanos y materiales para sostener el paso que llevamos actualmente!

Tomemos algunas muestras de los avances que hago mención.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL GENE

El inicio del estudio sobre la naturaleza de los genes se ocurre, naturalmente, en algunos de los organismos más simples como las bacterias. En términos generales, el estudio de todo tipo de microorganismos se ha convertido en una actividad con múltiples facetas. La experimentación tiene hoy, gracias al ADN recombinante, dimensiones completamente nuevas.

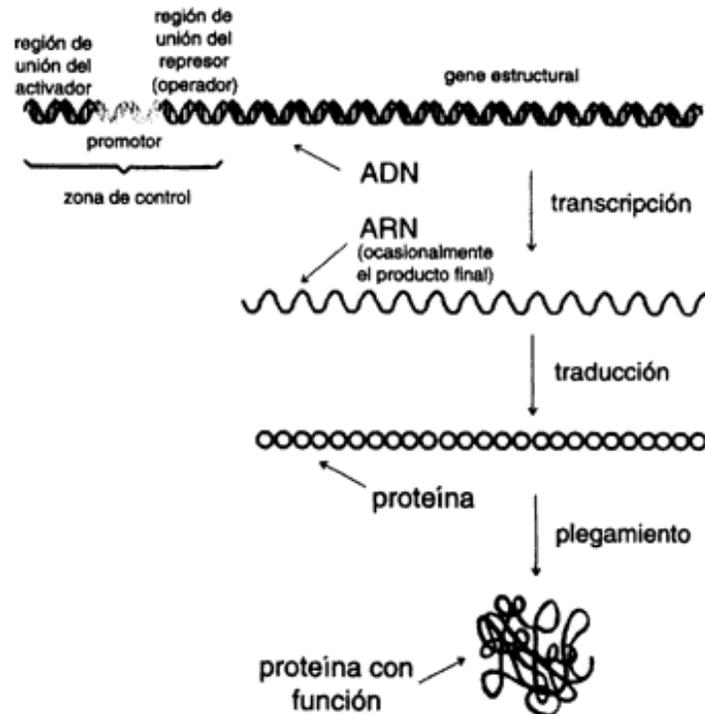
Una vez aislado e identificado un gene, podemos alterarlo y reintroducirlo a la célula bacteriana para observar las consecuencias de la alteración. Desde los albores de esa era de la ingeniería genética, al final de los años setenta, se empezaron a acumular datos acerca de genes microbianos, y la estructura y función del gene se fue clarificando y cobrando detalles (recuadro IV.I).

RECUADRO IV. 1. *El gene y sus partes*

Como se describió en recuadro I.2. los genes no son más que segmentos de moléculas de ADN.

Desde mediados de este siglo, el genetista francés Jacques Monod propuso lo que sería la estructura básica de un gene, idea basada en observaciones macroscópicas de fenómenos hereditarios en las bacterias. El ADN recombinante ha permitido dar un contenido concreto y detallado a las visionarias propuestas de Monod.

Un gene está constituido por diversas partes o secuencias, generalmente contiguas, dentro de una molécula de ADN, que constan de una región regulatoria, las cuales establecen cuándo y en qué cantidad se expresará el gene. Después se encuentra el gene estructural que está formado por la secuencia que, al traducirse, determina la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Al fin hay señales, también constituidas por secuencias de ADN que determinan el término del proceso de transcripción, evitando que continúe hacia otros genes que se encuentran más adelante. Todas estas señales son "leídas" y decodificadas por interacciones establecidas por proteínas específicas.



Por ejemplo, para ilustrar el análisis de la regulación de un gene, tomemos un experimento simple. Supongamos que queremos saber en qué condiciones se activa la expresión de un conjunto de genes que participan en la respuesta al calor de una bacteria. Estos genes pueden formar parte de un complejo circuito, y sería difícil seguir la actividad de cada uno por medio de su función natural. En cambio, lo que podemos hacer gracias al ADN recombinante es construir un gene mixto por cada gene que deseamos estudiar asociando a la región regulatoria otro gene estructural que sí sea fácil de seguir. Esto es lo que llamamos un gene reportero. Por ejemplo, podemos usar un gene que codifique para una enzima que actúe en un sustrato sin color y que al combinarse lo convierta en

un producto colorido. De hecho actualmente se dispone de varios genes reporteros con las características antes descritas. El gene de la β -galactosidasa, uno de los genes caracterizados en las épocas pioneras de la biología molecular; ha sido utilizado con este propósito. (Curiosamente esta misma enzima, la β -galactosidasa, es responsable de que los seres humanos digiramos la lactosa de la leche, y al desactivarse su expresión, en muchos adultos se desarrolle la intolerancia a la leche.) Pues bien, si introducimos a la célula bacteriana un gene quimérico o mixto, cuya región regulatoria está relacionada con la respuesta al calor, y la región estructural codifica para la β -galactosidasa, observaremos la respuesta que normalmente tendría el gene de interés, simplemente advirtiendo el cambio de color de las colonias transformadas.

Por medio de estudios en los que se alteran varias partes de los genes y se prueban en diversas condiciones, existe hoy día una idea extremadamente elaborada acerca de las formas como se regulan los genes que intervienen en todo tipo de procesos. Sin embargo, distamos mucho de haber comprendido satisfactoriamente, incluso los procesos de regulación más simples.

INMUNOLOGÍA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Algunos de los fenómenos biológicos que resultan más familiares son los que se manifiestan en el curso de las enfermedades infecciosas. En este tipo de situaciones se observan interacciones entre el agente infeccioso y el enfermo que se han podido comprender bien en el nivel molecular. La descripción de algunos aspectos básicos sobre el funcionamiento del sistema inmunológico, así como de lo que entendemos acerca de ciertos mecanismos de patogenicidad puede ilustrar muy bien el papel que desempeñan las moléculas biológicas en ellos y cómo se ha podido enfocar su estudio mediante el uso del ADN recombinante.

Los anticuerpos y cómo se producen

Cuando una sustancia extraña invade el organismo se desencadena una serie de reacciones de defensa, fundamentalmente para establecer que esa sustancia no es propia. Uno de los principales componentes de este sistema lo constituyen los *anticuerpos*, que se unen y "marcan" la sustancia extraña para su posterior destrucción. Estas sustancias son (quizá el lector lo recuerde) proteínas. Los anticuerpos llamaron la atención de los científicos desde hace muchas décadas. El acceso a ellas había sido relativamente fácil, dado que son abundantes en la sangre. Los primeros experimentos de separación de los componentes de la sangre revelaban varias manchas numerosas en el patrón electroforético (véase en el capítulo 1, "Separación y análisis de las proteínas",), las cuales se denominaron *globulinas*. Una de ellas, la que correspondía a lo que se llamó α -*globulinas*, agrupaba los anticuerpos hoy nombrados *inmuno-globulinas G*. Muy pronto, después de que se identificó que estas sustancias eran los anticuerpos, los inmunólogos se preguntaban cómo era posible que el organismo fuera capaz de generar tal multitud de proteínas, como para ser capaces de reconocer cualquier sustancia extraña que nos invadiera. Más aún, ciertas células cancerosas, llamadas *mielomas*, se pueden obtener en gran cantidad, y su análisis reveló que cada una de ellas producía uno, y sólo un tipo de anticuerpo. Por el dogma central de la biología molecular se infería que cada anticuerpo era el producto de un gene y esto hacía surgir una paradoja: dados los millones de anticuerpos diferentes que se sabía que existían en un organismo dado, ¿los genes que codifican para ellos deberían ocupar todo el **genoma** del organismo! Diversas hipótesis fueron avanzadas para explicar lo que sucedía. Como es frecuente, hubo alguien que intuyó la respuesta correcta: los inmunólogos Dreyer y Benett propusieron una osada hipótesis en 1965. Dado que se sabía que los diversos anticuerpos eran muy parecidos entre sí y sólo diferían en una pequeña parte de su secuencia, ellos pensaron que lo que podría estar ocurriendo es que existiera sólo un gene para la parte constante y muchos genes para las pequeñas partes variables. Esta hipótesis significa que el **genoma** tendría que reorganizarse para poder generar los genes maduros, que codificarían para el anticuerpo particular que una célula dada expresaba. Esta hipótesis fue muy mal recibida porque se pensaba que el arreglo del genoma era muy estable.

La respuesta a esta interrogante sólo surgió una vez que se dispuso de las técnicas de ADN recombinante. Entonces fue posible realizar una serie de experimentos, que le hicieron ganar a Susumu Tonegawa el Premio Nobel de fisiología o medicina otorgado en 1987, en los que se demostró el funcionamiento de uno de los procesos más complejos de la evolución biológica. En su demostración, Tonegawa y sus colaboradores utilizaron la propiedad de hibridación de ácidos nucleicos para mostrar que el ARN mensajero purificado de un mieloma es capaz de asociarse a un solo pedazo de ADN obtenido del mieloma, pero se une a dos pedazos de ADN proveniente de cualquier otra célula. En efecto, el ADN estaba realizando un reacomodo para los genes de las inmunoglobulinas. El trabajo sucesivo de Tonegawa, y muchos otros investigadores, estableció lo que hoy

conocemos con bastante precisión respecto a la biosíntesis de los anticuerpos (véase el recuadro IV.2). En este proceso el organismo genera un variadísimo repertorio de anticuerpos, a ciegas, de una manera muy eficiente, para después hacer proliferar sólo a las células que son capaces de manufacturar el anticuerpo útil en un momento dado, es decir, cuando se presenta el **antígeno**, o sustancia extraña.

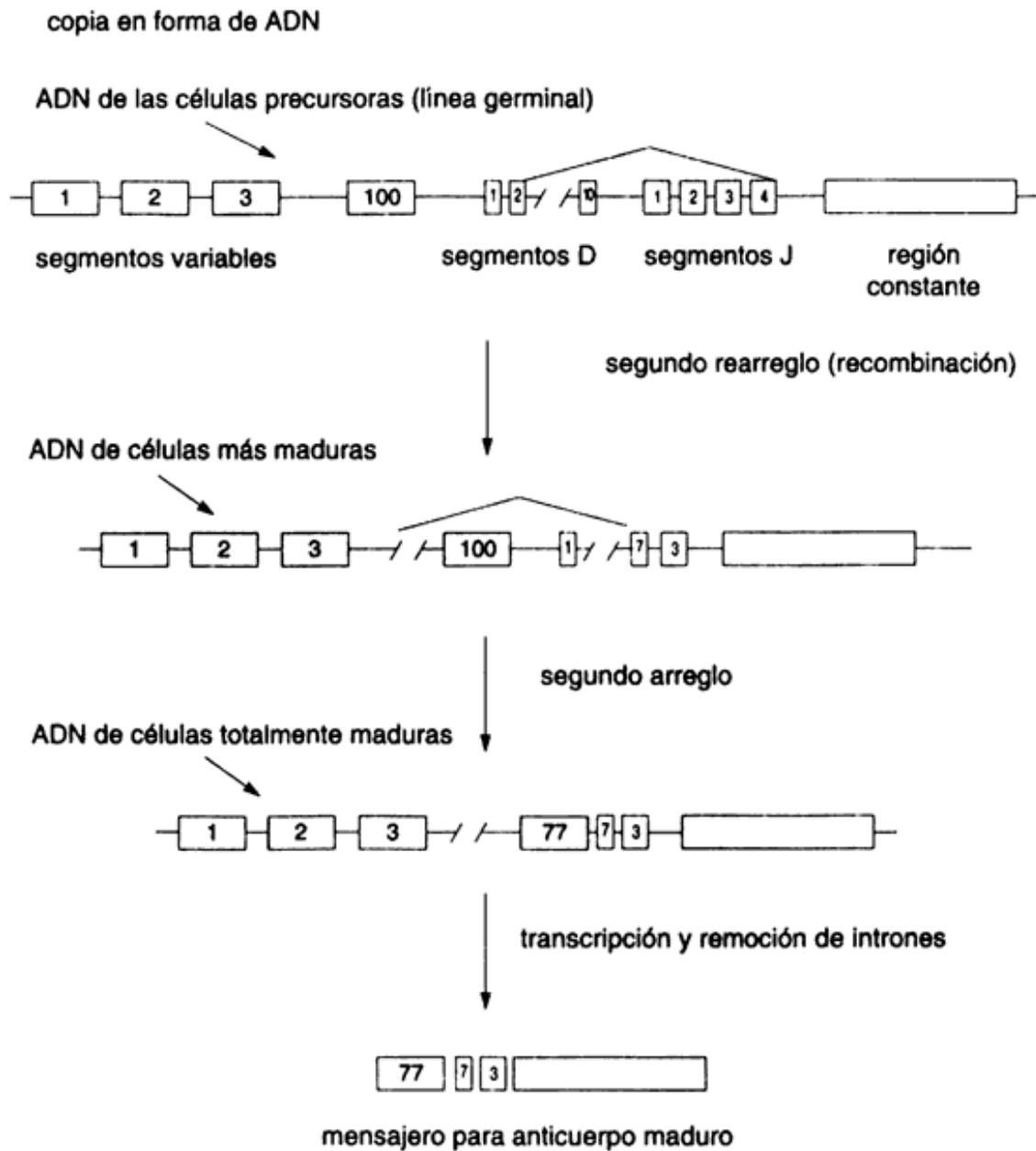
RECUADRO IV.2. *Proceso de la generación de anticuerpos*

El proceso realizado dentro de los linfocitos (glóbulos blancos de la sangre) para la producción de anticuerpos, constituye un mecanismo muy interesante que permite crear una gran variabilidad, potencialmente capaz de reconocer cualquier cuerpo extraño que se introduzca al organismo. Esta variabilidad resulta, según lo demostraron las investigaciones de Susumu Tonegawa, de la recombinación o rearme de los genes que corresponden o codifican a los anticuerpos. En la línea germinal, es decir en las células precursoras de los linfocitos, se encuentran una región constante y algunos cientos de regiones variables, estas últimas incluso a varios miles de pares de bases de distancia.

Durante la maduración de las células se recombina el segmento de cromosoma que contiene estos genes, eliminando el ADN que se encuentra entre la región constante y una de las regiones variables. Dado que existen una cadena pesada y una cadena ligera en cada anticuerpo, del mero hecho de la recombinación se pueden obtener varios miles de combinaciones (esto es, más o menos 50 por 100, o sea unas 5 mil posibilidades). Sin embargo, la unión de la región variable y la constante no es perfecta, por lo que en este punto se introduce todavía más variabilidad. Esto último ocurre al nivel de las regiones denominadas J y D, que a su vez proveen nuevas combinaciones.

Finalmente, los procesos llamados de variación somática dan origen a una ulterior variación, que ajusta y afina la capacidad de unión del anticuerpo que se fabrica en cada linfocito en particular.

La maduración de los linfocitos ocurre de manera independiente ante la presencia del antígeno o sustancia extraña. En la sangre circula un gran número de linfocitos, cada uno capaz de fabricar un anticuerpo diferente. Cuando se presenta el antígeno correspondiente, el linfocito prolifera y se convierte en una fábrica del anticuerpo específico producido por su gene rearmado. Este mecanismo se conoce como variación-selección, y se contrapone al mecanismo alternativo de "instrucción", en el que se suponía que el antígeno dirigía la forma del anticuerpo.



En los últimos 15 años se ha acumulado una enorme cantidad de información acerca del funcionamiento del sistema inmunológico. No sólo conocemos la secuencia de **aminoácidos** de miles de diferentes anticuerpos y de sus genes, sino que se han identificado un sinnúmero de factores adicionales que modulan la compleja serie de interacciones que ocurre en una respuesta inmune. Este conocimiento ha servido como base para el uso de anticuerpos en la terapéutica del futuro inmediato, así como para crear una base firme en el diseño de nuevas vacunas (véase el capítulo siguiente).

Estudio de agentes infecciosos

Quién no recuerda haber oído hablar de las épocas pioneras en que Luis Pasteur y los otros cazadores de microbios rompieron moldes demostrando la existencia de microorganismos, que eran los responsables de la putrefacción y de muchas enfermedades. Efectivamente, la microbiología es un gran pilar de la investigación biológica experimental, y como ya mencionamos, sentó incluso las bases de la genética molecular. El avance de estas investigaciones, sin embargo, no escapó a los límites de la metodología disponible, encontrándose con obstáculos difíciles de sortear hasta el surgimiento del ADN recombinante.

Pensemos, por ejemplo, en lo complicado que resulta trabajar con una bacteria o un virus patógeno. Se requiere cultivarlo en grandes cantidades, lo que entraña un gran riesgo para el experimentador. Además, muchos organismos patógenos sólo se reproducen en condiciones muy especiales, como en el interior de su organismo hospedero. La posibilidad de donar sus genes abre, sin embargo, innumerables de posibilidades.

Los agentes infecciosos están siendo estudiados activamente desde diversos ángulos. Los genes responsables de la patogenicidad de muchas bacterias han sido aislados y secuenciados; se han podido comparar los genes de cepas patógenas con los de cepas no patógenas; se han identificado, a nivel fino, los componentes de la superficie de agentes infecciosos que les permiten evadir la respuesta inmune... En fin, la lista podría seguir por varias páginas.

Tomemos, por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que produce el SIDA. El cual sólo se encuentra en ciertas células de la sangre: una clase particular de linfocitos (glóbulos blancos) del tipo T. De un enfermo sólo se pueden aislar cantidades minúsculas del virus. Sin embargo, gracias a la ingeniería genética, a sólo unos pocos años de haber sido identificada la enfermedad, se han hecho grandes avances. La inmensa mayoría de los estudios que se han realizado alrededor de este virus emplean ADN recombinante, y han generado un vasto conjunto de conocimientos, que han permitido su diagnóstico y sentado las bases para lograr su prevención y tratamiento. Aun cuando dicho tratamiento no es todavía una realidad, todo parece indicar que el control de esta enfermedad se logrará en un tiempo récord, particularmente si se toma en cuenta lo increíblemente difícil de conocer y atacar, y lo elusivo que resulta ser el virus que la causa.

Específicamente, a pesar de que el virus del SIDA sólo se encuentra en pequeñas cantidades dentro de las células de enfermos humanos (es decir que no se puede cultivar), desde hace varios años se conoce la secuencia completa de su **genoma** de 9200 bases. Asimismo, se han identificado todos y cada uno de los genes que lo constituyen y les han asignado funciones a la mayoría de ellos. Su ciclo de vida ha sido disecado en sus aspectos fundamentales, haciendo referencia a otros virus similares (de la familia de los retrovirus, que pueden causar cáncer). Se conoce cómo el virus, después de introducirse a las células, copia su genoma de ARN lo convierte en ADN, y lo incorpora o integra al ADN de la célula humana. Desde ahí expresa sus genes, de lo que resulta la producción de más virus y su salida de la célula, listos para atacar otras células (véase el recuadro IV.3).

La utilidad de este tipo de conocimientos para lograr el control del SIDA y de otras enfermedades se ilustrará al abordar la aplicación de la biotecnología en el campo de la salud, en el capítulo siguiente y, nuevamente, en el VI.

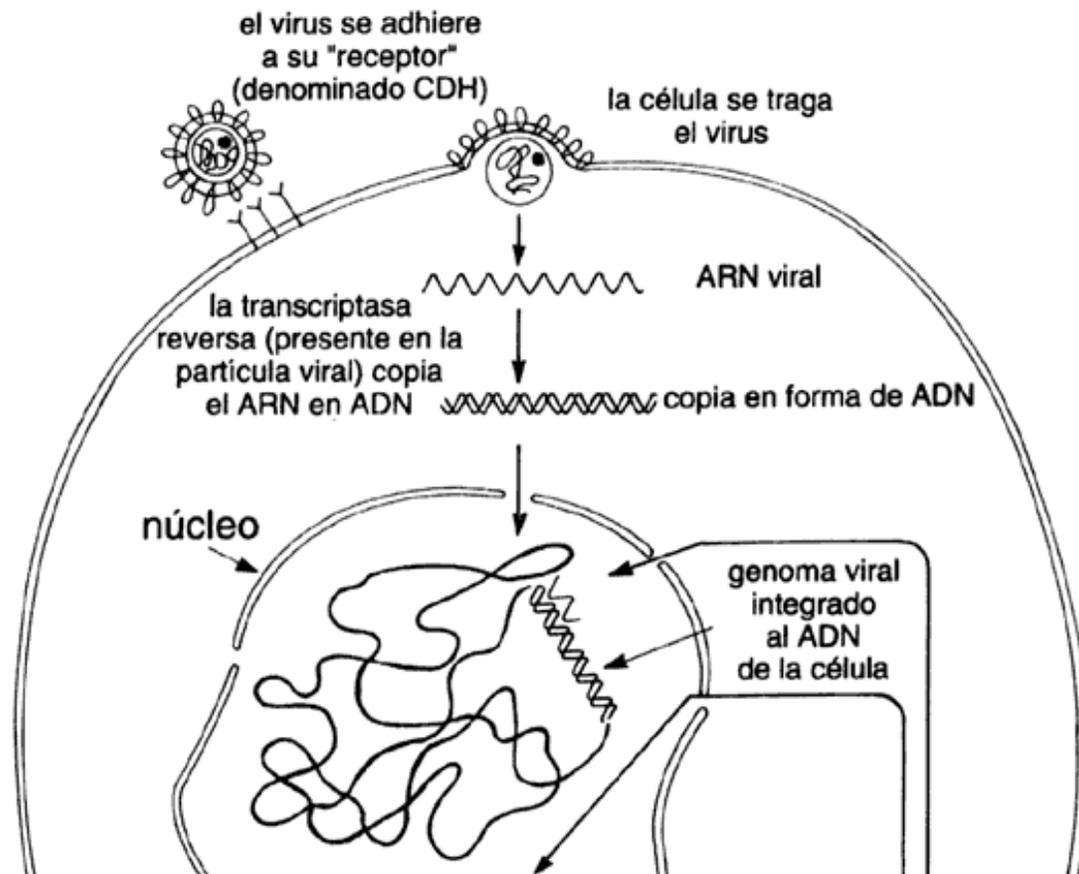
RECUADRO IV.3. Ciclo de vida del virus que produce el SIDA

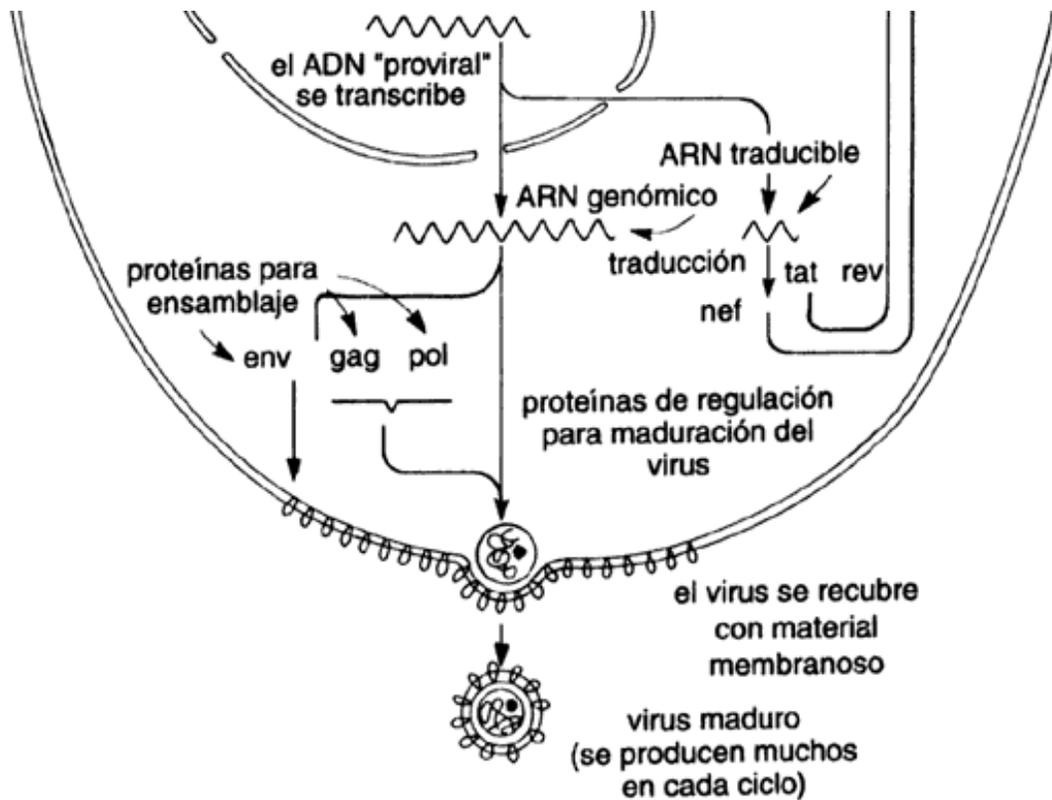
Aunque el virus de la inmunodeficiencia humana que produce el SIDA (como cualquier otro virus) no está propiamente vivo, podemos hablar de su "ciclo de vida", refiriéndonos a las diversas etapas que transcurren desde que las partículas virales se internan en una célula susceptible, hasta que se producen más partículas, listas para infectar otras células.

El virus del SIDA pertenece al grupo de los retrovirus, denominados así porque su genoma está constituido por ARN, pero lo primero que hacen al entrar a la célula es hacer una copia del mismo, en forma de ADN e integrarlo al cromosoma de la célula infectada. De esta manera, estos virus pueden mantenerse latentes dentro de la célula infectada (esto es, tienen ahí su genoma presente y heredándolo a las células hijas) durante mucho tiempo. En un determinado momento, la copia del genoma viral integrada se puede activar, dando origen a un largo ARN, que contiene la información de todas las proteínas virales. Este ARN, y la larga proteína para la que codifica, son procesados para ejercer diversas funciones, que desembocan eventualmente en la fabricación de más virus y su abandono de la célula.

Es importante destacar que hay varias enzimas características de este virus, y que por lo tanto pueden ser un blanco muy interesante de fármacos o drogas. La *transcriptasa reversa*, que copia el ARN para convertirlo en ADN, es una enzima que no se encuentra en las células normales. Tampoco se encuentra una proteasa (enzima que rompe proteínas) igual a la del virus. Estas dos proteínas han sido estudiadas con detalle, y su estructura tridimensional se conoce hoy en día, por

lo que se desarrolla un intenso trabajo para la obtención de sustancias químicas capaces de inhibir o inutilizar, específicamente, su función (véase en el capítulo VI, "Diseño racional de drogas").





ESTUDIOS SOBRE LAS CAUSAS DEL CÁNCER

Todos sabemos sobre la gran cantidad de recursos materiales y humanos que se han invertido en la incesante búsqueda de la humanidad para conocer las causas, la naturaleza y la forma de curar el cáncer. Aunque estos estudios han ido produciendo conocimientos útiles, la mayoría de lo que sabemos actualmente sobre cáncer proviene de estudios relativamente recientes, que emplean ADN recombinante.

Hay que destacar que cuando nos referimos al cáncer, hablamos de fenómenos patológicos que tienen algo en común: la proliferación descontrolada de cierto grupo de células del organismo, pero quizá no es tan claro para nosotros que hay muchas causas y condicionamientos que pueden desembocar en la aparición del cáncer. Existen factores del ambiente, factores genéticos y hasta infecciosos relacionados con muchos tipos de cáncer. En el fondo, el cáncer es una enfermedad genética. Algo ocurre al programa genético de una célula y ésta no responde más al control normal y se divide continuamente, generando su progenie, la cual hereda la cualidad de dividirse descontroladamente. La lesión debe haber ocurrido en el genoma, y por ello se transmite a las células descendientes. Durante décadas se ha estudiado incesantemente esta enfermedad. Ya en 1911 Peyton Rous describía que el cáncer se podía trasplantar de un pollo enfermo a otro, lo que eventualmente se pudo atribuir a un virus causal.

Como se dijo ya, en el estudio del cáncer, el ADN recombinante ha tenido un impacto generalizado y definitivo. Hemos aprendido más al respecto del cáncer en los últimos 15 años que en todas las décadas anteriores, en las que también hubo intensa investigación. En este proceso de conocimiento ha sido crucial la identificación de genes específicos causantes del cáncer, denominados *oncogenes*, inicialmente identificados dentro de los virus cancerígenos. Si reflexionamos un momento, lo realmente asombroso es que nuestro organismo tal vez sea un sistema capaz de controlar de manera exquisita la proliferación de gran diversidad de tipos celulares. Evidentemente debe haber genes cuya actividad promueva la proliferación de las células, y que cesan de actuar en un momento determinado, de acuerdo con un programa preestablecido. Quizá uno de los aspectos más interesantes de la investigación del cáncer es que nos ha acercado al conocimiento íntimo de los mecanismos de regulación de la proliferación celular. Resulta ser que muchos oncogenes no son más que versiones alteradas de genes esenciales, naturalmente presentes en todas nuestras células. Estos genes son ahora identificados como *protooncogenes*.

Hasta el momento existen por lo menos cuatro tipos muy bien definidos de oncogenes: unos participan en la

recepción de señales externas de proliferación, cuyos productos se localizan en la membrana de las células; otros codifican, en sí mismos, para señales de proliferación, que son secretadas al medio extracelular; otros más intervienen en la interpretación o **transducción de la señal** de proliferación; finalmente, encontramos genes cuyos productos interactúan específicamente con el ADN, causando la expresión de genes que, a su vez, inducen la proliferación celular.

¿Cómo es que estos genes se *transforman* de protooncogenes a oncogenes? Es fácil entender los mecanismos, después de que la donación de los genes y su secuenciación ha revelado las lesiones responsables. (Para explicar algunos de los fenómenos bien caracterizados sobre el cáncer, es importante que el lector tenga presente la descripción un poco más precisa de lo que es un gene en el recuadro IV.1).

Un protooncogene puede ser activado al insertarse un virus cerca de su región regulatoria.²  El gene se expresa ahora de acuerdo con el programa del virus, y no con el programa natural de la célula. Otra manera de activarse es cuando la lesión resulta de anomalías cromosómicas. Nuevamente, los rearrreglos tienen como consecuencia en la asociación del oncogene a nuevas regiones regulatorias.

Por ejemplo, se ha observado la transformación de oncogenes por una sola mutación, o mutación puntual. Puede ocurrir que la alteración de un solo **nucleótido** y la consecuente alteración de un solo aminoácido, resulte en que la proteína correspondiente muestre una actividad alterada que la saca de control. Ciertos oncogenes resultan de un fenómeno de este tipo. Ocurre entonces, que en ciertas circunstancias, una alteración en uno de los 3 mil millones de pares de bases del genoma humano resulta en la aparición de cáncer!

Es importante destacar, sin embargo, que aunque se conozcan muchas de las causas moleculares que pueden desembocar en cáncer, y se hayan identificado los genes respectivos, el panorama es, en realidad, mucho más complejo. La interacción de otros genes, los **antioncogenes**, regula y modera la actividad de los oncogenes. El sistema inmunológico es capaz de destruir específicamente células cancerosas, eliminando quizá gran cantidad de brotes de cáncer que se producen espontáneamente en todos los individuos. Es, pues, por la interacción de todos estos factores, causativos, antagónicos y moduladores, que ocurre el desenlace final de la aparición o no de la enfermedad. Claramente, cualquier factor ambiental o infeccioso que cause mutaciones, puede, en principio, propiciar la aparición de cáncer. La susceptibilidad del individuo, medida por la eficacia de su sistema inmune y la particular actividad de mecanismos de control, determinará la frecuencia con la que las lesiones genéticas producen la enfermedad, o son contrarrestadas.

Entre los descubrimientos más recientes se encuentran ante oncogenes que están muy frecuentemente asociados a ciertos tipos de cáncer. Uno de ellos codifica para la proteína denominada p53, la cual fue seleccionada molécula del año en 1993 por la revista *Science*. Como su nombre lo indica (una denominación como p53 responde típicamente a una proteína de actividad desconocida, pero de peso molecular de alrededor de 53 mil), esta proteína no se consideró muy importante durante una década después de su descubrimiento. Hoy día sabemos que el gene que codifica para esta proteína se encuentra mutado en hasta el 50% o más de los pacientes con ciertos tipos de cáncer.

Evidentemente, el acervo de conocimientos que se ha ido acumulando permite la apertura de más y más avenidas nuevas para el tratamiento del cáncer (véase el capítulo siguiente).

EL SISTEMA NERVIOSO

El reto de entender los fenómenos biológicos a nivel molecular de ninguna manera se circunscribe a las funciones celulares. El reto más formidable es desenterrar los fenómenos integradores que nos permiten interactuar con nuestro ambiente, percibirlo y transformarlo. La evolución biológica produjo, en un periodo de 3 o 4 mil millones de años, seres vivos de enorme complejidad, capaces de reaccionar ante el ambiente de maneras verdaderamente complejas. Muchos de los fenómenos que hasta ahora hemos descrito son comunes a todos los seres vivos, pero otros atañen sólo a las formas de vida más complejas. En el ser humano se conjugaron factores biológicos que han dado paso a una nueva y reciente etapa de la evolución: la cultural. En los últimos 50 o 100 mil años, las comunidades humanas se han embarcado en la preservación y transmisión de información, que ha desembocado en una total transformación de sus actividades y de su capacidad para impresionar al resto de la naturaleza. Los sistemas biológicos que subyacen esta portentosa capacidad son objetos de intensa curiosidad para los científicos. No es de extrañarse entonces que, en la actualidad, una proporción significativa de los biólogos experimentales

estén dedicados al estudio de los sistemas nervioso y endocrino.

El estudio de la función neuronal a nivel molecular ha revelado la importancia de varios tipos de proteínas. Es importante destacar el papel primordial de los canales iónicos, que participan en gran número de los procesos de todas las células y su comunicación con el exterior. La comunicación del impulso nervioso depende, precisamente, de la existencia de canales que permiten el flujo de iones, es decir, átomos o moléculas con carga electroquímica, en ciertas condiciones. Los canales iónicos se encuentran en las membranas de las células, al igual que otras proteínas que reciben el nombre de *receptores*. De la interacción de receptores con moléculas mensajeras dependen numerosas transacciones biológicas. En otras palabras, en la superficie de las células se desarrollan una infinidad de interacciones y transacciones moleculares, mediadas por receptores y canales, que dan como resultado la respuesta de las células a los estímulos exteriores. En el estudio del sistema nervioso, los canales y los receptores tienen un papel protagónico (véase la figura IV.1)

En este campo, también adquiere especial relevancia la utilización de sistemas modelo. Sabemos que muchos de los experimentos clásicos de neurobiología se hicieron con gatos, como animales de experimentación. Sin embargo, a nivel molecular; el organismo modelo que ha probado ser más valioso es la mosca de la fruta, *Drosophila sp.*

Debido a la gran cantidad de estudios genéticos previamente realizados en esta especie, ha sido factible aislar moscas mutantes con deficiencia en alguno de los procesos relacionados con la función nerviosa, y después localizar e identificar los genes responsables de dichas funciones. Quizá nos intrigue cómo es posible obtener moscas mutantes en genes que intervienen en el sistema nervioso. Además, podríamos preguntarnos: ¿que tienen que ver los genes del sistema nervioso de la mosca con los de un ser humano?

La capacidad de aislar mutantes de genes que participan en procesos específicos es una de las herramientas más poderosas de la biología experimental. En el caso de *Drosophila* podemos ver la aplicación de los métodos más simples e ingeniosos, producto de muchas décadas de tradición en su estudio. Se han aislado genes del sistema nervioso utilizando desde las técnicas más clásicas hasta las más complejas y modernas, producto del conocimiento de biología molecular.

Un ejemplo interesante es el aislamiento de genes relacionados con los procesos de la memoria. Para este propósito se diseña un experimento muy simple (véase la figura IV.2). Un conjunto de moscas se introduce en un pequeño recipiente que contiene una sustancia aromática. Después se retira el aromatizante y se aplica otra sustancia de aroma diferente, sólo que esta vez acompañada de un choque eléctrico. Si las moscas han aprendido a asociar el desagradable choque eléctrico con un aromatizante y no con el otro, entonces deberán alejarse del primero. Esto es precisamente lo que se observa al colocar a las moscas en una cámara central conectada a dos cámaras con aromatizante. Las moscas se dirigen preferentemente a la cámara del olor que no asocian con los choques eléctricos. Este experimento se puede hacer ahora con moscas previamente sujetas a un tratamiento mutágeno (por ejemplo, con un tratamiento químico suave de los huevecillos). Entre las moscas así tratadas puede haber mutantes de muchos tipos, pero algunas podrían tener alterados los procesos de memoria. Y, en efecto, en el experimento de las tres cámaras conectadas, se pueden identificar moscas que ya no son capaces de recordar que un olor se asocia a un choque eléctrico, y se distribuyen por igual a lo largo de las cámaras. Otras, por ejemplo, se pueden acordar de la asociación olor-choque eléctrico por un corto periodo, pero luego lo olvidan, más rápido que las moscas normales. Experimentos parecidos a éstos se han podido hacer desde hace muchas décadas y, de hecho, una gran colección de miles de mutantes de todo tipo, está disponible en *Drosophila*. Lo interesante es que a partir del ADN recombinante, ahora ya podemos saber qué genes están alterados y obtener su secuencia.

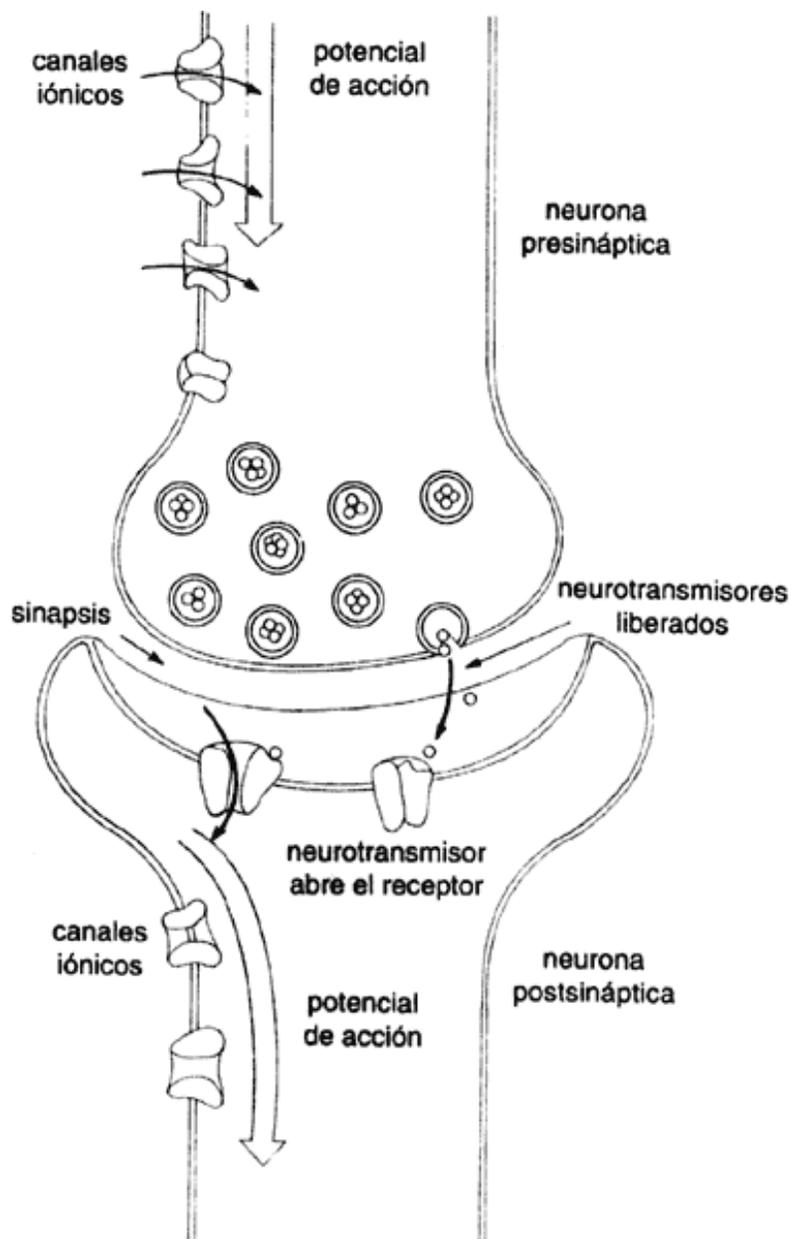
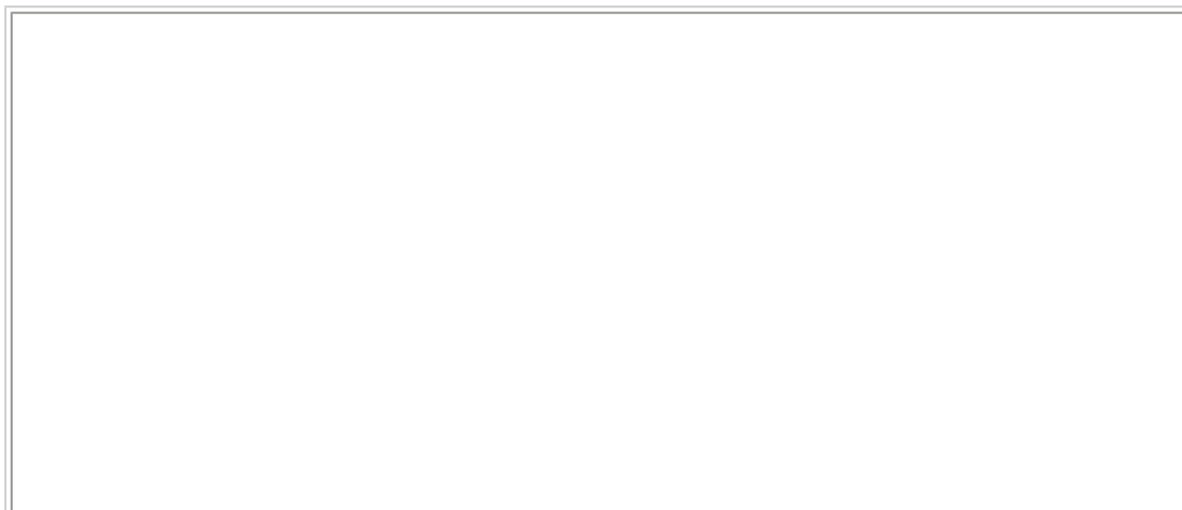


FIGURA IV.1



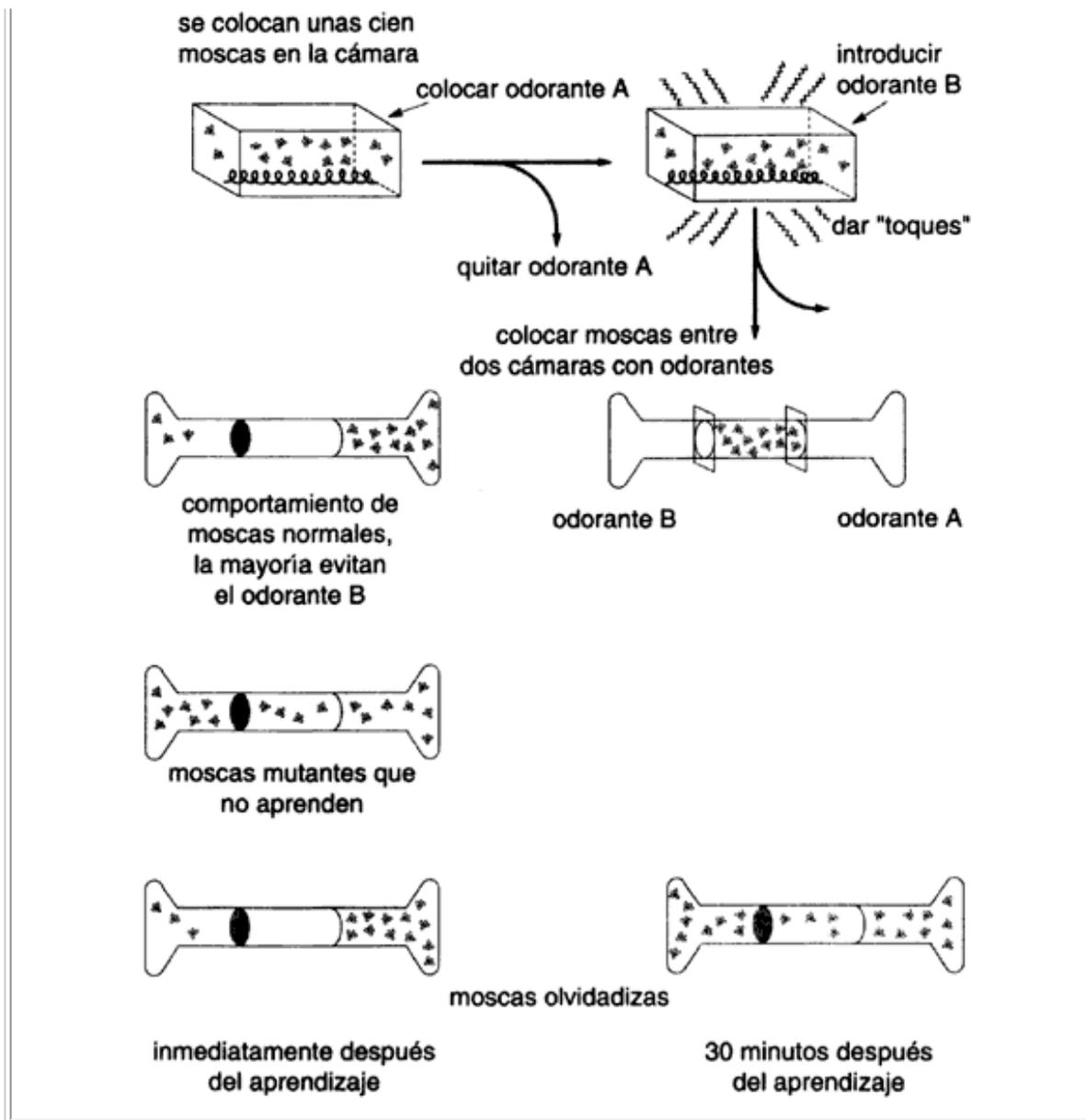


FIGURA IV.2

Lo anterior nos conduce a la segunda pregunta: ¿qué relación tienen estos genes mutantes con el sistema nervioso humano? El análisis de los genes mutantes mencionados reveló que las alteraciones se encuentran en proteínas que participan en la señalización celular, muchas de ellas se conservan en todo el mundo eucariote, desde las levaduras hasta los humanos, como por ejemplo la enzima adenilato ciclasa, cuya alteración es responsable de uno de los **fenotipos** de pérdida de memoria en *Drosophila*. En las células nerviosas de mamíferos (por supuesto incluyendo a los seres humanos), también hay adenilato ciclasa. Es altamente probable que la función de la adenilato ciclasa interviene asimismo en los procesos moleculares que subyacen en la memoria de los seres humanos. ¿Quizá a la memoria de corto plazo?

Al observar hallazgos tan interesantes como éstos, suena lógico pensar en cómo seguir avanzando para averiguar más acerca del fenómeno y contrastar hipótesis. Una de las formas más poderosas para experimentar con organismos superiores es reintroducir en ellos genes alterados, de manera muy similar a los genes bacterianos (véase en este capítulo, "Estructura y función del gene").

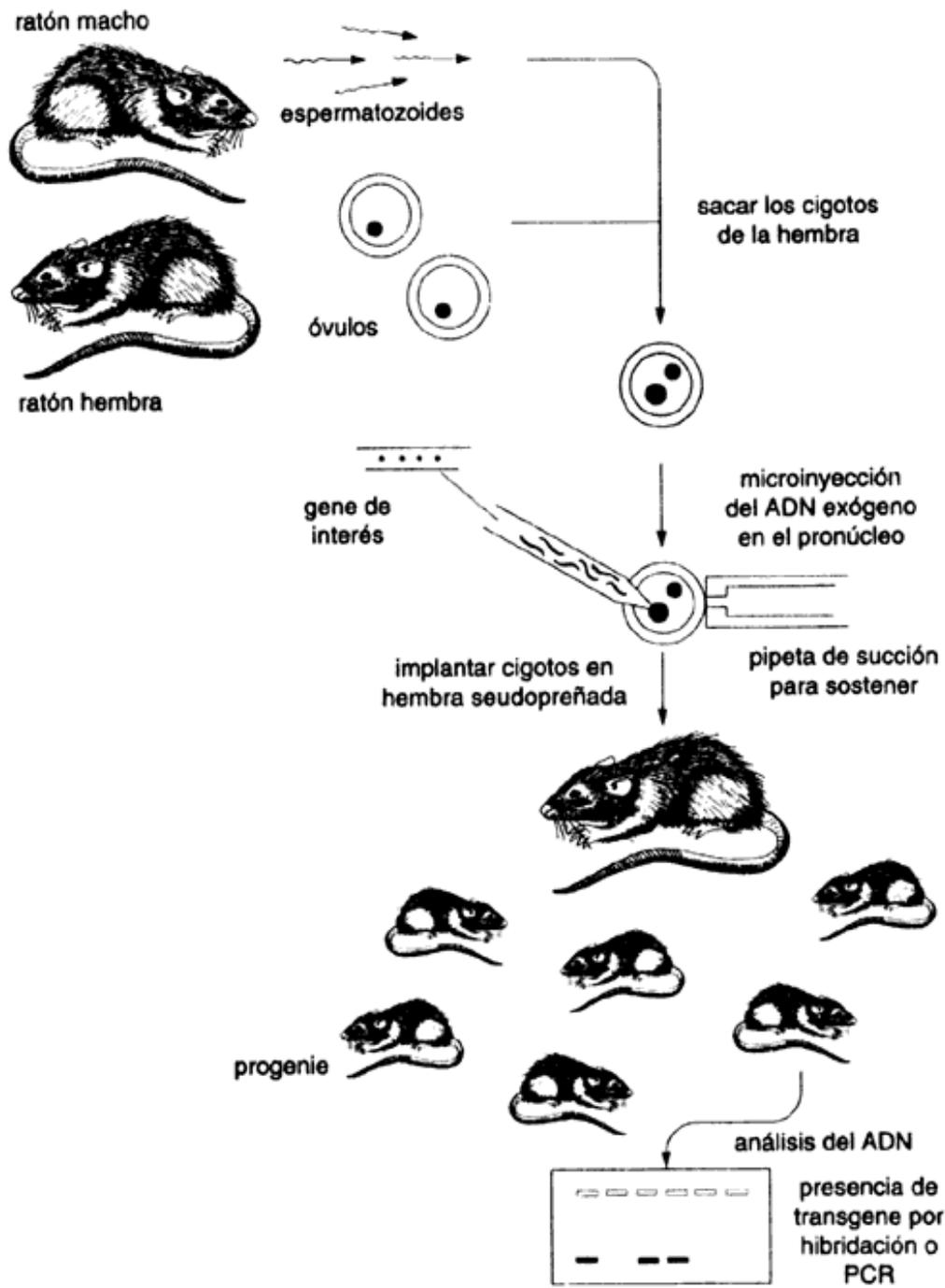
Un organismo al que artificialmente se le han introducido genes exógenos se conoce como **organismo transgénico**. La técnica para producir organismos superiores transgénicos usando ADN recombinante se introdujo a principios de los años ochenta, inicialmente utilizando ratones en los que la embriología estaba muy desarrollada (recuadro IV.4). Hoy en día se pueden producir diversos animales y plantas transgénicas, entre los que se encuentra *Drosophila*. Con todos los genes disponibles de esta mosca, y la posibilidad de manipularlos e

introducirlas nuevamente al organismo completo, el panorama para el experimentador es verdaderamente atractivo. Incluso se dispone de métodos tan ingenuos como el de la coloración, mencionado anteriormente (véase en este capítulo, "Estructura y función del gene", p 69). En la mosca de la fruta se dispone del gene *rosy*, que es básicamente inocuo, pero produce moscas con ojos rosa, en vez de rojos, y que permite distinguir una mosca transgénica entre muchas otras que no lo son, por simple inspección. ¡Podemos pensar ahora en introducir cambios de diversa naturaleza al gene de la adenilato ciclasa neuronal y observar qué efectos tienen sobre el aprendizaje de las moscas! Después podemos tratar de hacer un experimento similar; pero ahora con un ratón.

RECUADRO IV.4. *Obtención de ratones transgénicos*

La introducción estable de ADN externo a un animal se puede lograr mediante la técnica de microinyección. Los cigotos (o células recién fecundadas) de ratones son capaces de aceptar el ADN que se les inyecta e integrarlo en algún lugar de sus cromosomas durante el proceso inicial del desarrollo. Normalmente no se puede controlar dónde se integra el ADN inyectado, por lo que hay cierto grado de incertidumbre en cada uno de estos experimentos.

Una vez desarrollado el cigoto hasta un estadio un poco más avanzado, el pequeño embrión se puede implantar en una ratona tratada con hormonas, que se denomina pseudo preñada, cuyo estado la hace receptiva y capaz de continuar el desarrollo de los embriones. Entre los ratones que nacen de este experimento habrá algunos que hayan incorporado el ADN exógeno. Esto se puede determinar tomando una pequeña biopsia (por ejemplo, un pedacito de la cola), y analizando su ADN, lo cual es sencillo si se utiliza el principio de hibridación de ácidos nucleicos (véanse del capítulo I, "Las moléculas de la vida" y del capítulo III, "Aislamiento de genes usando ADN sintético", o en el capítulo II, "La reacción en cadena de polimerasa".)



Otro notable descubrimiento reciente se refiere a los mecanismos moleculares para la detección de los olores. Éste es un fenómeno que ha fascinado a los científicos por mucho tiempo. ¿Cómo podemos distinguir entre los miles o millones de diferentes aromas? En la actualidad los más complejos métodos instrumentales de detección de sustancias palidecen ante la sensibilidad y la capacidad de discernimiento de un sistema biológico.

¡Todavía utilizamos perros para detectar pistas o identificar drogas en las maletas en los aeropuertos! Un experimento que inició la resolución del dilema sobre el mecanismo de discriminación de olores fue concebido por Leslie Buck, una estudiante del postdoctorado que trabajaba en el laboratorio del doctor Richard Axel, respetado biólogo molecular estadounidense, quienes concibieron que probablemente el problema de distinguir sustancias químicas muy diversas podría resolverse con un mecanismo similar al de los anticuerpos (véase en este capítulo, "Los anticuerpos y cómo se producen"), es decir; a través de un sistema combinatorio. Pensaron que quizá existiría un conjunto de receptores (proteínas membranales) parecidos entre sí, pero cada uno capaz de

interaccionar con alguna parte diferente de un odorante. Con algunos cientos de receptores las células de la nariz podrían distinguir millones de diferentes olores. Esto ocurriría si la respuesta de la célula depende de la combinación de señales que se genera de la estimulación de conjuntos diferentes de receptores, diferentes para cada odorante. A partir de este concepto se dieron a la tarea de identificar en los ARN mensajeros producidos por las células correspondientes, conjuntos de moléculas que fueran similares, y pudieran ser la base de este mecanismo que supusieron podría existir. Con gran satisfacción descubrieron que, en efecto, las células sensibles al olor expresan un conjunto de receptores muy parecidos entre sí, y relacionados con la percepción del olor. Aunque todavía hay mucho trabajo por hacer antes de desentrañar claramente el mecanismo responsable de este proceso, los descubrimientos descritos muestran cómo el conocimiento previo (sistema de anticuerpos), la imaginación, y una poderosa metodología nueva, permiten los avances de la ciencia.

Evidentemente, las descripciones anteriores no abarcan los cientos de genes relacionados con la función neuronal que se han estudiado utilizando ADN recombinante, sólo intentan ilustrar algunas de las maneras como se han llevado a cabo estos estudios.

GENÉTICA DEL COMPORTAMIENTO

Conforme nos adentramos en identificar transacciones moleculares que afectan niveles superiores de la experiencia humana, las cosas se tornan muy interesantes. Y muy controvertidas.

Los avances del ADN recombinante están permitiendo proponer hipótesis concretas, verificables, respecto de los condicionantes genéticos de formas complejas de comportamiento. Algunos reportes recientes ilustran estos conceptos.

A partir del análisis de una familia holandesa en la que los varones presentaban con frecuencia trastornos de conducta (tales como comportamiento violento, incendiarismo, exhibicionismo y otros), se identificó como probable al gene condicionante: el que dirige la elaboración de la enzima monoaminoxidasa, de cuya actividad depende la formación de ciertos neurotransmisores. Un par de años después, se reportó el resultado de

experimentos con ratones transgénicos a los que inactivó específicamente el gene de monoaminoxidasa.³ Se observó que los ratones mostraban, entre otras deficiencias, un comportamiento marcadamente agresivo.

Con una concepción similar, se han hecho recientemente propuestas sobre la posible identificación de genes correlacionados con la homosexualidad. Por el momento, sólo se ha establecido, por mapeo genético, la posible localización gruesa de dicho gene, pero existe la posibilidad de identificarlo plenamente, tal y como se hizo para la fibrosis quística (véase en el capítulo anterior, "Aislamiento de genes responsables de enfermedades hereditarias").

Es importante advertir, dicho lo anterior; que los nuevos conocimientos sólo abren avenidas para enriquecer nuestra concepción de nosotros mismos, inmersos en la evidente complejidad de la naturaleza humana y las relaciones sociales. Es irresponsable hablar del descubrimiento del "gene del alcoholismo", como si estuviera seguro de una relación causa-efecto exclusiva. También sería irresponsable y empobrecedor ignorar la posible influencia de nuestra constitución genética sobre nuestro comportamiento.

EL DESARROLLO EMBRIOLÓGICO

El desarrollo embriológico por el cual se genera un organismo completo a partir de un óvulo fecundado es uno de los procesos más fascinantes de la naturaleza. Los estudiosos de la embriología han contemplado extasiados el proceso en el que a partir de células aparentemente idénticas, se van creando estructuras cada vez más intrincadas; cómo se va adquiriendo forma y función.

Nuevamente es sólo hasta la era del ADN recombinante que se ha podido empezar a entender los circuitos moleculares que subyacen en este proceso fundamental. Y nuevamente, el estudio de organismos modelo ha probado ser extraordinariamente importante.

El espacio nos constriñe a mencionar solamente una pequeña muestra de este efervescente campo de la biología experimental moderna, tomando como ejemplo los llamados *genes homeóticos*, descubiertos en mutantes de

Drosophila, en los que, en el desarrollo embrionario se observaban fenotipos muy llamativos. En uno de ellos, denominado *Antennapedia*, las estructuras de las antenas son sustituidas por patas. En el *bicoid*, el embrión se desarrolla con dos telsones o colas, sin tórax ni cabeza (desde luego estas moscas mutantes en genes homeóticos no sobreviven después de ciertos estadios del desarrollo).

Estas mutantes fueron aisladas hace varias décadas, y los genetistas moleculares modernos intuyeron que las lesiones deberían encontrarse en genes de crucial importancia para el desarrollo, en alguno de los interruptores primordiales para la diferenciación. En efecto, estos genes resultaron ser genes maestros, y sus equivalentes o similares luego fueron encontrados en toda la escala filogenética de los eucariontes: levaduras, plantas, animales, etcétera.

Después de una década de experimentación sabemos muchas cosas sobre muchos genes homeóticos. Estos son genes maestros que codifican para proteínas que regulan la actividad del ADN. Las proteínas que codifican se unen específicamente a ciertas secuencias dentro de los cromosomas, activando o inhibiendo la expresión de genes particulares. También se han aislado, en gran parte por los hallazgos de *Drosophila*, genes homeóticos de organismos superiores como el ratón y el hombre. Continuamente aparecen nuevos genes y nuevos fenotipos causados por éstos.

En uno de los experimentos más llamativos realizados recientemente, se obtuvieron moscas transgénicas en las que un gene homeótico, que determina etapas fundamentales de la formación de los ojos, se puso bajo el control de señales que activan genes en las patas. El resultado: ¡moscas con ojos perfectamente formados, pero creciendo precisamente en las patas!

Los nombres de algunos de los genes identificados en la mosca de la fruta nos indican el tipo de procesos que se están desentrañando: *daughterless* (sin hijas), *wingless* (sin alas), *hunchback* (jorobada), *hairy* (peluda). Otros muestran la naturaleza juguetona de los investigadores: *sonic* que es parte del complejo de genes *hedgehog* (quizá el lector recuerde al personaje del juego electrónico *Sega Genesis*).

LA NUEVA BIOLOGÍA VEGETAL

El estudio de las plantas, desde el punto de vista molecular; ha estado rezagado respecto al de otros organismos. Es quizá una paradoja que las leyes fundamentales de la herencia fueron desarrolladas por Mendel utilizando plantas, y que la genética molecular no se haya inclinado por éstas como uno de sus primeros objetos de estudio. Hay razones que explican esta situación, que veremos más adelante.

El cultivo y manejo de las plantas constituye uno de los factores cruciales del desarrollo de la humanidad. La transición de las culturas de cazadores y recolectores a la vida sedentaria, basada en la agricultura, representa un parteaguas en la evolución cultural. En este sentido, los pueblos han dedicado gran cantidad de su energía e imaginación al mejoramiento y manejo de sus cultivos. La selección de mejores variedades de plantas es una actividad que se ha llevado a cabo por milenios. En efecto, se han empleado las más refinadas técnicas empíricas y la genética clásica para constituir una profesión que revestía gran importancia hacia la mitad de este siglo. La llamada revolución verde, que ha permitido incrementar de manera importante la productividad agrícola, es fruto de la aplicación de estas disciplinas.

Sin embargo, el arribo del ADN recombinante no tuvo en el área de plantas un impacto tan inmediato como el que vimos en el campo de la salud. Quizá la razón principal es que los tiempos de generación de las plantas las han hecho objetos de estudio bastante difíciles. La planta no ha sido un sistema modelo muy útil para resolver preguntas básicas de genética molecular. Por supuesto que esta situación no impidió que se desarrollaran con ellas importantes estudios moleculares, pero no con la intensidad y abundancia que en microorganismos y animales. Esta situación ha cambiado en la última década. Muchos grupos de investigación han detectado la importancia de aplicar las técnicas de ADN recombinante a la biología vegetal, y el gran potencial que tiene la manipulación de las plantas para el bienestar de la humanidad. Una de las áreas más activas y promisorias de la biología moderna es, hoy día, la biología vegetal.

Ingeniería genética de plantas y la tecnología

Describamos primero la explotación de un fenómeno natural que ocurre entre la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y ciertas especies vegetales. *Agrobacterium* es capaz de invadir la planta e introducirle un segmento

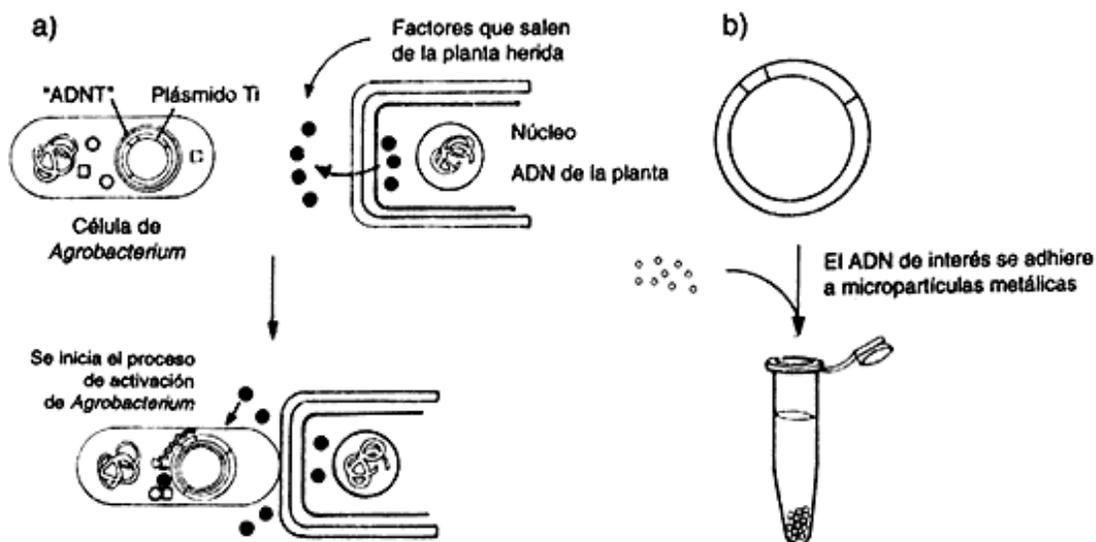
de ADN, llamado plásmido *Ti*, desarrollando eventualmente un tumor. Esto quiere decir que una bacteria ha podido hacer plantas transgénicas desde hace millones de años. En efecto, parte del ADN del plásmido *Ti* se integra al genoma de la célula vegetal infectada y lo hereda establemente a las células hijas. Otro fenómeno importante que facilita la ingeniería genética de plantas es que éstas tienen gran capacidad de regeneración: muchas plantas pueden regenerar un organismo completo a partir de un pedacito sacado de una hoja. Con estos elementos, se desarrolló el sistema básico para la ingeniería genética de plantas (véase el recuadro IV.5). Uno de los protagonistas del desarrollo de esta tecnología fue el investigador mexicano, doctor Luis Herrera-Estrella, a principios de los ochenta, quien se encontraba en aquel momento en Bélgica. Es curioso que algunas de las contribuciones de importancia internacional de este otro científico mexicano consistieron en el desarrollo de vehículos de clonación (véase en el capítulo II, "Concepto de clonación molecular").

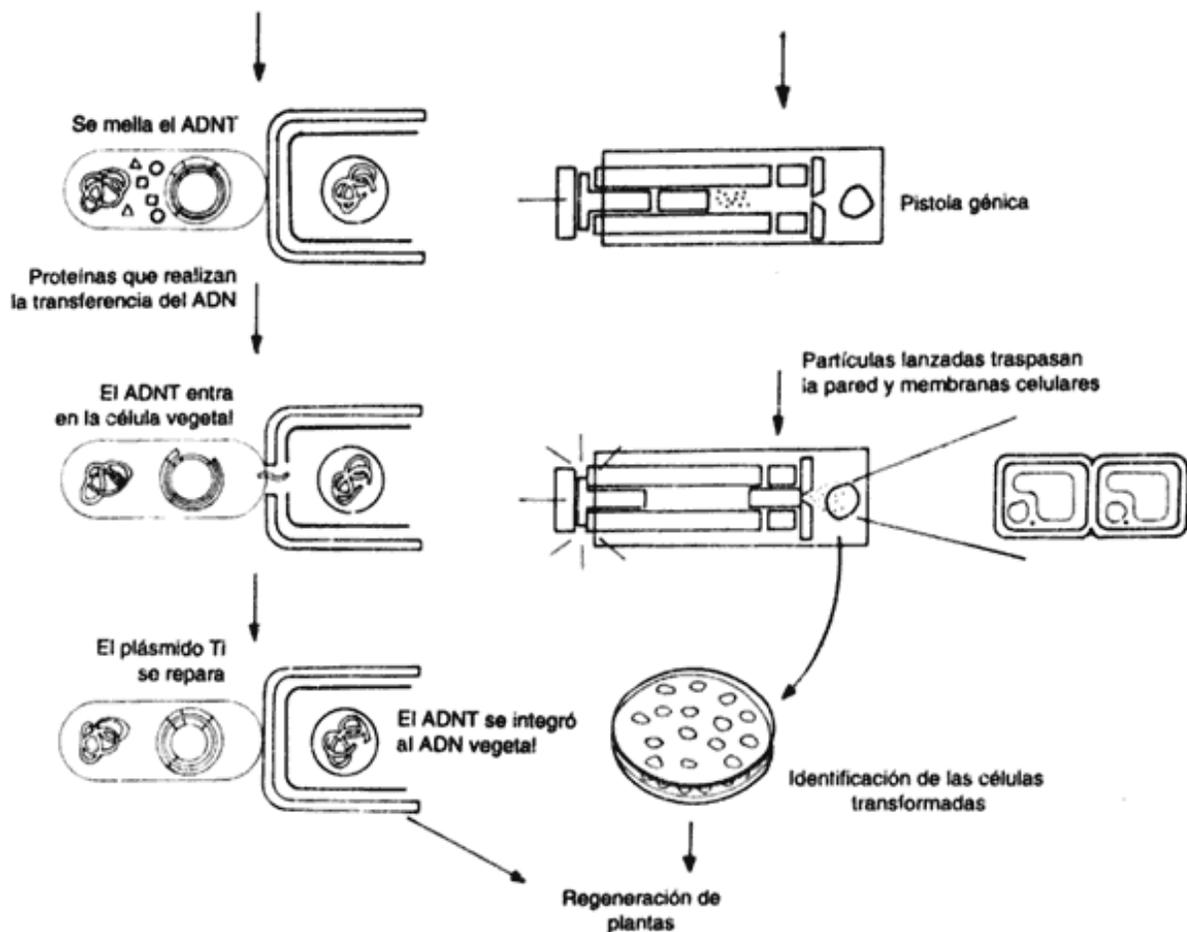
RECUADRO IV.5. La ingeniería genética aplicada a plantas

La posibilidad de realizar ingeniería genética en plantas depende, al igual que en los animales, de que se logre introducir en ellas material genético exógeno, y que éste se establezca y herede de una célula a otra. En el caso de las plantas, esto se facilita mediante el uso de la tecnología *Ti*.

Con la ayuda del microorganismo *Agrobacterium tumefaciens* se logra introducir el ADN recombinante a la planta. A través de una herida se establece una interacción íntima entre la bacteria y la planta, que finalmente redundará en la transferencia del ADN bacteriano a las células vegetales y su integración en alguno de sus cromosomas. La gran eficiencia relativa del proceso contribuyó al avance de esta área de investigación.

Hoy en día se puede introducir el ADN a las células de plantas sin necesidad de la bacteria. El ADN (que puede contener secuencias de *Agrobacterium* que le ayuden a integrarse al cromosoma) logra llegar a su destino disparándolo con un dispositivo llamado "gene gun" o pistola génica. Aunque no es posible hacer esto con todas las variedades vegetales, ni con la eficiencia deseada en los casos que se puede, se continúa avanzando hacia lograr que las variedades de mayor interés agrícola sean sujetas de transformación.





La posibilidad de regenerar plantas con genes exógenos insertados, se ha constituido en un factor crucial para su estudio. Este mecanismo permite acortar significativamente el tiempo de muchas investigaciones que anteriormente requerían experimentos de larga duración, pues dependían de la fertilización convencional de las plantas, y esperar que éstas crecieran y formaran semillas en cuestión de meses. Desafortunadamente, no todas las especies vegetales son susceptibles a la infección por *Agrobacterium*, por lo que la manipulación de muchas de éstas fue retrasada. En los últimos años, sin embargo, se han establecido mecanismos para transformar y regenerar plantas de muchas nuevas variedades, incluyendo especies de gran importancia agrícola, como los cereales. Una de las maneras como se introducen genes hoy en día, es lo que se ha dado en llamar *biobalística*. Con esta técnica, el ADN se hace penetrar a las células vegetales atravesando la pared celular; viajando en proyectiles microscópicos que simplemente se disparan hacia los pedacitos de hoja.

Genes móviles en plantas

Otro de los aspectos más interesantes que se asocian a la biología molecular vegetal tiene relación con los genes móviles o saltarines. Ya hemos comentado que la visión clásica consideraba al material genético como un elemento fundamentalmente estable (véase en este capítulo, "Los anticuerpos y cómo se producen"). Este material es responsable de la determinación de las características de los nuevos seres que permanecen de generación en generación. Se pensaba que los procesos que daban origen a la evolución de las especies eran fenómenos azarosos de cambio donde se alteraban unas cuantas bases del ADN. En los años cincuenta, sin embargo, una genetista de plantas, la doctora Barbara McClintock, describió fenómenos de variación en el maíz y propuso que la causa debería ser el movimiento o salto de genes, de un lugar a otro del genoma. El trabajo de la doctora McClintock no fue claramente apreciado hasta que este fenómeno se observó también en la mosca de la fruta. Finalmente, en 1983, Barbara McClintock fue galardonada con el Premio Nobel de fisiología o medicina, premiando así su trabajo que conjuntaba lógica y método impecables, pero también preclara intuición. Los elementos móviles han sido de gran utilidad para manipular el genoma de algunas variedades de plantas, y también explican algunos de los fenómenos que en ellas observamos.

Una de las historias más notables que he escuchado se refiere precisamente a esto. Nos la relató la doctora Virginia Walbot, investigadora de la Universidad de Stanford, en una reciente visita al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Entre los objetos de estudio de la doctora Walbot se encuentran los elementos móviles del maíz. En sus investigaciones había descubierto que algunos de estos elementos se mueven de manera excesiva en muchas variedades de maíz, ocasionando que se produzca un elevado número de mutaciones. En su búsqueda del origen de estos elementos, la doctora Walbot descubrió que éste se podía identificar en una variedad de maíz proveniente de la zona zapoteca, del estado de Oaxaca. La variedad llamada *zapalote chico* contiene estos elementos móviles, pero los puede mantener bajo control. Si se cruza el zapalote chico con otras variedades de maíz, el elemento móvil pasa al entorno genético que ya no lo controla, causando su degeneración. Antiguas leyendas que datan de hace muchos siglos amenazaban a los enemigos del pueblo zapoteca con las terribles consecuencias de robarse su maíz sagrado. ¡Los dioses castigarían al ladrón haciendo que sus cosechas se echaran a perder! Hoy día estamos conociendo las causas moleculares de la mitológica maldición.

Así pues, aunque durante milenios, el hombre se ha dedicado a mejorar las variedades de plantas que cultiva, la ingeniería genética ha hecho posible, en poco más de una década, que se abra un nuevo panorama para el conocimiento y la manipulación de este patrimonio fundamental de la humanidad.

EL GRAN PROYECTO PARA SECUENCIAR EL GENOMA HUMANO

Una vez revisados algunos de los logros recientes de la biología experimental, resulta más fácil entender la convicción de los biólogos moleculares de que el ADN recombinante irá permitiendo abordar grandes problemas, que previamente se percibían inaccesibles. Esto ha dado como resultado que muchas de las áreas de investigación que en el presente manifiestan intensa actividad fueran propuestas desde mucho antes: éste es el caso del estudio molecular del genoma humano. Desde inicios de los años ochenta, hubo iniciativas para generar un mapa físico y genético de todo el genoma humano de manera sistemática. La meta de largo plazo sería, obviamente, el conocimiento íntimo de todo el genoma, es decir; conocer toda su secuencia. Pero veamos paso a paso lo que significa esto.

Todos sabemos que nuestro genoma está repartido en 23 pares de cromosomas: éste es el nivel más grueso de mapeo genético. Pero ¿qué podemos decir respecto a qué genes se encuentran en cuáles cromosomas? ¿Qué genes están cerca de cuáles otros? Esta localización relativa de los genes constituye un paso siguiente de finura o resolución del mapa. Finalmente, la descripción de la secuencia de bases de cada uno de los cromosomas, desde su principio hasta su final, es el grado máximo de precisión alcanzable.

Pero ya sabemos que la longitud de cada cromosoma es realmente gigantesca. Llegar a conocer la secuencia completa de siquiera uno de ellos resulta una labor titánica. El más pequeño de los cromosomas humanos, el *cromosoma Y* está constituido por una hebra de alrededor de 60 millones de bases. Reconociendo lo formidable de la tarea de secuenciar todo el genoma, el progreso del conocimiento en lo que se refiere a secuencias de genes humanos fue desarrollado de manera independiente por grupos de investigación interesados en genes específicos. Esto es, hasta 1986, fue cuando empezó a gestarse una iniciativa para lanzar un gigantesco proyecto internacional que lograra descifrar toda la secuencia de los cromosomas humanos en un plazo razonable.

Como todo gran proyecto, el del genoma humano ha generado buen número de controversias. Muchos pensaron que no tenía sentido lanzar un gran programa para secuenciar algo que de todas maneras no íbamos a saber interpretar de inmediato. Además, sabemos de antemano que el 95% de las secuencias presentes en nuestros cromosomas no codifican para ninguna función directamente y que muchas de ellas no son más que múltiples repeticiones de lo mismo. Algunos señalaron que era insensato canalizar los fondos, que normalmente se otorgaban a investigaciones bien cimentadas, en las que se persiguen y estudian genes y funciones específicas, para financiar un gran proyecto que pretende estudiar algo que en el 99% de los casos no vamos a saber entender ni aplicar.

Los argumentos anteriores son bastante sólidos y quizá fueron compartidos por gran parte de la comunidad científica. Pero entre los promotores de la idea de secuenciar el genoma humano, se encontraban algunos de los

personajes más notables y respetados entre los biólogos moleculares (por ejemplo, James Watson, ni más ni menos). Ellos también tenían argumentos muy interesantes. Para los promotores de la idea, el desvío de los fondos no era una realidad, ya que el Proyecto se iría financiando con fondos nuevos, que en realidad ganaría para sí la ciencia biológica, y se accedería al mismo tipo de *status* que tenía la física, con sus proyectos internacionales multimillonarios. Según este grupo, el conocimiento que se deriva de estudiar el genoma como un todo, es mucho más atractivo que el que se obtiene de irlo estudiando por partes. Quizá uno de los elementos más interesantes en favor de la idea es que este gran proyecto internacional promovería de manera definitiva el avance de todas las técnicas relacionadas. De hecho, desde un principio se planteó el proyecto sobre la base de que la eficiencia de las técnicas utilizadas para determinar la secuencia del ADN tendría que incrementarse entre 100 y mil veces. Pero esto se consideraba posible lograrlo en un plazo de menos de 10 años a partir del inicio del proyecto.

Finalmente se impuso el grupo a favor y el Proyecto Genoma Humano ha arrancado desde inicios de esta década. Se han organizado consorcios internacionales en los que participan laboratorios de muchos países. Creo que rápidamente hemos atestiguado la aparición de un fenómeno muy interesante, que es la organización de colaboración a gran escala. De esta Organización empezaron a surgir ideas nuevas sobre cómo distribuir el trabajo, qué requisitos técnicos hay que cubrir antes de empezar a secuenciar en gran escala, etc. En efecto, el gran proyecto internacional ha empezado a generar avances que de otra manera quizá no hubieran ocurrido. Algunos de los aspectos más notables de modo de operar de este gran proyecto internacional ilustran su envergadura y se describen a continuación.

Nuevas técnicas de secuenciación

Los biólogos moleculares se han dedicado con ahínco a secuenciar genes durante los últimos 15 años. Consideremos, sin embargo, que la gran base de datos acumulada hasta el momento está constituida por unos 550 mil segmentos de genes y alrededor de 385 millones de pares de bases en total.⁴ Las cifras anteriores incluyen genes de todos los organismos para los que se ha obtenido alguna secuencia. El esfuerzo para secuenciar todo el genoma humano tendría una magnitud unas 10 veces de lo que se ha hecho hasta la fecha. Claramente, se requiere acelerar y abaratar los métodos de secuenciación.

Impulsados por los fondos y el entusiasmo generado por el Proyecto Genoma Humano, diversos laboratorios y compañías se han dado a la tarea de desarrollar métodos nuevos que en muchos casos representan gran originalidad y ambición.

En estos momentos, por ejemplo, se están activamente desarrollando sistemas para secuenciar utilizando un chip, mediante técnicas de hibridación de ADN. Estos chips consistirían en arreglos de oligonucleótidos pequeños, dispuestos en filas y columnas casi microscópicas. Se ha podido demostrar que si se hace hibridar un segmento de ADN de secuencia desconocida con uno de estos arreglos, la especificidad de la asociación permite observar un patrón de casillas positivas (donde el ADN desconocido se asoció) y negativas (donde no se asoció), a partir del cual es posible deducir, inequívocamente, la secuencia desconocida. La lectura del patrón puede ser miniaturizada y automatizada, utilizando lectores de fluorescencia láser, conectados a una computadora.

En otro notable desarrollo se plantea utilizar sistemas de electroforesis, pero en una novedosa versión que utiliza tubos capilares (de diámetros microscópicos). Este tipo de electroforesis puede ser completamente automatizada, y los experimentos se realizan en mucho menos tiempo que con la electroforesis convencional. Se están construyendo y desarrollando máquinas que contienen arreglos de decenas de capilares, que se utilizan simultáneamente y, nuevamente por fluorescencia láser, se detectan cantidades mínimas de la muestra y alimentan la computadora.

Existen varios diseños adicionales, muy ingeniosos, cuya finalidad es la misma: abaratar y acelerar la adquisición de datos de secuencia. Es importante considerar que antes de iniciar el Proyecto Genoma Humano, la técnica de secuenciación de ADN tenía un costo de entre uno y dos dólares por cada base. ¡Secuenciar el genoma humano con estas técnicas costaría cerca de 5 mil millones de dólares! Los laboratorios que forman parte del consorcio Genoma Humano ya están secuenciando (con técnicas convencionales) con costos de alrededor 20 cts. de dólar por base, pero todavía queda mucho por avanzar.

Técnicas de mapeo y clasificación

Muy pronto quedó claro para los participantes del gran proyecto que el esfuerzo de secuenciación masivo debía diferirse y que, como prerrequisito, se debía tener un mapa y un conjunto de fragmentos donados que representaran segmentos de los cromosomas identificados en ese mapa. Para lograr este objetivo, se han llevado a sus límites otras técnicas muy interesantes.

En primer término, se dispone ahora de métodos automatizados para separar cromosomas individuales. Se puede utilizar una máquina llamada FACS (*fluorescence activated cell sorter*). Con este equipo se produce un flujo de gotitas microscópicas, a partir de una preparación que contiene cromosomas previamente extraídos de células vivas. A través de una **sonda** de ADN que hibrida específicamente con un cromosoma determinado (recordemos que hay ya un buen número de genes identificados para los que se sabe en qué cromosoma se encuentran), y que lleva una marca fluorescente, se puede lograr que el dispositivo FACS identifique qué gotitas contienen un cromosoma marcado, induzca una carga electrostática en esas gotitas y, mediante un campo eléctrico de corta duración, las saque del flujo principal para recolectarlas en un tubo separado. Esta operación se puede realizar miles de veces por segundo, logrando así coleccionar cantidades importantes de cromosomas puros que fueron seleccionados uno por uno. El siguiente paso sería someter el ADN de estas preparaciones a alguna enzima de restricción y clonarlo para obtener una **genoteca**. El problema que se enfrenta es que con un vehículo molecular convencional se pueden albergar solamente un máximo de alrededor de 10 mil pares de bases, así que el más pequeño de los cromosomas humanos requeriría de más de 6 mil clonas para estar representado en la genoteca. Se hizo necesario desarrollar métodos más ambiciosos para tener genotecas más manejables. Uno de los métodos utilizados consiste en generar cromosomas artificiales de levaduras (YACs, por sus siglas en inglés *yeast artificial chromosome*). Los YACs pueden contener cientos de miles o millones de pares de bases. Así, un cromosoma puede ser dividido en sólo algunas decenas o cientos de YACs .

La comunidad internacional del proyecto se ha distribuido el estudio de los cromosomas humanos, y cada laboratorio se está dedicando a generar una genoteca de YACs representativa del cromosoma que le fue encomendado. La actividad de los consorcios internacionales dedicados al Proyecto Genoma Humano constituye un ejemplo muy interesante de la labor científica en gran escala. Aquí, por ejemplo, participan diversos especialistas que provienen de disciplinas variadas. La identificación de "marcadores" físicos y genéticos en los cromosomas humanos ha sido una actividad que se llevó a cabo por mucho tiempo. La descripción del significado preciso de estos términos está fuera de los alcances de este libro; pero baste señalar que existen estos antecedentes, basados en técnicas complejas, y que hoy día se complementan con metodología de ADN recombinante. La reacción en cadena de polimerasa (PCR), por ejemplo, se está utilizando activamente para obtener una clasificación reproducible y confiable de pequeños segmentos marcadores presentes en estas colecciones.

En el momento de la impresión de este libro, acicateada por la publicación de la secuencia de los primeros genomas bacterianos completos (véase la siguiente sección), la organización del Proyecto Genoma Humano estaba considerado iniciar la etapa de secuenciación a gran escala. La expectativa es que se pueda completar la empresa a tiempo, antes del objetivo de 10 años en el año 2003.

El lector seguramente observará que la actividad descrita ha ido generando un gigantesco cúmulo de datos que, ya en el momento presente, sólo son manejables con técnicas computacionales.

La herramienta computacional

Imaginemos la tarea que representa descifrar el mensaje de un solo gene. Nos enfrentamos con una larga secuencia de, digamos 1 000 bases. A simple vista sólo vemos una interminable lista de As, Gs, Ts y Cs. Parte de esta secuencia constituye señalamientos para encender y apagar la expresión del gene (véase el recuadro IV.1). El gene estructural contiene el mensaje que determina la secuencia de la proteína codificada. Nos llevaría un buen rato, utilizando el **código genético**, realizar la simple tarea de escribir la secuencia de aminoácidos de la proteína. Realmente el cerebro humano no es muy eficiente para estos menesteres. Las computadoras son, en cambio, extremadamente eficientes. Una computadora casera haría la traducción en una fracción de segundo.

Afortunadamente, el crecimiento de la eficiencia de las computadoras ha mantenido, y excedido, el paso que lleva la acumulación de datos. El manejo de secuencias biológicas se ha hecho siempre en las computadoras disponibles más potentes. Cuando la base de datos era pequeña (unos cuantos miles de pares de bases) a principios de la década, para su análisis eran suficientes las computadoras de entonces. Hoy día, el análisis de cientos de millones de pares de bases requiere de computadoras muchas veces más poderosas, y que

afortunadamente ya existen.

Desde su inicio, por lo tanto, el Proyecto Genoma Humano ha puesto una gran atención en el desarrollo de la herramienta computacional necesaria para el análisis de los datos que se están generando. El consorcio internacional organiza, de hecho, una red de intercambio de datos, por medio de la red Internet, que enlaza millones de computadoras en todo el mundo. Esta gran comunidad está así conectada continuamente, y puede acceder a los datos generados en todos los demás laboratorios casi simultáneamente a la producción de ellos. Se puede decir, incluso, que el fomento de una cultura de colaboración electrónica internacional en el área biológica, se ha debido en gran parte a la organización y manejo de estas grandes bases de datos.

Secuenciación de otros genomas

De manera simultánea al lanzamiento del Proyecto Genoma Humano, se dio gran impulso a los esfuerzos para secuenciar otros genomas de organismos modelo. Como es de esperarse, estos organismos modelo son los que se han seleccionado para su estudio desde hace varias décadas (véase en el capítulo anterior, Diversos niveles de complejidad"): *Escherichia coli* (bacteria), *Sacharomyces cerevisiae* (levadura), *Caenorhabditis elegans* (gusano simple), *Drosophila sp.* (insecto), *Arabidopsis thaliana* (planta), *Mus musculus* (mamífero).

A la fecha de la última revisión de este libro, la comunidad internacional de biología molecular se encontraba celebrando la aparición de la secuencia completa de los genomas de algunos organismos simples: la organización TIGR (*The Institute for Genomic Research influenzae* y *Microplasma genitalium*). Se dispondrá también de la secuencia completa del primer eucarionte, *Sacharomyces cerevisiae* (levadura de pan). Claramente, ha surgido un nuevo modo de ver el patrimonio genético, ahora como un todo.

La ventaja que representa el conocimiento de estos genomas es clara. En primer lugar, es posible realizar experimentación, altamente sofisticada, con estos organismos. En segundo lugar, representan modelos más simples de organización, donde los fenómenos pueden resultar más fáciles de entender e interpretar.

Uno de los aspectos más gratificantes del estudio de organismos modelo proviene del hecho, descrito en el capítulo I, de que los organismos se parecen mucho unos a otros en el nivel molecular. Así, el descubrimiento de genes en una bacteria, levadura o insecto, con frecuencia puede decirnos algo sobre genes humanos, ya que es muy frecuente que exista una contraparte humana para el gene en cuestión. Esta reflexión nos da paso al tema de la siguiente sección, en donde se ve el tipo de conocimientos que se pueden derivar de comparar unas secuencias biológicas con otras, sea dentro de una misma especie, o entre especies diferentes.

COMPARACIÓN DE SECUENCIAS: FILOGENIA Y PALEONTOLOGÍA MOLECULARES

"Nada tiene sentido en biología, si no es a la luz de la evolución", dice Theodosius Dobzhansky, el célebre evolucionista. La verdad de esta afirmación es particularmente aparente al comparar las secuencias de las moléculas biológicas. Charles Darwin, fundador de la etapa científica de la teoría de la evolución previó que algún día podríamos establecer todas las relaciones filogenéticas existentes entre los organismos vivientes. La posibilidad de utilizar secuencias de ADN y proteínas nos acerca, como nunca antes, a esta meta.

Quizá sea fácil concordar con la idea de que un perro y un lobo tienen mucho en común. Cuando se afirma que hace algunos millones de años no había lobos ni perros, sino un canino que originó a ambos, ésta parece una aseveración bastante lógica. Sin embargo, si alguien dice que tenemos más en común con una levadura de pan que con las bacterias del yogurt podría intrigar más en qué se basa quien afirme tal cosa. Desde luego que los estudiosos de la evolución han observado, desde hace más de un siglo, mucho más que la apariencia externa y otros caracteres superficiales para establecer relaciones filogenéticas. Pero la aportación de la biología molecular y el ADN recombinante ha revolucionado este campo en los últimos años.

El mismo hecho que posibilita el ADN recombinante sugiere la similitud molecular de los organismos vivos. Todos contienen ADN, proteínas, ribosomas, y se rigen por el mismo código genético. Aunque este hecho era aceptado desde hace varias décadas, la acumulación de datos de la secuencia que surge del empleo de la ingeniería genética le ha dado cuerpo y solidez. Hoy día podemos comparar las secuencias de diversos genes y proteínas, a lo ancho de toda la escala filogenética, y responder preguntas extremadamente interesantes.

El parecido entre un organismo y otro, revelador de un origen común, se manifiesta en las secuencias de sus

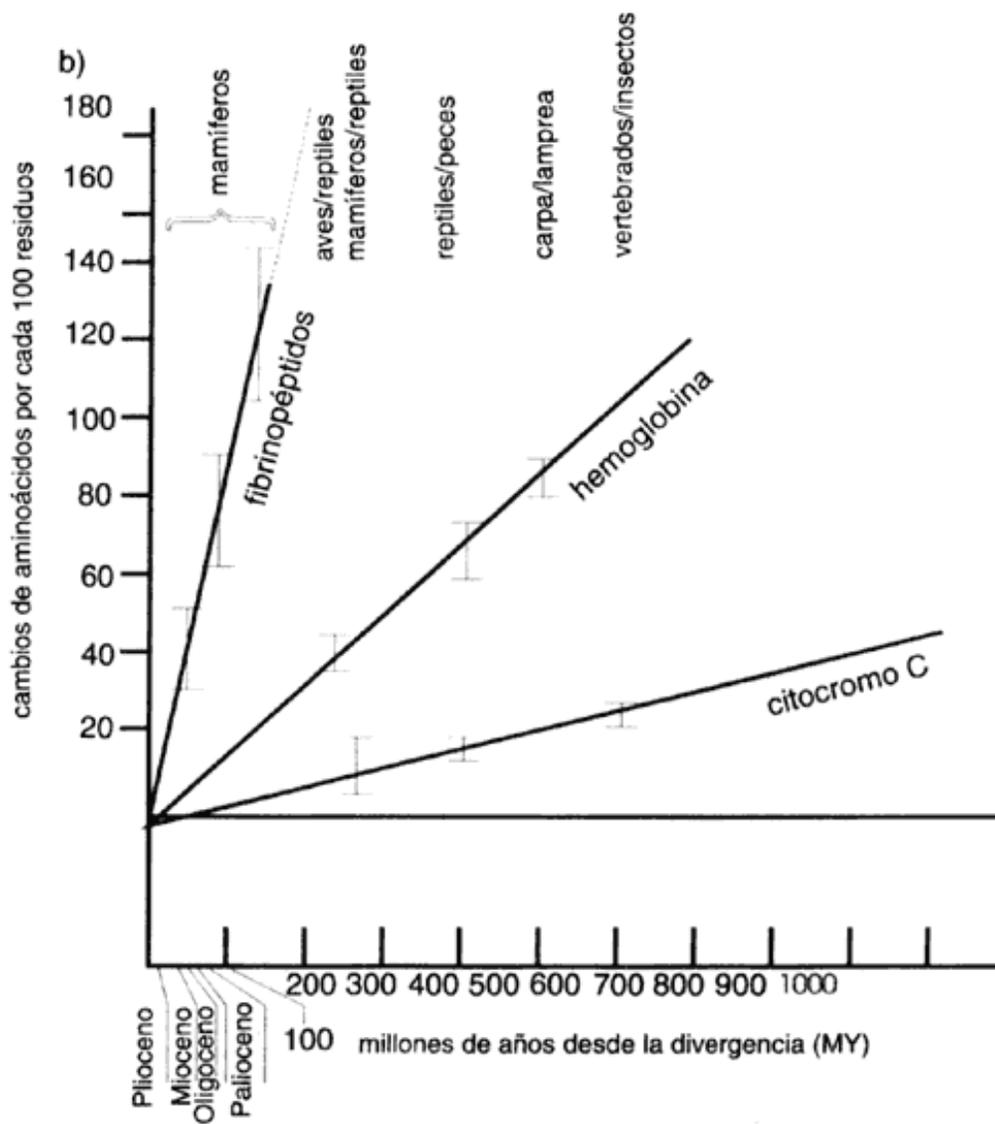
genes. Por ejemplo, entre una persona y otra, más del 99.9% de las secuencias son iguales. Entre un humano y un chimpancé, alrededor de 99% de la secuencia es igual. (Tomemos en cuenta, sin embargo, que una diferencia de 1%, en un genoma de 3 mil millones de bases, constituye todavía una cifra elevada: 30 millones de bases distintas. No sabemos cuántas o cuáles de las diferencias, a nivel del genoma, son importantes para dar origen a las diferencias observables entre una especie y otra.) Estas similitudes y diferencias se pueden analizar por técnicas que evalúan el parecido global del ADN, mediante técnicas de velocidad de reasociación entre un ADN y otro, pero se pueden analizar a un nivel más fino, comparando las secuencias de genes individuales. Hay genes (y sus correspondientes proteínas) que difieren más que otros cuando se comparan dos especies. Algunas de las proteínas componentes de las células requieren conservar su estructura y secuencia de manera precisa, mientras que otras pueden mantener su función útil aunque su secuencia varíe considerablemente. Lo interesante de esta situación es que podemos utilizar ciertos genes para comparar especies muy cercanas (o poblaciones dentro de una misma especie) y otros para comparar especies muy lejanas (véase el recuadro IV.6). Por medio de la comparación de secuencias de genes se han realizado hallazgos que empiezan a revolucionar nuestra concepción de las relaciones entre los seres vivientes. Tal como lo afirma Russell Doolittle, reconocido analista de secuencias moleculares, quien se considera un paleontólogo, pero no usa palas ni desentierra huesos; sus herramientas son una computadora y los datos en secuencia que se generan en cientos de laboratorios alrededor del mundo.

RECUADRO IV.6. *Los relojes moleculares*

La disponibilidad de secuencias de biomoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) abre una muy importante ventana para la observación de las relaciones entre unos organismos y otros. Es sólo recientemente (en los últimos 50 o 60 años) que estas secuencias se empezaron a conocer y, como ya se explicó, en los últimos 15 años ha habido una explosión de datos al respecto. Anteriormente, los biólogos tenían que recurrir a características externas para clasificar a los organismos. Las diferencias morfológicas son suficientes para muchos propósitos, aunque insuficientes e inexactas para muchos otros. En la actualidad se dispone de nuevos objetos de comparación: las moléculas que nos pueden dar diferencias cuantitativas a velocidades cada vez mayores.

Pensemos, por ejemplo, que comparamos la secuencia de aminoácidos de una proteína en particular, digamos el citocromo C. Es natural pensar que todos los vertebrados muy parecidos entre sí, deberían contener citocromo C. Tal es, desde luego, el caso. Esta proteína, que participa en el manejo de energía, está presente en todas las células que usan oxígeno para vivir. Al comparar las secuencias de aminoácidos de los diferentes citocromos C, provenientes de diversos animales, observamos algo muy interesante: entre más parecidas son dos especies animales entre sí, más parecidos son sus citocromos. En el cuadro (A) se anota el número de aminoácidos de diferencia (de un total de 104), así que tenemos una medida cuantitativa del parecido de unas especies con otras, por lo menos de acuerdo con lo que nos dicen sus moléculas de citocromo C.

Esta es una propiedad interesantísima de las macromoléculas biológicas: la similitud de su secuencia se puede cuantificar. La razón de que las moléculas sean diferentes se debe a las diversas fuerzas de mutación y selección que han estado operando en los organismos vivos. La explicación evidente del porqué del parecido de las moléculas es que provienen de un antepasado común y que, con el paso del tiempo, las poblaciones de cada especie fueron aceptando diversas mutaciones que no alteraban la función de la proteína, o bien que le conferían alguna ventaja. Así, el número de diferencias entre la secuencia de una proteína particular, entre una especie y otra, refleja el tiempo que ha pasado desde que una especie ancestral dio lugar a dos especies separadas. Para entender mejor este concepto pensemos, por ejemplo, qué pasaría si se compusiera una canción y se fuera heredando de una generación a otra por tradición oral, por personas que migraran a diversos países: al cabo de varias generaciones, sin embargo, las versiones de



La teoría de Eva mitocondrial

Para comparar poblaciones humanas, se pueden usar secuencias de las mitocondrias (que son organelos celulares que se encargan de transformar energía). Estos organelos contienen ADN probablemente de una simbiosis en la que una bacteria colonizó el interior de una célula **eucarionte**. Las mitocondrias se heredan fundamentalmente de la madre, dado que los espermatozoides contribuyen con una ínfima proporción de las mitocondrias al fecundar el óvulo. Esto hace que sea más fácil establecer relaciones entre grupos cercanos utilizando secuencias de ADN mitocondrial.

En un estudio reciente, cuyas conclusiones son aún controvertidas, se utilizaron secuencias de ADN mitocondrial para establecer que todas las poblaciones humanas provienen de una hembra que vivió en África hace unos 200 mil años. Esta interpretación ha establecido un serio cuestionamiento sobre los conceptos clásicos de la paleontología humana. Es decir, la afirmación de que todos los humanos que vivimos actualmente descendemos de una hembra en particular (por lo que se refiere el estudio a Eva), realmente debe interpretarse como que se analizó el linaje femenino, que se observa en las mitocondrias, pero desde luego en todo el proceso, y desde incontables generaciones atrás, los humanos descienden de machos y hembras reproduciéndose de manera normal.

Por otra parte, lo que el estudio realmente puede indicar, es que todos los humanos descienden de una población africana que vivió hace unos 200 mil años.

La controversia que este tipo de estudios suscita ilustra un aspecto muy interesante del quehacer científico. En este caso, los paleontólogos tradicionales cuentan con un importante cúmulo de datos, proporcionados por el registro fósil, y toda una serie de teorías e interpretaciones de estos datos. La revolución establecida por la disponibilidad de secuencias de moléculas biológicas resulta de que algunas de las teorías en boga se ven reforzadas, mientras que otras se ponen en entredicho. Los científicos, al igual que todos los seres humanos, establecen lazos afectivos con sus creaciones (por ejemplo, sus teorías), y se apegan a los métodos de análisis que les son familiares. Seguramente, la irrupción de los biólogos moleculares en la escena de la evolución natural y, en particular, la humana, continuará suscitando controversia. A la larga, será de la integración de las diversas disciplinas de donde obtendremos las respuestas más satisfactorias a nuestra curiosidad sobre el origen del hombre.

Refinamiento de la clasificación de organismos

El uso de ADN mitocondrial permite la comparación de poblaciones humanas, usando secuencias de genes que han cambiado en forma extraordinariamente lenta se puede atizar en las relaciones entre organismos mucho más distantes. Los genes que codifican para el ARN, que forma parte de los **ribosomas** (véase el capítulo I, el recuadro I.2), se parecen tanto que podemos usarlos para comparar grupos tan lejanos como plantas con animales, o bacterias y hongos, por ejemplo.

Los datos generados por la comparación de secuencias de ARN ribosomal indican que la clasificación clásica de los reinos (plantas, animales, hongos, monera y proctista), no corresponde a las ramas más primigenias. En su lugar se sugiere introducir una nueva clasificación, usando un nuevo concepto de tres dominios: bacteria, arquea y eucaria. De manera similar, mediante la comparación de secuencias de genes, cuya divergencia es intermedia, se está revisando la clasificación a todos los niveles, estableciendo relaciones más seguras entre diversas plantas, animales, etcétera.

Recuperación de ADN fósil mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Como ya mencionamos en el capítulo II, la *reacción en cadena de polimerasa* permite obtener grandes cantidades de ADN a partir de cantidades minúsculas, incluso de una sola molécula. Así pues, basta el material genético de unas cuantas células para poder estudiarlo. Esta potente herramienta está siendo utilizada en todos los ámbitos del ADN recombinante, en sus facetas básica y aplicada, a menos de 10 años de su creación.

Una de las aplicaciones más sorprendentes del método de la PCR lo constituye la recuperación y secuenciación de segmentos de genes de muestras muy antiguas. Varios investigadores pensaron que era concebible que material biológico preservado por diferentes procesos de fosilización contuviera aún cantidades detectables de ADN. Así pues, se dieron a la tarea de tratar de aislar algunos de estos segmentos de material genético usando la PCR. Para sorpresa de muchos, efectivamente ha sido posible amplificar y secuenciar diversos segmentos de ADN a partir de muestras de increíble antigüedad. El proceso de fosilización por ámbar ha sido especialmente benigno para la preservación del material biológico. El ámbar es un material resinoso, producto secretado por los árboles, que en ocasiones atrapa materiales biológicos como hojas o pequeños insectos. Algunas de las muestras preservadas en ámbar tienen varios millones de años de antigüedad y muestran con toda claridad los caracteres morfológicos de los seres que ahí quedaron atrapados. Entre los ejemplos más notables de muestras estudiadas hasta la fecha se encuentran los restos de una planta de unos 40 millones de años de antigüedad, y de un gorgojo que cuenta con alrededor de 120 millones de años.

Es importante hacer notar que todavía existe controversia acerca de la validez de este tipo de estudios. Es de esperarse que el ADN en muestras de millones de años de antigüedad se encuentre severamente dañado y fragmentado por procesos químicos espontáneos. En opinión de algunos, aun la increíble preservación del aire y el agua que el ámbar parece ofrecer no sería suficiente para mantener el ADN en un estado tal para ser estudiado. Asimismo, se acepta unánimemente que la recuperación de ADN de muestras, aun de las relativamente recientes (por ejemplo, momias o animales extintos hace unos pocos miles de años), será siempre fragmentaria, incompleta.

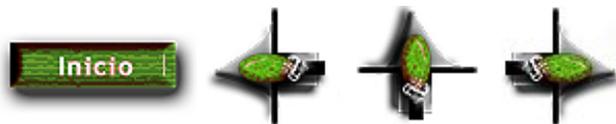
Esta capacidad parcial de atisbar en el pasado de la evolución biológica promete una gama muy interesante de estudios que indudablemente contribuirán a nuestros conocimientos. Ya sabemos, por ejemplo, que los mamuts eran parientes más cercanos del elefante africano que del asiático. O que el tigre dientes de sable pertenecía a la familia de los grandes felinos, muy cercano a leones y tigres, pero más alejado de los pumas.

Las posibilidades de esta tecnología también ha incitado a la imaginación. La idea central de la novela *Parque Jurásico*, del escritor Michael Crichton, se basa, precisamente, en esta capacidad real de recuperar ADN muy antiguo. Evidentemente, la distancia que existe entre aislar y secuenciar algún pequeño fragmento de ADN prehistórico y la de reconstruir el genoma completo de un organismo es abismal. Un obstáculo quizá todavía más importante lo constituye el hecho de que el ADN, por sí mismo, no es capaz de realizar función biológica alguna. Requiere estar empaquetado en cromosomas y con toda la maquinaria celular a su disposición para poder expresarse. Durante miles de millones de años una célula sólo ha provenido de otra célula, llevando consigo, no sólo el ADN, sino también una buena parte del resto de los componentes celulares. Creo que no es difícil predecir que la reconstrucción total de la más simple de las células (por ejemplo, la de una bacteria), a partir de sustancias químicas aisladas, es una empresa de tan gigantescas proporciones que habrán de pasar muchas décadas antes de que pueda lograrse.

REFLEXIÓN SOBRE EL IMPACTO DEL CONOCIMIENTO BIOLÓGICO

En el capítulo que aquí concluye, se presenta una muestra mínima de la avalancha de conocimientos generados a partir del ADN recombinante. Si nos detenemos un minuto a reflexionar, las mujeres y los hombres que vivimos hoy somos los primeros que tenemos acceso a un conocimiento más o menos coherente de nuestra naturaleza biológica. La fechas que marcan la formulación y demostración de conceptos verdaderamente fundamentales son todas increíblemente recientes!

Las decenas de miles de generaciones de *Homo sapiens* que nos precedieron, han centrado sus reflexiones en las facetas trascendentes (religiones, sistemas filosóficos) y sociales de la naturaleza humana. Dos conceptos inherentes a nuestra naturaleza psicológica y biológica fueron (por necesidad) de índole tentativa o especulativa. Sólo ahora contamos con los elementos para integrar una nueva concepción del cosmos y de nuestra naturaleza. Es éste un gran reto para nuestra generación y las que nos sucederán.



[Nota 2] 

2. Note el lector que éste es un proceso "natural" del tipo de la recombinación que ocurre en todo tipo de organismos, pero que este caso produce una molécula de ADN recombinante, entre el ADN de un virus y el de su organismo hospedero. ¡El ADN recombinante no resulta ser, después de todo, una invención humana!

 Inició

3. Los ratones a los que se les inactivan genes específicos, llamados "Knock Out" constituyen una poderosa herramienta para evaluar el papel de genes específicos en organismos superiores completos.

Inicio

[Nota4] 

4. Estas cifras corresponden al otoño de 1995. Tómese en cuenta que la velocidad creciente de acumulación de información tiende a duplicar su número cada año y el paso se acelera continuamente.

Inicio

V. ALTERANDO LOS PLANOS DE LA VIDA.

La nueva biotecnología

COMO ya hemos apuntado, la humanidad ha utilizado para su beneficio a los seres vivos desde épocas inmemoriales. Muchas veces por accidente, y otras con gran ingenio y acuciosidad, se han ido descubriendo maneras de obtener mejoras en las variedades animales y vegetales que utilizan las diversas culturas, así como en los procedimientos que emplean para servirse de ellas. Las revoluciones agrícolas, la domesticación de animales y la producción de vino, cerveza, queso y yogurt, no son más que diversas manifestaciones de la biotecnología.

Lo que podemos llamar "nueva biotecnología" o biotecnología moderna, es la que se sirve de las técnicas de ADN recombinante para realizar la mejora de los seres vivos, con miras a su utilización. El impacto del ADN recombinante ha sido profundo. Se habla hoy, por tanto, de que nos encontramos en la era de la biotecnología.

En este capítulo apuntaremos algunas de las maneras como se pueden utilizar las capacidades de identificación y manipulación de genes para la obtención de productos o procesos útiles al hombre. Con base en los conceptos fundamentales descritos en los capítulos anteriores, creo que será más fácil comprender las implicaciones que tienen estos avances tecnológicos, así como las dificultades y limitaciones que condicionan su desarrollo.

Desde los albores de la ingeniería genética muchos intuyeron su inmenso potencial. Sin embargo, en un principio, las metodologías y herramientas biológicas con las que se contaba eran muy limitadas. En poco más de 15 años disponemos ahora de un verdadero arsenal de técnicas que permiten avances cada vez más importantes. Creo que, a pesar de que nuestra capacidad de asombro se encuentra muy disminuida, la moderna biotecnología nos seguirá maravillando durante un buen tiempo. Los grandes avances también pondrán a prueba nuestra capacidad de adaptación y asimilación de cambios, en el contexto de los valores prevalentes en nuestras sociedades.

UNA APLICACIÓN INMEDIATA: PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

Casi inmediatamente después de que se realizaron los primeros experimentos de ADN recombinante, se iniciaron intentos para aplicar esta nueva capacidad (véase recuadro V. 1). Parecía claro que si se era capaz de transferir un gene externo al interior de una bacteria, también se podría hacer que esa bacteria fabricara el producto codificado por este gene. Surgió entonces la idea de producir proteínas útiles mediante este mecanismo. Es importante hacer notar que ésta es sólo la aplicación mas simple e inmediata de la ingeniería genética: obtener el producto de la expresión de un solo gene dentro de la bacteria más conocida. Aun así, en la época en que se iniciaron los trabajos pioneros en este campo, expresar un gene externo en *E.colí* constituía un reto de proporciones significativas.

RECUADRO V.1. *Las compañías de biotecnología. Fundación de Genentech.*

En 1975, unos dos años después de que los primeros experimentos de ADN recombinante habían sido logrados, algunas personas estaban rumiando la idea de que esta metodología podría tener importantes aplicaciones comerciales. En forma independiente, Herbert Boyer (véase en el capítulo II, "Concepto de clonación molecular") y Robert Swanson, estaban tratando de explorar la posibilidad de que esto ocurriera. Estos dos personajes representaban los dos elementos requeridos: Boyer en la ciencia y Swanson en la comunidad financiera y comercial. Ambos habían ya tocado otras puertas, mismas que no se habían abierto. Boyer había planteado la idea de producir proteínas humanas (por ejemplo, hormonas) utilizando el concepto de donación molecular que él estaba desarrollando. Swanson también había hecho contacto con algunas compañías y con otros prominentes biólogos moleculares. Las respuestas que uno y otro recibían eran vagas y poco

entusiastas.

Boyer y Swanson eran dos extremos destinados a unirse. En enero de 1976, Boyer recibió la llamada de Swanson y se manifestó entusiasta. Decidieron reunirse y, mientras se tomaban una cerveza en un bar cercano a la Universidad de California, en San Francisco, plantearon la fundación de una compañía en la que se intentaría elaborar un primer producto mediante ADN recombinante. Decidieron fundar la compañía aportando capital semilla, en partes iguales, consistente en cinco mil dólares (Boyer tuvo que pedir prestada su parte).

Lo que siguió a este histórico encuentro fue ponerse en contacto con el grupo de City of Hope, en el área de Los Ángeles, que manejaba las técnicas de síntesis química de ADN. Los genes que se proponían clonar y expresar no estaban disponibles y tendrían que ser sintetizados químicamente.

Así, convocando la participación de algunos científicos osados y convenciendo a inversionistas a arriesgar su dinero en la nueva biotecnología, se fue constituyendo la primera compañía destinada específicamente a explotar las posibilidades del ADN recombinante: Genentech.

En la actualidad, la compañía Genentech emplea a miles de personas, y sus acciones fueron ofertadas públicamente hace algunos años por muchas veces su valor nominal, haciendo millonarios a los socios fundadores. Esta empresa lucha por mantener nuevos productos en el mercado, estableciendo competencia y alianzas con las grandes compañías farmacéuticas.

En los últimos 15 años las compañías dedicadas a la nueva biotecnología se han multiplicado. Además, las grandes compañías farmacéuticas y químicas han capacitado y formado en sus departamentos de investigación a grupos de investigadores que emplean el ADN recombinante. En efecto, el ADN recombinante dio origen a importantes aplicaciones comerciales, constituyendo una actividad que significa miles de millones de dólares de inversión para mercados en continuo crecimiento.

La proteína con la que se decidió probar si tal objetivo era posible fue la *somatostatina*. Esta es una pequeña hormona proteica cuya principal virtud es, precisamente, ser una molécula pequeña. Al final de los años setenta no era aún posible obtener genes humanos a partir de su fuente natural, por lo que se decidió sintetizar químicamente el gene correspondiente (véase en el capítulo II el recuadro II.4). A este trabajo siguió otro con un objetivo más útil: expresar la hormona insulina humana en *E. coli*. Hasta entonces, toda la insulina que se utilizaba para el manejo de diabéticos se obtenía de cerdos sacrificados en los rastros, con la consecuente amenaza de escasez. Además, la insulina porcina no es idéntica a la humana, por lo que su uso causaba, en ocasiones, efectos secundarios indeseables. Nuevamente, el gene fue sintetizado químicamente (por supuesto, con la secuencia correspondiente exactamente a la hormona humana) y donado en vectores que permitían su expresión dentro de la bacteria, es decir; situado frente a regiones que promovieran su transcripción (véase el recuadro IV 1). A partir de entonces, la producción bacteriana de insulina humana se ha convertido en un proceso comercial, y el producto se puede comprar hoy día en las farmacias.

La corta descripción anterior no hace justicia a la gran cantidad de problemas prácticos a los que se enfrentaron antes de lograr el objetivo. Pero los obstáculos no impidieron que se iniciaran los trabajos para obtener otras proteínas humanas de gran valor. Entre éstas podemos contar la hormona del crecimiento, útil en los casos de enanismo, entre otras. Los genes necesarios para esta segunda generación de productos proteicos empezó a provenir de sus fuentes naturales; en el caso de la hormona del crecimiento, a partir de ADNc (véase el recuadro III.2) obtenido de la glándula hipófisis. Por desgracia, muchas de estas proteínas se producen naturalmente con alteraciones propias de los organismos eucariontes, que ocurren después de la **traducción**, y que no sucede en las

células bacterianas. Se hacía necesario entonces desarrollar nuevos métodos de expresión de proteínas, utilizando células **eucariontes**.

Expresión de proteínas en sistemas no bacterianos

Conforme las técnicas de ingeniería genética fueron avanzando, diversos microorganismos y células en cultivo empezaron a ser susceptibles de **transformación**. Así, hoy disponemos de levaduras y otros hongos unicelulares (que son organismos **eucariontes**) que se utilizan como fábricas de proteínas. También se emplean líneas celulares de insectos o de seres humanos que se cultivan libremente en botellas. Con estos sistemas se obtienen proteínas exactamente equivalentes a las humanas, o de alguna otra especie que se requiera.

Además de las hormonas, existen otras muchas proteínas de utilidad terapéutica que se han obtenido mediante ingeniería genética (véase el recuadro V.2), gracias a esta batería de sistemas de expresión, entre las que encontramos vacunas, factores de crecimiento y regulación celular, factores de coagulación, etcétera.

Quizás el avance más significativo, en relación con la fabricación de proteínas de alto valor; sea, sin embargo, la posibilidad de expresarlos en animales o plantas transgénicos (véase más adelante).

Proteínas de interés industrial

Hemos revisado algunas aplicaciones médicas de las proteínas producidas por la ingeniería genética, que han sido las más abundantes hasta el momento, pero de ninguna manera las únicas posibles. Como se dijo anteriormente, si analizamos nuestro entorno desde la perspectiva de un biólogo molecular podríamos decir que la biosfera es producto de las proteínas. Todas las transformaciones que ocurren por mediación de los seres vivos son, de una u otra manera, llevadas a cabo por las proteínas. Por ejemplo, materiales como la madera, el hule, el algodón y la lana. También las funciones más complejas como la visión, la fotosíntesis, etcétera.

RECUADRO V.2. Proteínas terapéuticas expresadas por la ingeniería genética

Desde que los trabajos pioneros lograron la expresión de la insulina humana en bacterias —realizados en la compañía Genentech— se han empleado técnicas de ADN recombinante para obtener muchas otras proteínas terapéuticas útiles. Probablemente varios cientos de proyectos se conducen en la actualidad en esta área. Es importante, sin embargo, tomar en cuenta que los aspectos regulatorios que es necesario desahogar para llevar una invención al campo comercial son difíciles. Es notable, por ejemplo, que la insulina humana, cuyo desarrollo se concibió en 1976, fue aprobada sólo hasta 1983. En la lista que se presenta a continuación se enumeran los productos aprobados hasta mediados de 1995, pero año con año se van agregando muchos más, a velocidad cada vez mayor.

<i>Afección</i>	<i>Propuestas terapéuticas seleccionadas</i>	<i>Productos avanzados</i>
Enfermedades Autoinmunes		
Esclerosis múltiple	(Mecanismos inciertos)	INF-βζ Anticuerpo
Artritis reumatoide	Anticitocina	anti-TNF-α

Deficiencias sanguíneas		
Anemia	Estimular la producción sanguínea	Eritroproyetina
Sustitutos sanguíneo	Reemplazo	Hemoglobina
Quimioinducción	Estimular la producción de células sanguíneas	G-CSF
Hemofilia	Reemplazo	Factor VIII
Cáncer		
Transplante de médula	Proliferación de células inmunes	G-CSF
Leucemia	Estimulación inmunológica	INF- α
Linfoma de células T	Aumentar la aniquilación de células tumorales	Fusión Toxina-IL-2
Melanoma	Estimulación inmunológica Vacunación	IL-2. Vacuna vs Melanoma
Cáncer renal	Estimulación inmunológica	IL-2/INF- γ
Enfermedades cardiovasculares		
Infarto del miocardio	Disolución de coágulos	tPA
Angina reestenosis	Bloquear agregados de plaquetas	Anticuerpo GP-IIIa
Enfermedades genéticas		
Fibrosis quística	Adelgazamiento de moco	DNasa
Diabetes	Reemplazo hormonal	Insulina Humana
Enfermedad de Gaucher	Reemplazo enzimático	Glucocerebrosidasa
Deficiencia del crecimiento	Reemplazo hormonal	hGH
Agentes infecciosos		
Virus de la hepatitis	Estimulación inmunológica Vacunación	INF- α Vacuna de subunidad
VIH (agente del sida)	Estimulación inmunológica	INF- α /IL-2

Virus papiloma	Vacunación	
<i>Bordetella pertussi</i>	Estimulación inmunológica Vacunación	INF- α
Padecimientos inflamatorios		
Alergia	Activación de las células cebadas	Anticuerpos IgE
Padecimientos trasplante vs. huésped	Bloquear-receptor IL-2 Anti-endoxina	Anticuerpo
Shock séptico	Anticitocina	BPI
Enfermedades del sistema nervioso		
Esclerosis amiotrófica lateral	Fortalecer la supervivencia neuronal	IGF-1
Trauma	Bloqueo del daño oxidativo	PEG-SOD
Lesiones en la piel		
Curaciones de lesiones	Modular la función celular	TGF- β /PDGF

INF = interferón.

TNF- α = factor de necrosis tumoral α

G-CSF = factor estimulante de colonias granulocítico

IL2 = interleucina-2

tPA = Activador de plasminógeno tisular

GP = Glicoproteína

hGH = Hormona humana de crecimiento.

BPI = Proteína bactericida/incrementadora de permeabilidad.

IGF-1 = factor de crecimiento tipo insulina.

PEG-SOD = Superóxido dismutasa-polietilenglicol.

TGF- β /PDGF = β /factor factor de crecimiento transformante de crecimiento paquetario.

VIH = Virus de inmunodeficiencia humana.

La sobreproducción de proteínas por medio de la ingeniería genética permite el acceso a las herramientas que utilizan los seres vivos para transformar su entorno y realizar sus funciones. Con estas proteínas se pueden efectuar procesos útiles y novedosos. Véase el capítulo siguiente, "Biotatálisis e ingeniería de proteínas" donde se tratará este aspecto con más detenimiento.

ANIMALES TRANSGÉNICOS, GRANJAS MOLECULARES

Hace unos siete años, en una reunión científica conocí a un investigador, quien estaba por regresar a México, y que durante su doctorado había desarrollado métodos mejorados para el cultivo de células animales. Su trabajo le permitía la producción directa de anticuerpos en estas células. Cuando le pregunté si sentía que éste sería el futuro de la producción de anticuerpos (en vez de producirlos naturalmente en animales como conejos, caballos o cabras, como se hacía hasta entonces), él contestó que creía que más bien se haría en animales transgénicos. En aquel entonces me pareció muy importante que este científico, recién doctorado, tuviera la visión para prever que su trabajo podría ser desplazado en el futuro por otros avances. Por otra parte, pensé que la posibilidad que comentábamos estaba muy distante en el futuro.

Sorprendentemente, para mí, podemos decir que este futuro ha llegado ya. Las investigaciones con sistemas de microinyección y cultivo de embriones, en la actualidad, permiten introducir genes a varias especies en forma estable, entre las que se encuentran las ovejas. Quizás algunos lectores intuyan la implicación de esto. A partir de las ovejas se obtienen grandes cantidades de leche, rica en proteínas. En efecto, en la medida que sabemos acerca de la expresión de los genes de la glándula mamaria, podemos pensar en manipular este sistema para que se elaboren en ella productos diferentes. Utilizando estos conceptos, ya existen los primeros animales transgénicos que producen proteínas de interés médico. Uno de los primeros ejemplos lo constituye el caso de la α -1 antitripsina humana, que se utiliza en la terapia de una carencia hereditaria, bastante frecuente, que condiciona el enfisema. Desgraciadamente, aunque la administración de esta proteína permite una vida saludable, había que obtenerla de suero humano, en grandes cantidades, para sostener las dosis requeridas por un alto número de enfermos. Esta situación orilló al gobierno de Estados Unidos, por ejemplo, a regular y limitar el uso de este tratamiento, por lo que resultó un objetivo atractivo para desarrollar un sistema de alta producción. Para lograr este propósito, investigadores británicos crearon moléculas de ADN recombinante donde se combinó el gene que codifica para la α -1 antitripsina humana, colocado frente a la región regulatoria del gene de la β -lactoglobulina (una de las proteínas de la leche) ovina. Al microinyectar este gene en embriones de borrego, se logra, en algunos casos, integrar establemente al genoma, y que se herede en generaciones sucesivas. En algunas de estas ovejas transgénicas, el gene se expresa específicamente en la glándula mamaria, y se obtiene leche con grandes cantidades de α -1 antitripsina humana. Estas ovejas han producido hijas que mantienen esta característica. ¡Se dispone ahora de un rebaño de ovejas que constituyen una fuente inagotable de la proteína!

La posibilidad de utilizar "granjas moleculares" en las que los animales producen leche proteínas de altísimo valor y utilidad es realmente un triunfo mayúsculo de la biotecnología moderna. Pensemos que, con gran seguridad, en pocos años los enfermos con deficiencias de alguna de estas proteínas, por ejemplo los hemofílicos, dispondrán de una fuente relativamente barata para conseguirlas. Recientemente se anunció ya la obtención de *vacas* transgénicas.

Los animales transgénicos también pueden usarse para muchos otros propósitos. Me limitaré a citar sólo dos ejemplos ilustrativos adicionales:

El primer ejemplo lo constituye la creación de animales modelo para experimentación, como ratones con genes que los predisponen a adquirir cáncer; o ratones con genes mutantes que manifiestan síntomas como los de la fibrosis quística (véase en el capítulo III, "Aislamiento de los genes responsables de enfermedades hereditarias"). En otro ejemplo ilustrativo, en el que participarán investigadores del Instituto de Biotecnología de la UNAM, se explorará la posibilidad de utilizar mosquitos transgénicos, resistentes al plasmodio (protozoario causante del paludismo), para controlar la proliferación de este microorganismo en las zonas tropicales. La lista de posibilidades, en proceso y en proyecto, es verdaderamente impresionante.

PLANTAS TRANSGÉNICAS, LA NUEVA REVOLUCIÓN VERDE

Más adelante en este mismo capítulo ("El diagnóstico molecular", p. 132) describiremos los procedimientos

fundamentales para la producción de plantas transgénicas. Nos preguntamos ahora ¿qué posibilidades se abren para beneficiar las plantas existentes, por medio del trasplante de genes? Aun cuando, en este momento, las probabilidades técnicas permiten visualizar fundamentalmente la introducción de sólo un gene a la vez, ya se han obtenido logros notables. Analicemos algunos ejemplos.

Uno de los problemas que se han generado a partir del cultivo intensivo es el uso exagerado de fertilizantes y pesticidas. Debido a esto, el desarrollo de bioinsecticidas ha recibido importante atención en los últimos tiempos. En particular, el microorganismo, *Bacillus thuringiensis*, que naturalmente produce una proteína tóxica (toxina BT) para diversas especies de artrópodos (insectos y arácnidos, por ejemplo). Estas bacterias pueden ser cultivadas y administradas a los cultivos, y constituyen un insecticida biodegradable y seguro. El paso siguiente consistió en introducir el gene que codifica para esta toxina a una planta de tabaco (por supuesto fusionado a una región regulatoria que permitiera su expresión en la planta, particularmente en las hojas). Las plantas transgénicas resultantes son inmunes a las larvas de palomillas que normalmente merman este cultivo. Al cabo de consumir un poco de la hoja, la larva se vuelve inactiva y muere, envenenada por la toxina BT. Es importante resaltar que esta toxina es completamente inocua para otros animales, incluido, desde luego, el ser humano.

Una característica muy interesante del reino de las plantas es que para vivir se han adaptado a ambientes extremos, ya que no pueden huir de ellos. Así, encontramos plantas capaces de vivir en condiciones de sequía, salinidad, etc. También los vegetales han desarrollado funciones para defenderse de ser ingeridas indiscriminadamente. Cada especie animal gusta sólo de ciertas plantas y las puede comer sin enfermarse. (Por encima de todo esto, los seres humanos tendemos a ser muy selectivos en nuestra alimentación. Algunos de nosotros sólo compramos frijol "flor de mayo", sin importarnos si nos resulta un poco más caro, o si sus propiedades alimenticias no son tan buenas como las de alguna otra variedad. Así que no todas las características apreciadas se encuentran juntas en la misma planta. Típicamente encontraremos que unas variedades son sabrosas, otras son nutritivas, otras más, resistentes a las inclemencias del clima, etcétera.)

La nueva biotecnología de plantas nos permitirá ir introduciendo, al principio uno por uno, los genes que se vayan identificando como responsables de conferir ciertas características atractivas a las variedades de plantas que nos son más útiles.

El primer ejemplo de una planta transgénica que se encuentra en explotación comercial atañe precisamente a uno de los aspectos "frívolos" de nuestras costumbres alimenticias. En relación con este caso, recuerdo algo que hoy me divierte mucho y se remonta a cuando me encontraba en California, capacitándome en la tecnología de síntesis química de ADN. Mi hermano Jorge, quien se dedica a la ecología, se encontraba entonces en Inglaterra haciendo su doctorado. Al saber que yo estaba participando en la tecnología, entonces naciente, de la ingeniería genética, me decía en una de sus cartas, que hiciera el favor de clonarle "el gene del sabor de los jitomates". Los jitomates ingleses no sabían a nada. Este no pasaba de ser un comentario locuaz en aquella época. A 13 años de distancia se convirtió en algo visionario.

Resulta que los jitomates, como muchas otras frutas, siguen madurando una vez que se cortan de la planta, Pero no es lo más adecuado porque no alcanza el mejor sabor y, por supuesto, eventualmente hace que la fruta se pudra. Se recurre entonces a cortar la fruta verde para prolongar su vida de anaquel. Cuando llega al consumidor parece madura, pero su sabor deja mucho que desear. Para resolver este problema, una compañía biotecnológica californiana desarrolló el jitomate *flavr-savr* (sabor rescatado). El truco utilizado es muy ingenioso. El objetivo era "apagar" la expresión del gene que codifica para la enzima fundamentalmente responsable del proceso de maduración (y putrefacción posterior), pero había que hacerlo justo después de que la fruta se cortara de la planta. De esta manera, se podía dejar madurar el jitomate hasta su término, cortarlo, y suspender el proceso de maduración, prolongando la vida de anaquel de una fruta que ya adquirió su sabor óptimo. El mecanismo para inhibir la expresión del gene mencionado se conoce como tecnología antisentido. Con esta tecnología se transforma el organismo con un gene artificial que contiene una región de control, activado en el momento apropiado, seguido de un segmento que, al ser **transcrito**, produce un ARN complementario (es decir, en sentido contrario) al gene que se desea inhibir. De esta manera, se pueden "apagar" genes selectivamente en determinadas condiciones, casi sin alterar el resto de los procesos celulares, dada la gran especificidad que muestra el ARN antisentido. Esta tecnología se aplicó exitosamente en el jitomate, y se obtuvo un producto claramente superior al disponible previamente. Más adelante describiremos cómo se puede aplicar una tecnología similar para combatir; por ejemplo, la replicación de virus.

Nuevamente me he limitado a citar algunos ejemplos, particularmente atractivos desde mi punto de vista, pero

que de ninguna manera constituyen una muestra representativa de las técnicas actualmente en desarrollo. Espero que el lector interesado encuentre información adicional en otras fuentes pero que con ejemplos de este libro tenga presentes los logros obtenidos, y que al mismo tiempo conozca cuáles son sus límites hasta a la fecha.

EL VALOR DE LA BIODIVERSIDAD EN EL CONTEXTO DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

Con los ejemplos anteriormente citados, creo que el lector puede tener una sensación más clara de cómo, trabajando con las herramientas disponibles, las modalidades de manipulación que la ingeniería genética ofrece, conduce a la aplicación de técnicas con características totalmente revolucionarias. Me quiero permitir ahora hacer una elucubración personal en relación con un tópico de gran actualidad: el de la biodiversidad, en el contexto de la nueva biotecnología.

Está claro que quienes habitamos el planeta tierra lo compartimos con millones de diversas especies. Vemos el caso de los seres humanos, que han considerado los recursos naturales objeto de uso y explotación, muchas veces en forma indiscriminada. La cultura moderna fomenta cada vez más un sentido de respeto y preservación de todo lo que nos rodea. En este sentido, las nuevas armas de la biotecnología pueden utilizarse, y se ha hecho acopio de ellas para el mejor conocimiento y conservación de los recursos bióticos. ¿Qué podemos decir; sin embargo, de la faceta de explotación de los recursos naturales? Es en este ámbito donde algunos de los detractores de la biotecnología encuentran un campo fértil.

En forma simple, su argumentación consiste en señalar que las capacidades de manipulación nos llevarán a destruir y alterar los ecosistemas de manera irreversible. En el epílogo de este libro expreso algunos puntos de vista en este sentido. Por el momento, sin embargo, me limitaré a dar una visión sobre nuevas modalidades de explotación de recursos bióticos que considero pueden ser material de reflexión.

Uno de los aspectos que se destacan con más insistencia sobre el valor de las especies es la riqueza que representan en términos de sustancias con posible valor terapéutico. En mi opinión, este aspecto valioso de la biodiversidad irá disminuyendo paulatinamente (véase en el capítulo siguiente, "Aplicaciones de la información estructural") quizá más pronto de lo que imaginamos.

Por otro lado, es muy importante comprender que la capacidad de manipulación de organismos complejos permaneciera, probablemente durante mucho tiempo, en niveles muy modestos. Se pueden alterar uno o más genes, pero es completamente impensable en la actualidad, cómo podríamos crear un organismo nuevo y diferente, por simple que éste fuera. La complejidad que representa tal ejercicio tiene una magnitud superior a la que hoy vislumbramos para realizar (véase, por ejemplo, la discusión sobre las ideas de *Parque Jurásico*, en el capítulo anterior; "Recuperación del ADN fósil mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR)"). Así pues, la biodiversidad que han creado miles de millones de años de evolución constituye un tesoro irreplicable, mucho más complejo de lo que podemos siquiera entender; no se diga recrear. Nuestro papel es, por el momento, preservarlo y estudiarlo. Seguramente, en muchos casos lo podremos utilizar en formas que hoy día ni siquiera imaginamos.

Terminaré esta sección describiendo un ejemplo de lo que la diversidad biológica requiere para llevar a cabo objetivos específicos, abordables en el futuro inmediato.

Un ejemplo: la ingeniería de las vías metabólicas

Es bastante conocido que los antibióticos, los medicamentos que más éxito han tenido en la farmacología moderna, se tienen a partir de microorganismos mediante procesos de fermentación. Con las técnicas de genética microbiana se ha logrado mejorar notablemente este proceso de producción.

Cuando Fleming descubrió hace varias décadas que el hongo *Penicillium* producía una sustancia que inhibía el crecimiento de las bacterias, la cepa con la que trabajaba (un simple hongo del pan), manufacturaba cantidades minúsculas del antibiótico. Hoy día, las cepas de *Penicillium* que se utilizan comercialmente han sido manipuladas para producir cientos o miles de veces mayor cantidad de penicilina. Durante mucho tiempo estas manipulaciones se realizaron a través de procedimientos de genética microbiana clásica. Más recientemente, por supuesto, se han empleado técnicas de ADN recombinante para lograr refinar aún más la producción de antibióticos. Un asunto notable es que la penicilina se sigue produciendo a partir del hongo *Penicillium*. No ha resultado posible, ni deseable, empezar a producirla, por ejemplo, en *Escherichia coli*. Tomemos en cuenta que la

producción de un antibiótico se presenta en lo que se denomina metabolismo secundario. Estas vías bioquímicas son propias y específicas de ciertos organismos, pero no se encuentran presentes en otros. Para poder trasplantar la capacidad de producir un antibiótico a un organismo diferente, tendríamos que clonar toda una batería de genes. Además de esto, los **sustratos** que inician el proceso biosintético no necesariamente están disponibles en células de especies alejadas. En el caso de los antibióticos, se ha logrado hacer trasplantes, como los mencionados, a otros organismos parecidos, por ejemplo la levadura.

De la discusión anterior podemos hacer una conclusión interesante. Más allá de la expresión de un gene específico, o de una serie de ellos, hay todo un entorno bioquímico que permite producir ciertas sustancias en unas células, pero no en otras. ¿Cómo podríamos entonces aplicar la ingeniería genética para producir moléculas pequeñas útiles? Precisamente mediante el estudio y manipulación de muy diversos organismos, previamente adaptados para hacer algo parecido a lo que necesitamos. De esto trata la ingeniería de las vías metabólicas.

Sería extraordinario que pudiéramos producir cualquier sustancia de la misma manera que hoy se producen los antibióticos. El proceso de fermentación es más limpio que un proceso sintético industrial. Por desgracia, la mayoría de los productos químicos que utilizamos no tienen mucho que ver con lo que los seres vivos producen. En la medida que conocemos la bioquímica de los organismos, y aprendemos a transformarlos genéticamente, podremos, sin embargo, seleccionar los más adecuados para producir sustancias específicas.

Uno de los ejemplos actuales de la aplicación de esta tecnología se halla en la fabricación del colorante índigo, que se usa para la tinción de la mezclilla. Este colorante se puede obtener de fuentes vegetales, pero el proceso ha resultado poco competitivo con la síntesis química. En épocas recientes, mediante procesos de ingeniería genética, se han podido introducir en genes *E. coli* que le permiten producir índigo. Se trata de unos pocos genes que producen enzimas capaces de transformar un producto del metabolismo primario (presente en muchas especies microbianas) en índigo. Además de introducir estos genes, ha sido necesario alterar algunos de los procesos metabólicos naturales de *E. coli* para lograr aumentar la productividad. Gracias al conocimiento de esta bacteria, y a la herramienta de la ingeniería genética, se han podido alterar específicamente ciertos genes, de manera dirigida.

Los primeros ejemplos de la alteración del metabolismo de microorganismos nos indican que aunque resulta difícil, esta tecnología es posible. Creo que podemos imaginar un futuro, no demasiado lejano, en el que podamos programar microorganismos o plantas para fabricar productos farmacéuticos específicos. Quizá en el futuro los antiinflamatorios que hoy se producen por síntesis química puedan ser elaborados mediante fermentación, o a través de un cultivo agrícola.

EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Muchos de nosotros hemos experimentado lo importante que es tener un diagnóstico preciso para poder contender contra una enfermedad. Un enfermo puede desfilar frente a diferentes médicos, de todos tipos, en su desesperación por lograr que le digan precisamente qué mal padece. Ciertamente, una de las más importantes cualidades de un médico debería ser un diagnóstico certero.

A través de la historia, los médicos han confiado en métodos muy variados para llegar al diagnóstico. Explorar al paciente, preguntarle cómo se siente, observar signos, interrogarlo sobre los síntomas, son técnicas que se han usado durante siglos. La medicina moderna, sin embargo, recomienda con mucha frecuencia practicar algunos "estudios".

En la actualidad, la mayoría de los análisis practicados, en lo que se refiere a estudios bioquímicos o infectológicos consisten en procedimientos relativamente complicados, diseñados específicamente para cada caso. Por ejemplo, un estudio para determinar la presencia de amibas requiere la observación microscópica, por parte de un experto, de una muestra, preferiblemente fresca. En una biometría hemática es necesario también el conteo directo de células en preparaciones microscópicas. En la mayoría de los casos, la detección de bacterias patógenas consiste en el cultivo de las mismas, en medios especiales, seguido de su identificación, por procedimientos bacteriológicos complejos. Para detectar compuestos particulares en los fluidos fisiológicos, como transaminasas, bilirrubina, etc., se necesita aplicar un procedimiento de incubación con diversos reactivos y su posterior cuantificación.

Las nuevas técnicas y conocimientos aportados por la biología moderna permiten visualizar un futuro muy

diferente para el campo del diagnóstico. Uno de los primeros factores que se deben tomar en cuenta es que las causas de muchas enfermedades se irán conociendo en forma mucho más precisa a nivel molecular. Así, con la información derivada del Proyecto del Genoma Humano, se conocerán los genes responsables de enfermedades y su predisposición a padecerlos. Los microorganismos patógenos serán escudriñados de manera altamente detallada, al grado de conocer la secuencia nucleotídica de muchos de sus genes. Con esta información a la mano se pueden emplear las mismas técnicas que se han descrito anteriormente, pero ahora para detectar; en muestras fisiológicas la presencia de genes relevantes que alteran la salud. De hecho, las propiedades de reconocimiento molecular que ya se explotan en unos pocos sistemas de diagnóstico muy sencillos, como las pruebas caseras de embarazo, nos permiten darnos una idea de lo que podría ocurrir en el futuro.

Por ejemplo, mediante el uso de la Reacción en Cadena de Polimerasa, es posible amplificar secuencias provenientes de unas cuantas células de la bacteria *Salmonella tify*, causante de la fiebre tifoidea. El íntimo conocimiento de los genes de esta bacteria, permite diseñar sondas de hibridización específicas para ella, que dan lugar a una señal (fragmento amplificado) sólo en el caso de que sea *Salmonella tify* la bacteria identificada.

Similarmente, a partir de una pequeñísima muestra (un ligero raspado de mucosa bucal), se podrán amplificar e identificar cualesquiera de los diversos genes que se sospeche puedan estar causando o condicionando la aparición de ciertos síntomas en el paciente. Quizá en estos momentos el empleo de este tipo de técnicas nos parezca complejo y, de hecho, se emplea todavía en menor proporción respecto a otros procedimientos. En pocos años, sin embargo, la acumulación de conocimientos hará que los esquemas antes descrito sean aplicables para muchas enfermedades. Adicionalmente, la gran versatilidad de los esquemas basados en la propiedad de reconocimiento molecular de los **ácidos nucleicos** permite el desarrollo de métodos cada vez más simples, sensibles y específicos. Es probable que, en un futuro no muy distante, el médico cuente con una serie de sistemas de detección, de manejo muy sencillo (tales como cintas reactivas que cambian de color), que le permitan afinar el diagnóstico en su propio consultorio.

La nueva biotecnología también abre interesantes perspectivas para la detección y cuantificación de otros tipos de sustancias corporales (aunque no consistan ni contenga ácidos nucleicos), como moléculas pequeñas. En este caso, el desarrollo que me parece más promisorio reside en dispositivos llamados biosensores. Un biosensor esta constituido por dos componentes: uno biológico, que realiza la función de reconocimiento específico, y uno electrónico, que lleva a cabo el registro del evento de reconocimiento molecular; de manera observable y cuantitativa. Por ejemplo, para detectar la cantidad de glucosa en la sangre de un individuo se han desarrollado biosensores, que ya se utilizan comercialmente en la actualidad. En estos aparatos se coloca una **enzima** que actúa específicamente sobre la glucosa (y no sobre ningún otro de los miles de compuestos de la sangre), y lleva a cabo una reacción química que acidifica el medio. Esta enzima se inmoviliza sobre una pequeña membrana, que a su vez se coloca cerca de un electrodo capaz de medir la acidez. El electrodo responde a la acidez enviando una pequeña corriente eléctrica que se puede registrar mediante un aparato electrónico adecuado. Como se puede ver; ésta es una operación verdaderamente simple: sumergir un pequeño electrodo (que semeja un tubito de vidrio) dentro de la muestra, y anotar el número que registra una carátula electrónica. Una de las características más interesantes de los biosensores es que son susceptibles de miniaturizarse. Existen industrias japonesas que la trabajan precisamente en esta área. Los biosensores del futuro podrán ser dispositivos verdaderamente microscópicos, que incluso podrían llevarse internamente, en el caso de que un paciente requiera un constante monitoreo de los niveles de cierta sustancia corporal. La aportación importante de la biotecnología moderna en este campo es que la identificación y manipulación del componente biológico del biosensor (que le confiere su especificidad) esta siendo revolucionada por todas las técnicas que hemos mencionado en este libro.

El ADN recombinante y la medicina forense

El lector podrá darse cuenta fácilmente que la capacidad de identificar con gran finura la naturaleza y origen de muestras minúsculas de material biológico puede aplicarse directamente en los seres humanos. Es decir; la identificación molecular es capaz de determinar inequívocamente si un pelo, o la piel atrapada bajo una uña, corresponde a un individuo en particular (por ejemplo un sospechoso). ¿Cómo se logra esto? Lo que se pretende es diseñar procedimientos que permitan resaltar las pequeñas diferencias de secuencias genéticas que existen entre un individuo y otro. Estas diferencias o "polimorfismos", están en las moléculas, y las observamos con toda claridad en su manifestación exterior (fisonomía, color de la piel, etc.). Mediante un diseño ingenioso de la Reacción en Cadena de Polimerasa, se puede obtener un patrón electroforético de bandas de ADN (véase el recuadro II.1) que revela con seguridad estas diferencias. En otras palabras, el patrón de bandas que se obtiene de

una muestra proveniente de un individuo, utilizando determinado conjunto de oligos sintéticos para iniciar la reacción de la PCR (véase la figura II) constituye una especie de "huella digital molecular" de ese individuo. Basta comparar los patrones obtenidos de la muestra hallada en la escena del crimen con los patrones obtenidos de los sospechosos, para decidir de quién provino la muestra. (La controversia sobre si estas pruebas son aceptables en un juzgado surge de que, por el momento, se puede afirmar que dos muestras *no* corresponden al mismo individuo, pero afirmar que *sí* corresponden, se refiere sólo a una *probabilidad*.) Este tipo de análisis se ha empleado también, por ejemplo, en pruebas de paternidad.

Uno de los aspectos que la sociedad tendrá que atender y reglamentar es el uso legítimo de esta potente metodología. No cabe duda que la capacidad de identificar con sencillez individuos y sus características genéticas se presta a la invasión de la privacidad, a niveles que no han sido posibles anteriormente. Pensemos también que las técnicas de identificación y diagnóstico molecular pueden aplicarse en embriones humanos, para la determinación de propensión a enfermedades, etc. Quizá una de las derivaciones más interesantes consiste en que seremos capaces de saber si somos portadores de genes responsables de enfermedades de efectos devastadores, como la enfermedad de Alzheimer; la de Huntington, la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral, la distrofia muscular; etc., que suelen aparecer en etapas avanzadas de la vida, y que no se manifiestan con anterioridad. Estas posibilidades presentan retos de gran importancia para la psicología y la sociología del futuro.

AGENTES TERAPÉUTICOS RACIONALES

Con base en los conocimientos disponibles sobre las causas de las enfermedades, cada día es más posible diseñar racionalmente nuevos agentes terapéuticos. En el capítulo siguiente se tratará el caso del diseño que requiere de la información estructural de las macromoléculas participantes. En esta sección describiré las posibilidades de utilizar agentes dirigidos contra los genes que intervienen en la enfermedad. En este caso, el conocimiento requerido es el de la secuencia nucleotídica de dichos genes, y el agente terapéutico sería alguna variante de un ácido nucleico.

Como ya se explicó en la sección "Las moléculas de la vida" del capítulo I, los ácidos nucleicos son moléculas de exquisita especificidad. En principio, podemos imaginar que si un ácido nucleico, por ejemplo, un oligonucleótido, puede ser utilizado como sonda de hibridación para detectar genes en preparaciones de laboratorio, debería ser también posible utilizarlas como sondas "asesinas", destinadas a adherirse e inactivar al gene cuya secuencia les es complementaria. La utilización de este esquema presenta, desde luego una serie de dificultades prácticas. Es necesario lograr que el oligo penetre en las células, y en las cantidades necesarias para inhibir al gene que se pretende contrarrestar. Asimismo, se necesita evitar que el oligo sea degradado en su camino, y al penetrar en la célula. En muchos laboratorios se trata de encontrar mecanismos para sortear estos obstáculos. Se ha comprobado, por ejemplo, que en una cantidad suficiente, la sola asociación de un oligonucleótido "antisentido" (es decir; complementario a la hebra codificadora de un gene), puede ser suficiente para inhibir la expresión de ese gene. También se empiezan a descifrar las reglas que determinan que ciertos oligos se asocien al ADN de doble cadena, formando una triple hélice. Otra técnica reciente de gran interés consiste en la fabricación de moléculas análogas a los oligonucleótidos, donde las bases se unen unas a otras no por medio de azúcar y fosfato, sino de enlaces parecidos a los de los péptidos o proteínas. A este tipo de moléculas se les ha llamado **PNA** (*Peptide Nucleic Acid*). Este descubrimiento constituye, nuevamente, un tributo al valor de una idea simple, pero que dio justo en el blanco. Con sorpresa, incluso de sus propios inventores, el PNA es capaz de esa asociación no sólo cumpliendo las reglas de apareamiento de Watson y Crick (A con T, y G con C), sino que además lo hace con mucha mayor fuerza que el ADN natural. Esto le otorga la capacidad de "invadir" o desplazar una de las hebras de ADN dúplex, con el posible resultado de alterar o inhibir la función del gene invadido.

La utilización de oligos antisentido ha tenido, hasta el momento, una aplicación limitada, aun en estado experimental (como en el tratamiento local del herpes). Podemos vislumbrar; sin embargo, que la simplicidad del concepto le augura un muy interesante futuro. De hecho, las compañías dedicadas a la producción de insumos para la síntesis química de oligonucleótidos han estado muy activas desarrollando métodos para la síntesis masiva de estas sustancias, en espera de que el mercado de los oligos terapéuticos llegue a crecer considerablemente.

El concepto de intervenir en un proceso biológico utilizando las propiedades de hibridación de los ácidos nucleicos se ha aplicado también en variantes de la terapia génica, que se describe en la siguiente sección.

LA TERAPIA GÉNICA

Todos hemos escuchado y comentado cómo la medicina actual emplea procedimientos que, en muchísimas ocasiones, sólo contrarresta los síntomas, pero no atacan a las causas de la enfermedad. Claramente, las causas últimas de gran cantidad de las enfermedades son de naturaleza genética. Hasta el momento hemos visto cómo se identifican y diagnostican pero ¿será posible curarlas? La respuesta, hasta hace algunos años, era afirmativa, en un futuro relativamente distante. Hoy en día, se observa cómo este futuro ha llegado mucho más rápido de lo que se pensaba.

La posibilidad de intervenir en el patrimonio genético de una persona para corregir algún defecto genético es, en realidad, la forma más perfecta y compleja de tratamiento. ¿Qué elementos técnicos se requerirían para lograr este objetivo? Ya hemos visto que se han podido obtener animales transgénicos, en los que se encuentran presentes genes externos o alterados, obtenidos por medio de la ingeniería genética (véase el recuadro IV.4 y en este capítulo, "Animales transgénicos, granjas moleculares") pero en los casos mencionados la introducción de genes se hace en el nivel embrionario. Para la terapia génica en seres humanos, hasta ahora no se han llevado a cabo este tipo de manipulaciones. Si el objetivo es curar a un individuo, lo que se requiere es reparar los genes de las células que constituyen al cuerpo desarrollado. Evidentemente esto representa un reto formidable. Sin embargo, en algunos casos favorables, la terapia génica es un procedimiento factible, y los primeros protocolos ya se están sometiendo a pruebas clínicas.

En su forma más simple, la terapia génica se puede aplicar a células que pueden ser retiradas del cuerpo, y reintroducidas nuevamente. Esta terapia, denominada *ex vivo*, es posible, por ejemplo, en el caso de las células sanguíneas. Todos hemos oído hablar del trasplante de médula ósea, la cual contiene las células precursoras de muchas células sanguíneas, de manera que si ésta se reemplaza y eliminan las células sanguíneas preexistentes, una persona puede volver a poblar su sangre con células provenientes de la nueva médula ósea. Hasta ahora, la médula ósea elegida para reemplazar la defectuosa debe provenir de una persona cercanamente emparentada con el individuo receptor; debido a que de otro modo las reacciones de rechazo inmunológico serían intolerables. En cambio, los procedimientos biotecnológicos modernos permiten manipular una población de células de la médula ósea del propio paciente, introduciéndoles los genes correctos, luego identificar y separar las células ya sanas, y finalmente reintroducirlas al paciente. Mediante este tipo de terapia génica se espera poder curar muchas enfermedades de la sangre.

En otros casos, el tejido enfermo no puede ser removido, pero es muy accesible, como en la fibrosis quística. En el capítulo III, "Aislamiento de los genes responsables de enfermedades hereditarias" describimos cómo se logró aislar el gene cuyo defecto es responsable de esta enfermedad, y en la sección "Animales transgénicos..." mencionaba que se han podido obtener ratones transgénicos que contienen el gene defectuoso correspondiente, y que constituyen un modelo animal para el estudio de la enfermedad. Lo que hace a la fibrosis quística un caso susceptible de la terapia génica es que el tejido enfermo (donde el producto del gene defectuoso se manifiesta), es un tejido accesible, el tejido pulmonar. Así, se ha empezado a experimentar al introducir el gene sano a las células pulmonares de los pacientes. Para que el gene penetre en las células enfermas se necesita un vector o vehículo, ya que las células del enfermo no pueden someterse a los esquemas normales de **transformación** (esta visión, sin embargo, empezó a cambiar muy recientemente. Véase más adelante). Las investigaciones actuales utilizan una forma atenuada del adenovirus, que normalmente es capaz de infectar las células pulmonares. En el genoma de este virus se ha clonado previamente el gene sano del canal de cloro, defectuoso en los enfermos con fibrosis quística. Los primeros resultados de este esquema de tratamiento muestran resultados muy alentadores.

En un paso siguiente de dificultad se encuentran las enfermedades que afectan tejidos menos accesibles, pero que pueden proliferar y renovarse, como el hígado. La proliferación de las células es un prerequisite para que los genes introducidos se establezcan y expresen. Uno de los ejemplos recientes más interesantes en este tipo de terapia se llevó a cabo en un perro de experimentación con hemofilia tipo B. Mediante la remoción de una porción del hígado del perro, y su posterior infección con un virus (en este caso un retrovirus) modificado para ser inocuo y establecerse sólo en las células hepáticas y al que se había introducido el gene correcto del factor IX de coagulación canino, se logró curarlo de la hemofilia.

En el campo de la terapia génica encontramos otro interesante ejemplo de la aplicación de conocimientos básicos que, aun cuando en un principio estaban muy desconectados de la aplicación, tienen a la larga grandes posibilidades de ser útiles. Tal es el caso de las llamadas ribozimas. Thomas Cech y Sidney Altman, científicos estadounidenses laureados con el Premio Nobel de química en 1989, descubrieron que algunas moléculas de ARN

pueden poseer actividad catalítica. Cuando investigaban los procesos por los cuales los ARN precursores de los organismos **eucariontes** eliminan sus **intrones** (véase en el capítulo III, "Aislamiento de genes utilizando sus ARN mensajeros" y figura III.1) vieron que en algunos casos, la ruptura y unión de un ARN no requería más que de ciertas secuencias del propio ARN. El descubrimiento de que los ARN pueden mostrar actividad catalítica es altamente revolucionario, pues se pensaba que ésta era una propiedad exclusiva de las proteínas dentro de los sistemas biológicos. Una de las implicaciones más importantes del ARN catalítico es su posible papel como material genético primigenio y su importancia en el origen de la vida.

La investigación sobre las propiedades de los ARN catalíticos o ribozimas, ha mostrado además que tiene gran potencial como agente terapéutico. Pensemos que el ARN catalítico, como cualquier otro ácido nucleico, muestra exquisitas propiedades de reconocimiento molecular, por medio del fenómeno de hibridación (véase en el capítulo "Ácidos nucleicos"), pero, además, ¡puede lograrse que rompa la molécula de ácido nucleico a la cual se asoció! Así, un interesante campo de terapia moderna consiste en diseñar ribozimas que se asocien e inactiven los ARN mensajeros de genes cuya actividad es nociva. Obviamente podemos pensar aquí en la expresión de oncogenes (véase en el capítulo anterior; "Estudios sobre las causas del cáncer"), o en la de genes de virus patógenos. Uno de los atractivos más grandes de este enfoque es que es verdaderamente general. El proceso que se utiliza para diseñar una ribozima que se asocia e inactiva al mensajero de un gene en particular es sumamente parecido al que se usaría para otro mensajero cualquiera. Por el momento el reto es introducir la ribozima a las células relevantes y también lograr que se localice en el lugar adecuado dentro de estas células. Si estos problemas se resuelven, en unos pocos años nuestro médico nos podría decir "le voy a prescribir una terapia con ribozimas".

Aun en los casos más difíciles, como los de enfermedades que se manifiestan en tejidos no regenerables, como los músculos, ya existen investigaciones promisorias para la aplicación de la terapia génica. En la actualidad se ha aprobado la realización de más de 30 procedimientos de terapia génica, incluidas enfermedades diversas, como varios tipos de cáncer; fibrosis quística, y otras.

Muy recientemente, la posibilidad de introducir genes mediante biobalística (véase en este capítulo, "Plantas transgénicas, la nueva revolución verde") también ha resultado exitosa en animales. Esto abre la posibilidad de "inyectar" genes a los tejidos apropiados. Adicionalmente, quizá esto permitirá que se vacune con ADN, para que nuestras propias células sean las que fabriquen el **antígeno** protector.

Manipulación genética de embriones humanos

Es muy importante destacar que la intervención genérica en seres humanos se ha limitado hasta ahora a la curación somática, es decir; no en embriones. Los procedimientos terapéuticos son aprobados por comités en los que normalmente participan miembros de la sociedad, ajenos a la comunidad científica o médica. En estos casos, los problemas éticos que se enfrentan no son de naturaleza muy diferente de los que normalmente han existido anteriormente. Sin embargo, la posibilidad técnica de aplicar terapia génica en el nivel embrionario también está muy cercana.

En el prólogo de este libro apunté que es incorrecto confundir la ingeniería genética con la embriología, o las técnicas de fertilización *in vitro*. Evidentemente, estos dos procedimientos tienen en común que implican intervenir en los sistemas biológicos. Sin embargo, no son en absoluto lo mismo. Ni un procedimiento requiere o depende del otro. Las investigaciones sobre fertilidad existen desde mucho tiempo antes del surgimiento del ADN recombinante y, hasta el momento, en ningún caso la manipulación de embriones humanos ha incluido la manipulación de genes. Similarmente, la ingeniería genética se ha aplicado en la abrumadora mayoría de los casos, utilizando células no humanas. Y definitivamente nunca con células humanas embrionarias. En este sentido, a casi 20 años de que se iniciara la revolución del ADN recombinante, no se ha hecho ningún experimento tendiente a "mejorar la raza humana". El lector comprenderá cabalmente que para lograr tal objetivo (en el supuesto caso de que se supiera qué quiere decir "mejorar", en este contexto), se requeriría alterar el genoma en el nivel embrionario, de manera que las alteraciones se efectuaron en todas las células de la persona, y tuvieran la posibilidad de ser heredadas a sus descendientes.

Una vez hechas estas aclaraciones creo que sí es conveniente abordar aquí la controversia desatada recientemente acerca de la posibilidad de hacer clonación de seres humanos, iniciada por algunos experimentos realizados en el contexto de la investigación de la investigación sobre fertilidad. Los doctores Jerry Hall y Robert Stillman, de la

clínica de fertilidad de la universidad George Washington, lograron separar las pocas células que constituyen un embrión humano en etapa temprana, para después volverlas a cubrir de una capa protectora, que les permite a cada una de ellas desarrollarse en un nuevo embrión. En esta etapa del desarrollo, las células no están aun especializadas, son totipotenciales, y por ello pueden originar a un nuevo embrión. Aparentemente, los investigadores que conducían este estudio no estaban conscientes del revuelo que iba a causar la noticia de sus resultados. En realidad, ellos no obtuvieron embriones viables, el embión del que partían tenía, para empezar, ciertas anomalías. Su único propósito era verificar si la preparación gelatinosa con la que recubrían las células disgregadas era capaz de propiciar su crecimiento y división. El objetivo final es, sin embargo, el obtener varios embriones a partir de uno. Este objetivo es comprensible desde la perspectiva de las clínicas de fertilidad. En los casos de algunas parejas, uno de los principales problemas es obtener siquiera un embrión, y las posibilidades de que éste se implante con éxito, dando como resultado un embarazo, no son muy elevadas. Sería ideal que una pareja en esta situación tuviera la posibilidad de hacer varios intentos. Ciertamente, el contenido ético de este planteamiento, en si mismo, es suficiente para desatar tremenda controversia. Sin embargo, la perspectiva de obtener varios embriones idénticos, la posibilidad de guardarlos por muchos años, y la probabilidad (que nos ocupa primordialmente aquí), de alterar su patrimonio genético, plantean profundos problemas éticos.

De la misma manera que se ha podido crear un rebaño de ovejas transgénicas que producen una proteína humana de alto valor terapéutico (véase en este capítulo "Animales transgénicos, granjas moleculares"), los experimentos relatados antes permiten concluir que sería inminentemente posible la generación de seres humanos transgénicos. Es muy probable, sin embargo, que las primeras propuestas para utilizar este tipo de descubrimientos fueran más bien para obtener varios embriones, analizar uno de ellos (lo cual normalmente lo destruiría) para ver si son portadores o no de determinada lesión genética y, en caso de que sean sanos, utilizar otro de los embriones (que sería idéntico al primero), para intentar llevar a término un embarazo.

Quisiera terminar esta sección diciendo que la comunidad médica y científica distingue con meridiana claridad la diferencia entre hacer terapia génica somática, o hacer terapia génica en la línea germinal (en embriones). Los protocolos en desarrollo son todos del primer tipo. Asimismo, aun cuando en algunas comunidades se empezará a considerar conveniente realizar procedimientos del segundo tipo, hasta el momento las alteraciones concebibles son de naturaleza muy limitada. Como ya se ha dicho, alterar un gene a la vez, con toda seguridad para corregir un defecto metabólico específico.

PERSPECTIVA GENERAL DE LA APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA

Desde una perspectiva histórica, se puede decir que las técnicas del ADN recombinante son recientes. Los que vivimos en esta época sabemos, sin embargo, que los cambios en todos los órdenes ocurren en forma vertiginosa. Durante su corta existencia, la nueva biotecnología ha creado expectativas enormes; ha desilusionado a los inversionistas, y los ha entusiasmado nuevamente. Como ya apunté al principio de este capítulo, si la única herramienta con la que contamos es un martillo, a todos los problemas les veremos cara de clavos. En la actualidad disponemos de un verdadero "taller mecanizado". Si juzgamos la avalancha de conocimientos propiciados por los avances de la manipulación genética, podemos asegurar que las aplicaciones útiles se empezarán a sentir también en grado de avalancha. Como es normal, éstas sobrevienen algunos años más tarde.

En este libro no se ha hecho más que dar pinceladas para mostrar algunas de las posibilidades. No tocamos en absoluto áreas como la biorremediación, la generación de energía, los alimentos procesados, nuevos materiales, etc., en los que la biotecnología seguramente tendrá repercusiones.

Creo que es casi una certeza prever que empezamos a vivir una era de biotecnología, en la que nuestras vidas estarán rodeadas de procesos y productos provenientes de esta tecnología.

[Inicio]	[Anterior]	[Previo]	[Siguiete]
----------	------------	----------	------------

VI. LA BIOLOGÍA ESTRUCTURAL Y EL ADN RECOMBINANTE: EN LA FORMA ESTÁ LA CLAVE

AL CONTEMPLAR el complejo funcionamiento celular en el cual los genes conciertan la interacción de miríadas de moléculas, donde se transforman sustancias de manera intrincada, vemos aparecer forma y función. ¿Dónde se localiza el secreto más íntimo de este proceso? ¿Cómo se encuentran las moléculas unas con otras? ¿A qué se debe que una enzima sea capaz de localizar y transformar la sustancia sobre la cual actúa? Las respuestas a estos interrogantes se derivan, en su forma más contundente, de la forma espacial de las moléculas. La disciplina que desarrolla y utiliza técnicas experimentales para averiguar la estructura tridimensional de las moléculas biológicas, la biología estructural, constituye una de las vertientes más importantes de la actividad científica moderna. Ya se mencionó, en el capítulo II, que fue precisamente el conocimiento estructural el que inició la revolución de la genética molecular.

En este capítulo revisaré algunos de los conceptos y desarrollos más interesantes del campo. El tema es, para mí, particularmente atractivo: en mi línea de investigación utilizamos los datos de la estructura de las proteínas y el ADN recombinante para generar nuevas versiones, con atributos mejorados, de las proteínas naturales. Es mi sincero deseo el poder transmitir al lector el sentido estético y el enorme potencial que se originan del conocimiento de las estructuras moleculares biológicas.

LAS TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Si revisamos nuestras primeras experiencias con el microscopio, durante nuestras clases de biología, quizá recordemos que para lograr ver cosas más y más pequeñas, había que tomarse más y más trabajos. Para amplificar cien veces la muestra sólo necesitábamos alumbrar y enfocar bien; pero si se trataba de amplificarla mil veces, entonces usábamos aceite de inmersión para acercarnos más a la muestra; las cosas se ponían difíciles. Quizá recordemos también al maestro de biología diciéndonos que para ver cosas aun más pequeñas, la luz ya no funciona. En efecto, la longitud de onda de la luz visible tiene una magnitud tal que no permite continuar los procedimientos ópticos de manera indefinida. Recurrimos así al microscopio electrónico. De esta forma ya podemos ver estructuras dentro de la célula; ¡lo que la luz no alcanzaba, los electrones sí revelan! Desafortunadamente, el mismo principio que limita la utilización de la luz, también la limita con los electrones. Los átomos y las moléculas no se pueden ver directamente.

Para deducir la estructura espacial de la materia, la manera como se asocian unos átomos con otros en tres dimensiones, requiere aplicar otros desarrollos de la física: la *crystalografía de rayos X* y la *resonancia magnética nuclear* (RMN). A partir del conocimiento íntimo de la naturaleza de los átomos y la radiación electromagnética, en los últimos 50 años se han desarrollado técnicas de increíble complejidad y elegancia, que permiten deducir, a partir de numerosas observaciones experimentales, la posición precisa de los miles de átomos que constituyen una molécula de proteína, o hasta de las muchas moléculas que constituyen un virus completo.

Aunque está fuera de los propósitos de este libro una descripción técnica de estos procedimientos, destacaré algunos de sus rasgos más importantes.

CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X

Los rayos X interactúan con las sustancias desviándose ligeramente. La magnitud de esta desviación depende de la densidad electrónica que encuentren a su paso. Por esto los materiales que contienen átomos de metales (por ejemplo, el plomo o el calcio de los huesos), muestran zonas oscuras en una radiografía, dado que los metales son muy densos en electrones. Los rayos X también se dispersan o difractan cuando atraviesan materia orgánica, pero más ligeramente. En principio, como el patrón de difracción resultante del paso de los rayos X depende de la estructura de la materia que atraviesa, podríamos inferir ésta de aquél. El problema es que no podemos observar el patrón de difracción de una sola molécula: la señal sería demasiado débil. Para solucionar este problema se recurre a la observación de los patrones de difracción generados por *criscales*. Cuando hablamos de cristal, de manera rigurosa nos referimos a un fenómeno natural realmente bello. Las moléculas que pasan suavemente de estar disueltas al estado sólido, lo pueden hacer acomodándose ordenadamente una al lado de la otra, en una láctice o arreglo tridimensional. La manifestación macroscópica de este fenómeno es la apariencia pulida y transparente

que tienen los cristales, y sus formas geométricas características. Pero internamente, existe un orden perfecto. Todas las moléculas se encuentran orientadas de la misma manera. Así pues, al manipular un cristal de dimensiones macroscópicas (por ejemplo un milímetro), estamos manipulando de manera concertada todas las moléculas que lo constituyen, obteniendo la misma orientación de cada una de ellas respecto al observador. ¡O a un haz de rayos X! Es así como, disponiendo de cristales, se pueden obtener patrones de difracción de rayos X observables, porque provienen de muchas moléculas, y coherentes, porque las moléculas están todas igualmente orientadas respecto al rayo. De estos patrones de difracción puede inferirse la estructura individual de las moléculas que conforman los cristales.

Por desgracia, esto es más fácil decirlo que hacerlo. Para empezar hay que ser capaz de obtener los cristales. Aunque se ha logrado hacer que cristalicen gran número de moléculas interesantes, en el caso de las proteínas, de crucial importancia, no es nada fácil. La labor del cristalógrafo implica además muchos pasos posteriores a la cristalización. Hay que coleccionar datos, preparar derivados de los cristales originales, reducir los datos mediante complejas ecuaciones, preparar un modelo molecular que se ajuste a estos datos y refinar el modelo en muchos intentos sucesivos.

Algunas de las imágenes más bellas que ilustran los libros de bioquímica y biología molecular provienen del arduo trabajo de los cristalógrafos. Y su utilidad también es enorme: del análisis de estas imágenes tridimensionales se derivan el secreto de las interacciones moleculares, de la vida misma.

La primera estructura tridimensional de una proteína fue obtenida mediante el trabajo pionero de Max Perutz, quien requirió de 22 años para lograr su objetivo. Incluso, hasta hace poco más de una década, la resolución de una estructura proteica podía considerarse una empresa para buena parte de la vida. Afortunadamente, el avance de la metodología ha sido impresionante. Hoy día se conjugan varios factores que permiten un flujo continuo de nuevas estructuras. En primer lugar, como puede entenderse fácilmente, la potencia y abaratamiento de las computadoras modernas simplifica y acelera significativamente el trabajo de cristalografía.

Adicionalmente, la posibilidad de clonar y sobreexpresar genes ha abierto la puerta para trabajar con proteínas que antes resultaban inaccesibles. Los cristalógrafos se han asociado también a los sincrotrones, construidos para investigaciones de física atómica, pero que generan como subproducto rayos X de gran intensidad y versatilidad. El ciclo en el que los avances científicos y tecnológicos se potencian unos a otros se observa con claridad: son precisamente los últimos 10 o 15 años en los que ha registrado un impresionante avance en la biología estructural. Justo en este periodo surgió el ADN recombinante y el crecimiento explosivo de la informática.

RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

En los últimos años ha madurado otra técnica que permite también deducir la estructura molecular: la resonancia magnética nuclear; que aplicada a proteínas, complementa la cristalografía de rayos X.

La adaptación de la RMN al trabajo con moléculas grandes surgió de avances tecnológicos recientes. Nuevamente, se requiere coleccionar y procesar cantidades masivas de datos. Además, se necesitaron aparatos que trabajaron con frecuencias de ondas de los que antes no se disponía. Los nuevos aparatos requieren el uso de superconductores para generar los campos magnéticos. La gran virtud de la RMN es que puede usarse para analizar moléculas en solución, es decir, en su ambiente natural. La naturaleza de la técnica es tal, que no es importante que todas las moléculas estén orientadas de la misma manera.

Con la RMN los datos observados se traducen en una serie de distancias y ángulos entre los átomos. A partir de esta lista de ángulos y distancias el espectroscopista se da a la tarea de construir un modelo molecular que satisfaga las medidas observadas experimentalmente.

El esfuerzo de los investigadores de este campo fue distinguido con el Premio Nobel de química en 1991, otorgado al investigador suizo Richard Ernst y los límites de la técnica se han extendido grandemente. Por desgracia, este método no permite determinar la estructura de moléculas grandes, tales como muchas proteínas y agregados macromoleculares.

Las técnicas experimentales para la determinación de estructura han generado un número muy importante de resultados. Hoy disponemos de más de 5 000 diferentes estructuras de ácidos nucleicos y proteínas, que representan cerca de 500 diferentes arquitecturas (el resto está constituido por variantes de las mismas proteínas,

por ejemplo, provenientes de diferentes organismos o interactuando con sus moléculas blanco, etc.). En el recuadro VI.1 se muestran representaciones esquemáticas de algunas de las estructuras de biomoléculas determinadas hasta la fecha. Desafortunadamente, esta información está cada día más rezagada de los datos conocidos sobre secuencia (véase el capítulo IV). Esto genera una urgente necesidad de desarrollar sistemas para predecir la estructura tridimensional a partir de datos de secuencia.

RECUADRO VI. 1. Estructura de las biomoléculas

En el material biológico encontramos asociaciones de átomos de todos los tamaños. Un solo átomo, el ion litio, por ejemplo, puede tener profundos efectos biológicos (como el que se usa en el tratamiento de la enfermedad maniaco-depresiva). Varios átomos combinados químicamente dan como resultado moléculas. Si son muchos los átomos asociados, al resultado le damos el nombre de *macromoléculas*.

La descripción de las uniones químicas no es suficiente para definir las propiedades de una molécula. Dado que los enlaces químicos pueden rotar; una pequeña cadena de átomos puede contorsionarse de diversas maneras en el espacio. Por ejemplo la glucosa podría tener dos formas espaciales: una semejante a una silla, y otra parecida a una lanchita. Conforme aumenta el tamaño de las moléculas, crece el número posible de contorsiones o **conformaciones** que puede adoptar de manera alarmante.

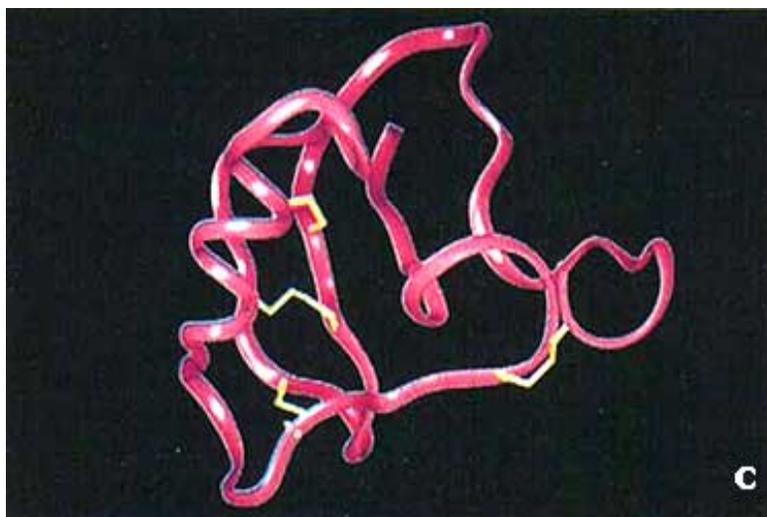
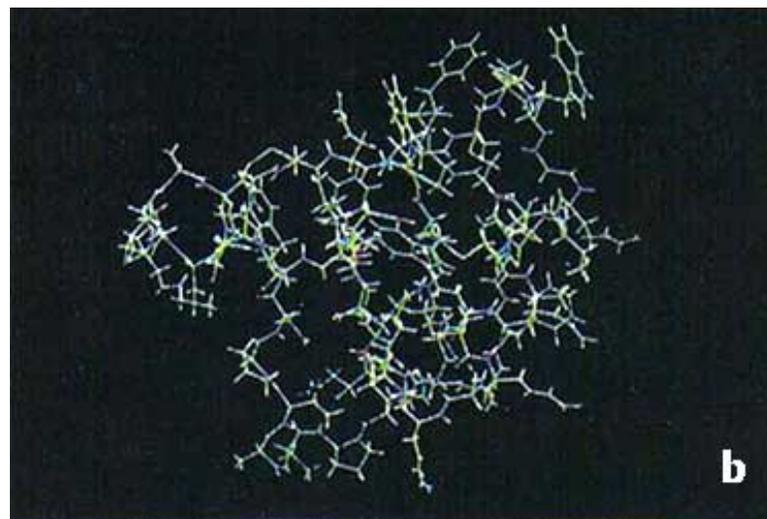
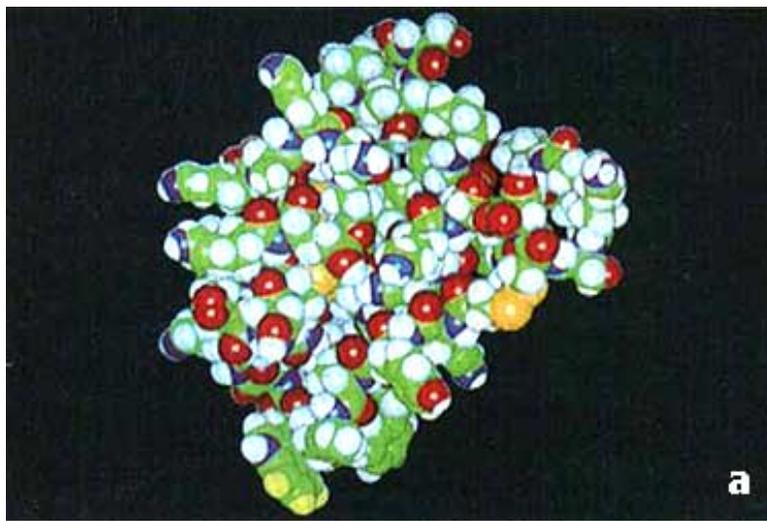
Mediante las técnicas de biología estructural hemos podido conocer como están conformadas muchas moléculas, años antes de que sea posible predecir o calcular estas conformaciones. En la serie de imágenes que se muestran pueden observarse ejemplos de algunas proteínas y la forma como se pliegan o conforman en el espacio. Nótese los diversos tamaños y formas que adoptan, y las protuberancias y huecos que presentan. De estas formas tridimensionales depende, primordialmente, la función de estas moléculas.

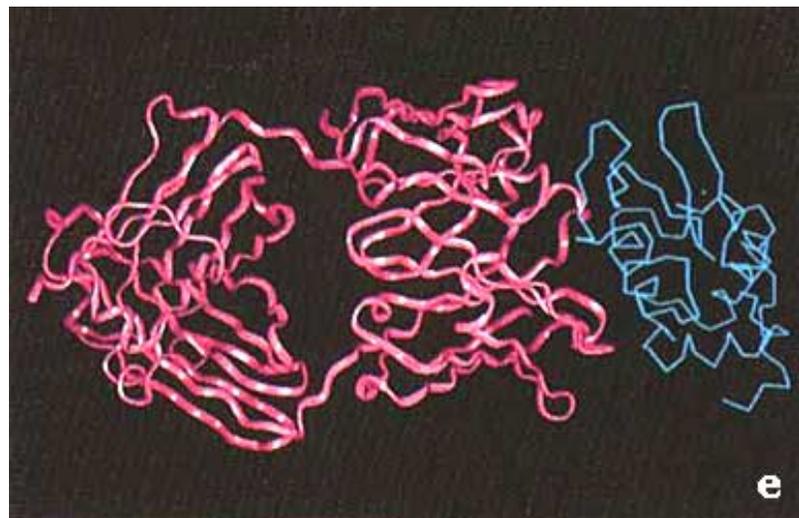
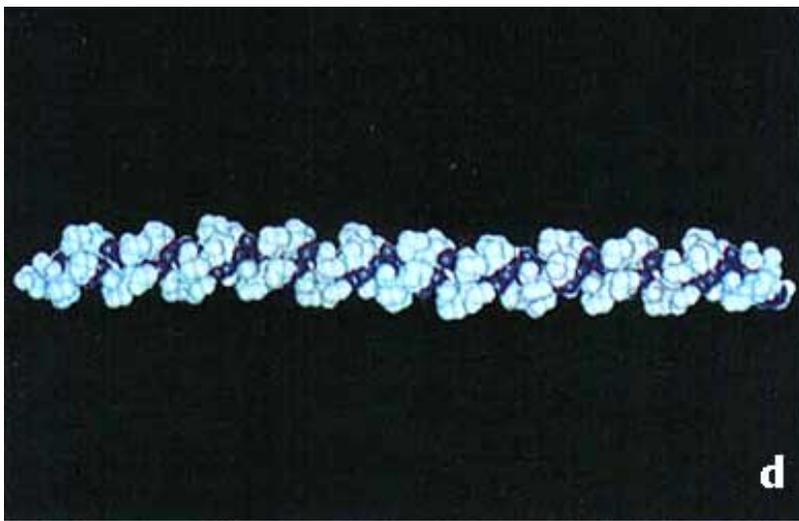
Las imágenes *a*, *b* y *c* muestran diversas representaciones de una toxina de alacrán, que permiten visualizar diversos aspectos de su complejidad, las cuales denotan la misma molécula, con la misma perspectiva.

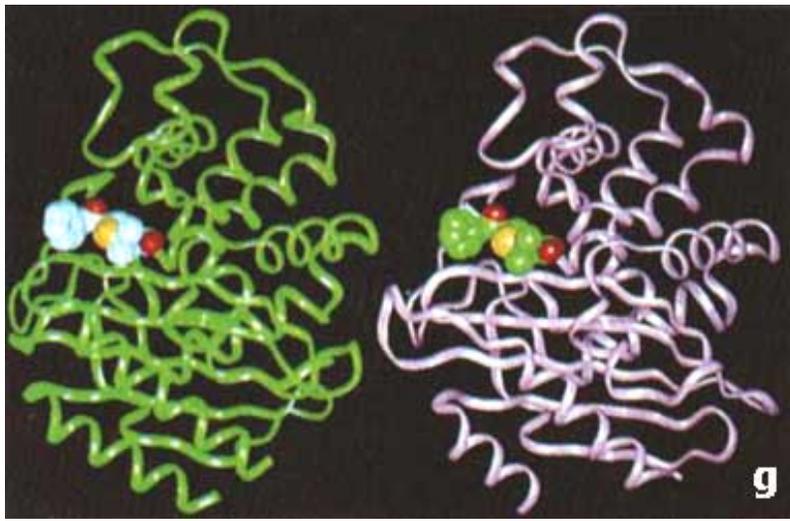
La imagen *d* representa a la colágena, una proteína fibrosa. La *e* corresponde al complejo entre un anticuerpo (listones) y el antígeno reconocido (lisozima; líneas).

La imagen *f* muestra una enzima constituida por dos subunidades idénticas, importante en el metabolismo básico (triosa fosfato isomerasa)

En la imagen *g* se observa la enzima β -lactamasa, responsable de la resistencia a la penicilina (esferas), presente en muchas bacterias. Si se observa con cuidado, se notará que las dos proteínas mostradas no son idénticas, pues corresponden a las enzimas de dos bacterias distintas. El antepasado común de estas dos proteínas existió hace cientos de millones de años; la secuencia de las dos proteínas solo es idéntica en 35% de las posiciones y, sin embargo, la estructura permanece altamente conservada por efecto de la selección natural.







LA PREDICCIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEÍNAS

Hace más de dos décadas, el investigador danés Christian Anfinsen —quien obtuvo el Premio Nobel de química en 1972— estableció que la estructura tridimensional de algunas proteínas está determinada por su secuencia lineal de aminoácidos. Hoy día sabemos que éste es el caso de la mayoría de las proteínas, quizá de todas. Esta convicción hace verdaderamente irresistible el reto de desarrollar métodos que nos permitan predecir su estructura a partir de la secuencia. De entrada dejaremos en claro que éste es un problema que se considera algo no resuelto. Se ha dicho que el código que relaciona la secuencia con la estructura es como el segundo código genético. Realmente es a través de la estructura tridimensional de las proteínas, no directamente de su secuencia, que los genes orquestan toda la actividad celular. Este es, pues, uno de los grandes problemas pendientes de la biología moderna.

Quizá algunos lectores se pregunten: ¿las poderosísimas computadoras que existen en la actualidad son incapaces de programarse para resolver este problema? El asunto es que este problema tiene variadas e importantes aristas. Por una parte existe un número astronómico de maneras diferentes de arreglar los átomos de una proteína en el espacio. Por la otra, las fuerzas de atracción y repulsión que determinan que una proteína se pliegue en el espacio de una manera específica son muy numerosas y con diferencias de magnitud muy sutiles.

Para algunas corrientes, la predicción de la estructura de proteínas no podrá lograrse por muchas décadas. Esta visión se refiere quizá a la solución rigurosa del problema. Para otros, algunas de las aproximaciones recientes constituyen avances que permiten prever resultados concretos y prácticos en muy corto plazo.

En los últimos 5 años se han desarrollado técnicas muy elaboradas e ingeniosas que permiten extraer y codificar mucha de la información presente en la base de datos de estructuras tridimensionales conocidas. De aquí se derivan aproximaciones empíricas, que no presuponen que se entiendan finamente las fuerzas que intervienen en el fenómeno de plegamiento. De esta manera, el enfoque más promisorio, en la actualidad, tiene como objetivo inicial decidir con cuál de las estructuras tridimensionales ya conocidas es compatible la secuencia de una proteína problema. Lo interesante de la situación es que podemos predecir que existen sólo alrededor de mil o menos posibles arquitecturas proteicas naturales. Todas las proteínas existentes se plegarían en el espacio en alguna de estas arquitecturas. Este es un dato muy interesante si consideramos que en un ser humano se calcula que existen alrededor de 100 mil proteínas diferentes. La predicción mencionada parte de un análisis estadístico de la frecuencia con la que los cristalógrafos y espectroscopistas obtienen estructuras que representan nuevas arquitecturas. Resulta ser que con relativa frecuencia la estructura de una proteína recientemente resuelta se parece mucho a la de alguna que ya existía en la base de datos.

Con la constante refinación y el avance de los métodos de predicción y de las herramientas computacionales que

éstos utilizan, esperamos tener una idea aproximada de la estructura espacial de muchas de las proteínas cuya secuencia aparezca como fruto de la secuenciación del genoma humano, que podría completarse dentro de unos 10 años (véase el capítulo IV).

APLICACIONES DE LA INFORMACIÓN ESTRUCTURAL

Quizá muchos lectores coincidan en que el conocimiento de las estructuras que adoptan las biomoléculas constituye un logro espectacular de la ciencia moderna. En cada época, los biólogos estructuralistas han utilizado los últimos adelantos tecnológicos para avanzar en su trabajo, y así han ido desentrañando detalladamente la estructura de moléculas complejísimas. Cabe preguntarse sin embargo: ¿de dónde surge la motivación para dedicar décadas enteras a dilucidar determinada estructura molecular? Ciertamente, el placer estético de observar la estructura resuelta no parece ser una justificación suficiente para la inversión de tiempo y recursos necesarios. La respuesta, que con gran intuición destacaron los pioneros de la biología estructural, es que en la estructura detallada de las macromoléculas biológicas se encuentran los secretos más íntimos de los fenómenos de la vida.

DISEÑO RACIONAL DE DROGAS

Pensemos qué ocurre cuando ingerimos un medicamento y éste ejerce su efecto. El medicamento es una sustancia química que tiene afinidad por alguna de las macromoléculas (generalmente una proteína) de nuestro organismo. La sustancia medicinal entra al organismo, viaja por medio del torrente sanguíneo, penetra en las células y finalmente encuentra una molécula blanco. La unión específica entre estas dos sustancias da como resultado el efecto medicinal. Lo verdaderamente sorprendente es que hasta la fecha no tenemos una idea clara de los detalles de estas interacciones. Como ya hemos señalado (véase el capítulo anterior; "El valor de la biodiversidad en el contexto de la biotecnología moderna") casi la totalidad de las medicinas usadas actualmente provienen de principios activos, aislados de plantas, cuya utilidad fue encontrada empíricamente, quizá preservada por la tradición de muchos siglos. ¿Qué podríamos esperar, sin embargo, si conocemos la estructura detallada de las moléculas relevantes para determinada enfermedad? Lo promisorio del conocimiento estructural en este campo es que se puede pensar en diseñar los medicamentos específicamente para unirse a sus moléculas blanco. Habrá quien declare que hasta el momento esto se ha podido lograr sólo en casos excepcionales. Aunque cierto, otros tenemos la convicción de que tarde o temprano el diseño racional de medicamentos será la norma y no la excepción. De hecho, todas la compañías farmacéuticas del mundo invierten cuantiosas sumas de dinero en investigación sobre biología estructural y en diseño de moléculas por computadora. Aun cuando quizá estos desarrollos no alcancen a beneficiar a muchos de los enfermos de hoy día, el incontenible avance de las técnicas empezará a transformar el ejercicio de la farmacología en un futuro tal vez más cercano de lo que imaginamos. Un notable ejemplo entre varios que se desarrollan en la actualidad es la investigación que se realiza para contrarrestar el devastador efecto del virus del SIDA, como se muestra en el recuadro VI. 2.

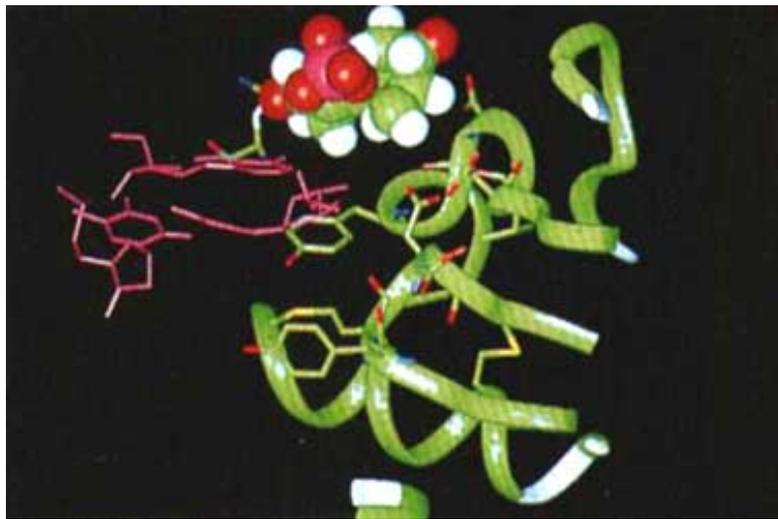
RECUADRO VI. 2. Estrategias antivirales usando información estructural

Una vez conocido el plegamiento tridimensional de una macromolécula, se puede pensar en diseñar sustancias que se le adhieran específicamente, con la intención de inutilizarla. Para el caso del virus del SIDA, hay varias moléculas que pueden ser blancos interesantes (véase el ciclo de vida del virus en el recuadro IV.3). A sólo 10 años de haberse descubierto este virus, ya se conocen las estructuras tridimensionales de dos de sus moléculas más importantes: la proteasa y la transcriptasa reversa. En el caso de esta última, con la participación de un joven investigador mexicano, el doctor Alfredo Jacobo.

El reto para el diseño racional de un fármaco contra del SIDA consiste en encontrar sustancias que se unan específicamente al sitio activo de alguna de estas enzimas, inhibiendo así su función. La información estructural permite analizar el sitio activo, detectar qué zonas son importantes para la función, y probar, inicialmente, con métodos computacionales, cuáles posibles sustancias tendrían una forma y distribución de cargas complementarias a

tales zonas. Algo así como diseñar una llave para una cerradura. La otra ventaja de utilizar un esquema racional es que se puede buscar desde el principio una zona en la que sea difícil que surja una variante resistente (es decir; que ya no se una o no se inhiba por el fármaco), al escoger zonas esenciales para la función de la enzima. El diagrama muestra una vista de la transcriptasa reversa, unida al ADN, y una molécula de inhibidores (esferas) asociada en el sitio activo, y fue desarrollado con la colaboración del doctor A. Jacobo.

En la actualidad existen varios laboratorios que activamente buscan inhibidores para la proteasa y la transcriptasa reversa. De hecho, las últimas noticias consignan pruebas clínicas con inhibidores de la proteasa y la transcriptasa reversa para el tratamiento del SIDA. Quizá en un futuro muy cercano se disponga de tratamientos satisfactorios, tal vez combinando un inhibidor de la proteasa con otro de la transcriptasa reversa.



BIOCATÁLISIS E INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

Otro importante desarrollo relacionado con la estructura de macromoléculas es la biocatálisis. Consideremos la increíble variedad de materiales y procesos que se observan en el mundo viviente. Todavía no ha sido capaz el hombre de superar las propiedades de fibras como la lana o el algodón o de fabricar zapatos con materiales que mejoren las cualidades del cuero. Seguimos utilizando perros para detectar cantidades minúsculas de drogas, porque no existe un aparato que tenga tal sensibilidad y capacidad de discriminación. Estos logros son producto de 3 500 millones de años de evolución, pero el conocimiento preciso de las propiedades de los sistemas vivos nos permitirá, cada vez más, inspirarnos con las formas como la naturaleza ha resuelto los retos de la supervivencia, y aprovechar la infinidad de materiales que ella ofrece para diseñar productos o procesos específicamente útiles para las actividades y el bienestar humano.

En particular, la capacidad catalítica de los sistemas vivos supera con amplísimo margen la que ha logrado la industria química. Actualmente los productos químicos se producen mediante reacciones que utilizan toda clase de diferentes condiciones de temperatura, presión, uso de disolventes, etc. Se purifican con grandes aparatos de destilación, filtración, etc. En contraste, los seres vivos realizan también toda clase de reacciones químicas y

producen toda clase de sustancias y materiales, pero siempre a temperaturas moderadas y en solución acuosa. Nuevamente, podemos pensar en utilizar estrategias y materiales similares a los biológicos para realizar las transformaciones químicas que nos interesan. Aquí el conocimiento estructural es extremadamente importante. Consideremos que normalmente una enzima está adaptada para trabajar dentro de una célula, sujeta a los requerimientos de regulación y recambio que ésta requiere. Además, efectuará una reacción química específica, parte del metabolismo celular. En las aplicaciones tecnológicas normalmente requeriremos actividades catalíticas más o menos distintas a las naturales. Necesitamos también enzimas estables y fáciles de obtener en grandes cantidades. Como fruto del esfuerzo de varias décadas se ha logrado "domesticar" cierto número de enzimas para el servicio del ser humano. Por ejemplo, los detergentes biológicos contienen proteasas (enzimas que catalizan la degradación de proteínas) y lipasas (que degradan grasas), que hace más eficiente el lavado. En la industria del refresco se utilizan los jarabes con alto contenido de fructosa que se producen a partir de almidón, mediante la degradación y conversión enzimática de dos productos edulcorantes básicos: glucosa y fructosa. Incluso se utilizan procesos de biocatálisis para la producción de compuestos de petroquímica secundaria, como el antiespumante acrilamida. Estos logros han sido posibles aun sin la capacidad de cambiar de manera importante la actividad enzimática básica encontrada en la naturaleza.

Hoy día, sin embargo, basándonos en las estructuras tridimensionales de las enzimas, podemos aplicar las técnicas del ADN recombinante para modificar significativamente las propiedades de las enzimas, para crear biocatalizadores hechos a la medida. Ha surgido una nueva disciplina: la ingeniería de proteínas. Los procedimientos implicados son conceptualmente simples: se aísla el gene que codifica para la enzima de interés; se introducen cambios en su secuencia mediante el uso de ADN sintético (véase en el capítulo II, "El ADN sintético"); se sobreproduce la proteína en algún sistema de expresión. Claramente, aunque las técnicas de ADN recombinante permiten fabricar genes con la secuencia que se nos antoje, se requiere un conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína codificada para poder diseñar racionalmente los cambios. Precisamente con base en estos conocimientos ha sido posible alterar las propiedades de muchas proteínas para hacerlas más útiles. Un caso digno de mencionar es la alteración de las propiedades farmacológicas de la insulina humana. Como ya mencionamos (capítulo V), la producción de insulina humana por bacterias fue uno de los primeros logros de la ingeniería genética. La utilidad de esta hormona es limitada, sin embargo, porque al no producirse de manera continua por las células del páncreas, dentro del propio organismo, su disolución y concentración en la sangre no sigue los patrones más adecuados. Se requiere disminuir la tendencia que tiene la molécula natural a agregarse entre sí. Con base en el conocimiento de la estructura tridimensional de la insulina (determinada hace varias décadas) fue posible diseñar cambios que se localizan precisamente en la interfase entre las dos moléculas que se agregan, y que, al alterar su carga eléctrica, las hace repelerse, haciéndolas más solubles. Otros muchos ejemplos atestiguan la creciente capacidad de cambiar los atributos de las proteínas mediante el diseño racional.

EVOLUCIÓN DIRIGIDA O DISEÑO "IRRACIONAL" DE MOLÉCULAS

La ingeniería de proteínas, sin embargo, no está condicionada totalmente al avance de nuestros conocimientos. En este momento se desarrollan también enfoques muy interesantes para llegar más lejos que lo que nuestro conocimiento permitiría. Sabemos que la evolución ha producido seres de pasmosa complejidad, por medio de un proceso ciego de variación y selección. ¿Qué pasaría si pudiéramos simular estos procesos evolutivos, sólo que en tiempos mucho más cortos? Una vez más, el ADN recombinante permite realizar experimentos antes imposibles. Utilizando ADN sintético y enzimas que lo reproducen (véase en este capítulo, "La predicción de la estructura de las proteínas"), podemos generar numerosísimos conjuntos de moléculas diferentes.

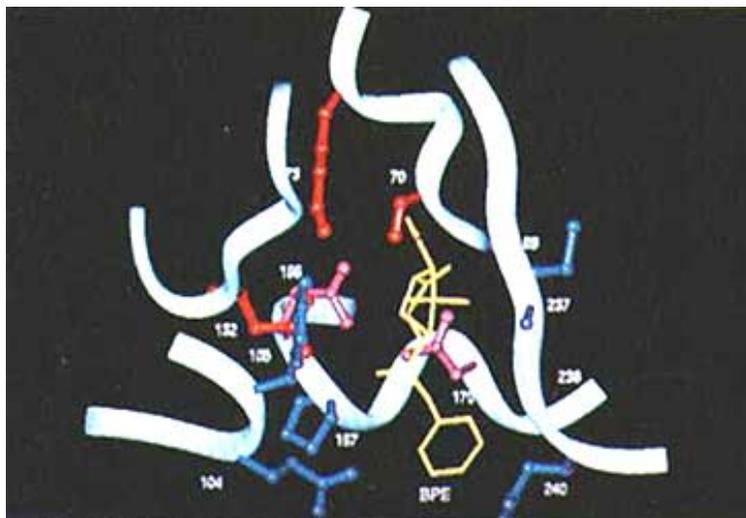


Figura VI. 1 (véase más adelante)

Al explicar los conceptos de la evolución molecular dirigida tengo la oportunidad (y permítame el lector que la aproveche) de explicar el trabajo que realizamos en mi laboratorio del Instituto de Biotecnología. Desde que tuve la oportunidad de viajar a Estados Unidos para especializarme en las técnicas de síntesis química de oligonucleótidos me llamó poderosamente la atención que los oligos podían utilizarse para alterar específicamente genes particulares. Más adelante decidí especializarme en utilizar estas técnicas para realizar **mutagénesis** a saturación y mutagénesis combinatoria. Estos conceptos se refieren al proceso de generar variabilidad dentro de un gene. Pero veamos con más detenimiento de qué se trata.

En un procedimiento tradicional de mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (véase el recuadro II.4. El ADN sintético y sus aplicaciones) se introduce un cambio predeterminado, codificado en la secuencia del oligo, al gene objetivo. ¿Qué pasaría, sin embargo, si un esquema similar se utilizara pero con una multitud de oligonucleótidos, cada uno con una secuencia un poco diferente? La respuesta es que obtendríamos un conjunto de moléculas variantes en la zona afectada por el oligo. Es importante darse cuenta de que cuando hablamos de la obtención de "un oligo", o de la donación de "un" segmento de ADN en "un" vector de donación, en realidad hablamos de manipular trillones de moléculas simultáneamente, todas ellas iguales. Pero podemos hacer que estas moléculas no sean exactamente iguales. Pensemos que al sintetizar un oligo, en una determinada posición no adicionamos sólo la base correspondiente a la secuencia natural, sino que ponemos una mezcla de las cuatro bases. Supongamos que el oligo llevaba ya adicionadas unas 15 bases, con una secuencia determinada. A partir de la base 16, las cadenas de oligo que van creciendo en la resma de síntesis ya no son todas iguales. Ahora tenemos cuatro tipos: todos los oligos son iguales en sus primeras 15 bases, pero hay unos que contienen A, otros G, otros C y otros T, en la posición 16. Tenemos cuatro tipos de oligos. Si repetimos este procedimiento, los oligos resultantes serán de 16 clases distintas, cuatro que ya existían, multiplicadas por cuatro nuevas posibilidades. La continuación de este proceso genera toda una serie de combinaciones de secuencias en la región donde se adicionan las cuatro bases. Después, se puede regresar al régimen anterior; y adicionar bases únicas en secuencia definida. Obtendríamos así, adheridos a la resma de síntesis, desde unos cuantos hasta trillones o más de oligonucleótidos, todos con extremos iguales, pero que en el centro son diferentes. Al incorporar oligos de esta mezcla (llamados oligos degenerados) en un protocolo de mutagénesis dirigida (véase nuevamente el recuadro II.4), obtendríamos desde unos cuantos hasta trillones de diferentes genes variantes, que luego podemos introducir a las células para su expresión.

Existen distintas maneras de inducir variabilidad en moléculas de ácidos nucleicos, pero todas tienen en común los mismos elementos. Una vez obtenida una variante, su replicación perpetúa el cambio inducido. La expresión del gene, dentro de una célula, produce una proteína distinta para cada variante, de acuerdo con el código genético. Resulta así que la manipulación de ácidos nucleicos ofrece un mecanismo relativamente simple (infinitamente más simple que el de la síntesis orgánica directa) para crear innumerables moléculas distintas. El siguiente paso, tal y como nos lo ha indicado la evolución natural, consiste en diseñar un método de selección. Hay que detectar e identificar cuál de los genes variantes dio origen a una proteína con una actividad interesante.

Para ejemplificar cómo se puede lograr; citaré un caso ocurrido en mi laboratorio.

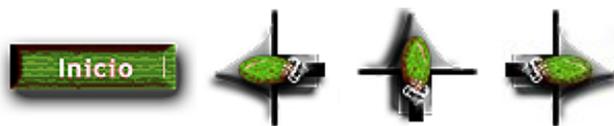
Estamos interesados en explorar la relación entre la estructura y la función de una enzima llamada β -lactamasa, que producen diversas bacterias para defenderse de la penicilina. La β -lactamasa nos llamó la atención en cuanto se publicó su estructura tridimensional (obtenida por cristalografía de rayos X). Lo atractivo de esta enzima es que su actividad consiste en degradar la penicilina y, al hacerlo permite que una bacteria que expresa β -lactamasa pueda vivir en presencia de este antibiótico (note el lector que es precisamente el gene que codifica para β -lactamasa el que se utiliza abundantemente en los vectores de donación bacteriana, ya que permite detectar las células que han adquirido el plásmido; véase el recuadro II.2. Los procedimientos básicos del ADN recombinante). Esto quiere decir que tenemos disponible de inmediato un método de *selección*.

¿Qué preguntas podemos responder aplicando los conceptos de variación y selección mencionados antes sobre la β -lactamasa? Hemos enfocado nuestros experimentos en el problema de la especificidad de esta enzima. La β -lactamasa con la que trabajamos es capaz de reconocer y destruir penicilinas, pero no cefalosporinas, que son compuestos muy similares. ¿En qué parte y de qué manera determina la secuencia de aminoácidos de la β -lactamasa el que sea específica para penicilinas? Para responder esta pregunta utilizamos la información proporcionada por la estructura cristalográfica. Observamos que en el sitio activo se encuentra una serie de aminoácidos que interactúan con la penicilina (véase la figura VI. 1). Una vez identificados estos aminoácidos potencialmente involucrados en el reconocimiento de la penicilina, diseñamos experimentos para introducir variabilidad en la posición que ocupan éstos dentro de la enzima. Mediante oligos degenerados, como los descritos anteriormente, generamos millones de diferentes genes de β -lactamasas, que difieren entre sí en alguno o algunos de los tripletes de bases que corresponden a los aminoácidos seleccionados. A partir de una biblioteca de clonas con esta colección de genes, podemos identificar una bacteria que ahora crezca en la cefalosporina, debido a que la β -lactamasa ya la puede reconocer.

Hasta el momento, en el laboratorio hemos encontrado un buen número de β -lactamasas variantes que reconocen diversos antibióticos. Con los datos obtenidos hemos aprendido mucho acerca de la relación entre la estructura y la función de estas enzimas. Adicionalmente, contamos con un método experimental para evaluar para qué antibióticos, de tipo de las penicilinas y cefalosporinas, es más difícil obtener una β -lactamasa que los destruya. Esta información puede ser de utilidad para las compañías farmacéuticas que desarrollan estos antibióticos.

La extensión natural de este tipo de investigación es la obtención de nuevas enzimas cuyas actividades y especificidades se adapten a las necesidades humanas. En particular, esquemas como el que estamos desarrollando pueden ser adaptados para la obtención de biocatalizadores, que tienen un gran potencial en la industria de la química fina (incluida la industria farmacéutica).

La explotación de los métodos de generación de variabilidad, mediante el uso de ADN recombinante, augura un futuro muy promisorio para obtener moléculas hechas a la medida. Se puede decir que en los últimos cinco años, usando estos métodos, se han explorado las propiedades de más compuestos que en toda la historia.



EPÍLOGO

Durante el proceso de escritura de este libro fui ahondando la convicción de que los efectos de la nueva biotecnología afectarán nuestras vidas de una manera muy significativa. Simultáneamente, me pregunté frecuentemente si la visión optimista y entusiasta que tengo respecto de la biotecnología sería compartida por muchos lectores. Me cuestioné si el material que se presentaba podría proveer un fundamento que permitiera apreciar las implicaciones y también las limitaciones de esta nueva tecnología. Desde luego, estoy seguro que en la mente de muchos lectores se presentarán también las consecuencias éticas, sociales y filosóficas que conlleva una gran capacidad para manipular la vida.

Claramente, no ha sido mi propósito darle un tratamiento desde estas perspectivas, sino más bien hacer una presentación desde el punto de vista técnico. Considero que, en mi papel de científico, ésta es mi responsabilidad. Cuando se espera que los avances tecnológicos repercutan de manera importante en la vida de los individuos, se hace necesaria una frecuente y franca comunicación. En este libro, pretendo aportar algunos elementos para el análisis.

Lo que no cabe duda es que la sociedad requerirá invertir una buena dosis de talento y capacidad de adaptación para reglamentar y utilizar lo que la nueva biotecnología puede ofrecerle. Pensándolo con cuidado, este reto de adaptación está presente en la mayoría de las facetas de la cultura y el quehacer humano. Todos estamos conscientes de que los cambios que antes tomaban siglos (y en épocas más remotas, milenios), hoy requieren quizá menos de una década. No es sencillo asimilar; adaptarse y ejercer dominio sobre una cultura sujeta a cambios vertiginosos.

Por supuesto, estoy consciente de que existen diversas corrientes que ven los avances de la biotecnología como una amenaza a los valores y al medio. Perdone el lector si en el curso de esta monografía no se presentaron los peligros y riesgos que algunos señalan. Para justificar esta omisión, permítaseme expresar brevemente una visión personal a este respecto: coincido en que la interpretación que algunos han propuesto de que las consecuencias éticas y filosóficas de la nueva biotecnología no son cualitativamente diferentes de las que la humanidad ha enfrentado durante mucho tiempo. Creo que el principal problema que hay que enfrentar es que ahora ocurren más rápido y en mayor grado. La visión fatalista antepone peligros, en muchos casos imaginarios, a la promesa de mejorar la calidad de vida que también, cabe esperar de la biotecnología. Una posición optimista es confiar en que las sociedades tienen maneras de aprovechar las ventajas y conjurar los peligros de las nuevas capacidades que adquieren. En última instancia, la tecnología resulta ser; fundamentalmente, una herramienta. La humanidad podrá usarla en forma constructiva y destructiva. Está claro para mí que el hombre cuenta ya con las armas tecnológicas para destruirse a sí mismo y su entorno. No creo que una decisión como ésta pueda depender de que disponga de un arsenal aún mayor de herramientas que pudiera usar erróneamente.

En una conferencia a la que asistí recientemente, se planteó el problema de si los avances de la ciencia requerían el planteamiento de una nueva ética. Ahí mismo, formulé al ponente la pregunta de si en realidad se podría pensar en reglamentar y limitar el acceso al conocimiento. Parece ser que esto es sumamente difícil y, probablemente, contraproducente. Es muy importante, en cambio, que la sociedad esté bien preparada para orientar y reglamentar el *uso* que se pueda dar a estos nuevos conocimientos.

Tengo la fuerte convicción de que los elementos de avance que experimentamos hoy en día, en todos los órdenes, permitirán conformar una sociedad con la capacidad para funcionar de maneras inimaginables al cabo de unas cuantas décadas. Efectivamente, creo que es factible esperar que la salud humana sea mejorada drásticamente, que la agricultura aumente de manera segura su productividad, que se encuentren formas alternas de generación de energía (aun antes de que aparezca como una realidad comercial la fusión nuclear), que la industria química avance hacia procesos más limpios y seguros. A todo esto debemos aparejar los adelantos en todos los demás ámbitos del desarrollo, que se desenvuelven a velocidades igualmente asombrosas. La pregunta que verdaderamente nos puede inquietar es: ¿tendrá la humanidad la capacidad de utilizar estas conquistas para crear sociedades más justas, que gocen del bienestar en armonía y en la que cada persona pueda alcanzar su máximo potencial, o atestiguaremos, frustrados, como el esfuerzo de 20 mil generaciones de seres humanos se ve finalmente reducido a cenizas? Parece lógico pensar que toca a nuestra generación, y a unas cuantas más, crear las condiciones de uno u otro desenlace.

Inicio



BIBLIOGRAFÍA

Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski y M. Zoller; *Recombinant DNA*, 2a. ed., W. H. Freeman, Nueva York, 1992.

Primrose, S. B., *Molecular Biotechnology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1991.

Hall, S. S., *Invisible Frontiers: the race to synthesize a human gene*, Tempus Books, Redmond, 1987.

Berg, P. y M. Singer, *Dealing with Genes: the language of heredity*, Blackwell Scientific Publications, Mill Valley, 1992.

Nossal, G. J. V. y R. L. Coppel, *Reshaping Life: key issues in genetic engineering*, Cambridge University Press, Melbourne, 1989.



GLOSARIO

ácido nucleico: nombre genérico que se aplica indistintamente al ADN o ARN de las dos moléculas informacionales de los seres vivos.

ADN (ácido desoxirribonucleico): molécula que almacena la información genética.

ADN recombinante: término que se usa en la tecnología aplicada para obtener moléculas de ADN híbridas, por ejemplo, provenientes de diversos seres vivos.

aminoácido: unidad monomérica fundamental de las proteínas. Existen 20 tipos diferentes.

antígeno: sustancia extraña a un organismo, capaz de desencadenar la producción de una respuesta inmune. Blanco de los anticuerpos.

ARN (ácido ribonucleico): molécula que transmite información genética. Además cumple con funciones estructurales y de acoplamiento en la maquinaria de traducción de la información.

ARN mensajero: molécula de ARN, copia de un gene, que lleva la información desde el genoma hasta donde se realiza la traducción.

biología molecular: rama de la biología nacida a raíz de la identificación de la naturaleza química (molecular) del material genético. Hoy día, nos referimos a biología molecular cuando hablamos de estudios o técnicas centradas en los genes y sus productos inmediatos, las proteínas.

catalítico: referente a la catálisis. Proceso en el que un componente (catalizador) acelera la transformación de unos compuestos químicos en otros. El catalizador no se altera al final de la reacción, por lo que puede actuar repetidamente.

cepa silvestre: la variedad natural de un determinado organismo. Su contraparte es una cepa mutante que contiene lesiones particulares en su genoma.

clonación molecular: propagación de una molécula a través de su replicación repetida para obtener una población de moléculas idénticas a la primera. Constituye el procedimiento central de las técnicas de ADN recombinante.

código genético: reglas de correspondencia entre la secuencia de bases del ADN y la secuencia de aminoácidos de una proteína. Para relacionar un código de cuatro letras (bases), con uno de 20 letras (aminoácidos), se requiere usar tres bases por aminoácido. La secuencia de bases del ADN, leída de tres en tres, constituye una secuencia de codones que corresponde a un aminoácido cada uno.

conformación: arreglo espacial que adopta una molécula, en virtud de los diferentes ángulos de rotación que pueden adquirir sus enlaces químicos.

cromosoma: unidad genética constituida por una molécula de ADN. Su tamaño y número varía, dependiendo de la especie de que se trate. Puede medir desde medio millón (en las bacterias más simples) hasta varios cientos de millones de pares de bases (en los organismos superiores). En los organismos eucariontes los cromosomas se condensan y hacen visibles en ciertos momentos del ciclo de reproducción celular.

diálisis: proceso en el que se separan componentes en solución, a través de una membrana semipermeable. Sólo los componentes con cierto tamaño molecular pueden pasar de un lado al otro.

enzima: proteína con actividad catalítica, es decir; que acelera una reacción química específica sin destruirse en el proceso. Las moléculas blanco de una enzima se denominan sustratos.

eucarionte: organismo con núcleo organizado y cromosomas. Forma parte de un gran grupo que difiere de los

procariontes (las bacterias y organismos similares) que carecen de núcleo. Existen diferencias fundamentales entre la organización genética de uno y otro grupo.

fenotipo: se refiere a la manifestación observable de un determinado genotipo. A un genotipo corresponde un fenotipo. Por ejemplo, a la presencia de un gene productor de mucha melanina (genotipo), corresponde una coloración oscura de la piel (fenotipo).

genoma: término que denota a todo el material genético de un organismo vivo. En un ser humano, por ejemplo, se refiere a todas las secuencias de todos los cromosomas de una célula.

genoteca: conjunto de moléculas recombinantes, usualmente mantenido dentro de células bacterianas; un conjunto representa a un genoma o a parte de él.

genotipo: se usa para denominar al componente genético de un determinado individuo o variedad. Se refiere, en última instancia a la secuencia de su genoma. Su contraparte es el fenotipo.

hibridación: aplicado a los ácidos nucleicos, significa su capacidad de encontrar o asociarse a la hebra opuesta o complementaria.

ingeniería genética: sinónimo de ADN recombinante. El término "biogenética" es erróneo y no se usa en este contexto.

intrón: segmento de un gene que no corresponde a su producto final y que se remueve en el proceso posterior a la transcripción.

in vitro: se refiere a condiciones experimentales en las que no existen células u organismos vivos. Condiciones dadas en portaobjetos microscópicos, tubos de ensayo, etcétera

in vivo: se refiere a condiciones experimentales que incorporan células u organismos vivos.

molécula: conjunto de átomos unidos unos con otros por enlaces fuertes. Es la expresión mínima de un compuesto o sustancia química. Trabajar con estas entidades primordiales justifica el uso del término "molecular" para denominar diversas áreas de la investigación en biología. (Entidad química constituida por la unión de varios átomos. Es la expresión mínima de un concepto químico. Una macromolécula puede estar constituida por miles o hasta millones de átomos, típicamente enlazados en largas cadenas.)

mutagénesis: proceso por el cual se inducen cambios en el material genético de un organismo. El proceso puede ser espontáneo o inducido.

nucleótido: unidad fundamental de los ácidos nucleicos. Constituida por una base, un azúcar y un fosfato.

organelo: estructura intracelular especializada en una función determinada, como el núcleo, las mitocondrias, los cloroplastos, los ribosomas, etcétera.

organismo transgénico: organismo vivo que contiene algún o algunos genes introducidos de manera exógena a su patrimonio genético. Se utiliza especialmente en los casos de plantas y animales.

plásmido: pequeña molécula circular de ADN. Constituye material genético adicional al cromosoma bacteriano, frecuentemente no indispensable.

PNA: *Peptide Nucleic Acid*. Análogo del ADN en el que el esqueleto no es azúcar y fosfato, sino entidades similares a péptidos o proteínas.

proteína: sustancia bioquímica constituida por una hebra o cadena lineal de unidades llamadas aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de una proteína determina su estructura y su función. Las proteínas son los productos primarios codificados por los genes, encargadas de organizar la actividad bioquímica celular.

replicación: proceso por el cual las moléculas de ADN se duplican, generando dos copias iguales a partir de una sola. El proceso requiere la separación de las dos hebras de la molécula original.

ribosoma: organelo encargado de manufacturar proteínas, de acuerdo con las instrucciones del ADN (presentes en el ARN mensajero). Es un agregado de proteínas y ARN, llamado ribosomal.

sitio activo: zona de una enzima con la que se asocia el sustrato y donde se induce su transformación química para dar un producto. Los sitios activos frecuentemente son hendiduras en la superficie de las enzimas.

sonda de hibridización: segmento de ácido nucleico (ADN o ARN) que por sus propiedades de asociación con la secuencia complementaria, se utiliza para detectar su presencia en una muestra.

sustrato: sustancia o molécula con la que interacciona una enzima, transformándose en productos.

traducción: proceso por medio del cual se lee la secuencia de codones del ARN y se elabora una cadena de proteína, con la secuencia correspondiente, de acuerdo con el código genético.

transcripción: proceso por el que un gene se expresa mediante la síntesis de un ARN que contiene la misma secuencia del gene.

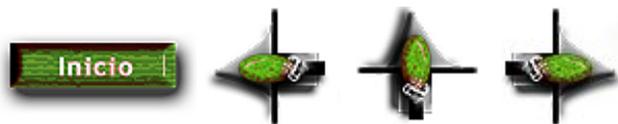
transducción de señal: frase que se aplica al proceso por el cual una señal molecular (por ejemplo, la presencia de una hormona en el medio extracelular) es convertida en una respuesta (por ejemplo, generación de un compuesto en el medio intracelular). Esta respuesta puede ser después amplificada o atenuada y, a su vez, dar origen a otro evento de transducción de señal.

transformación: procedimiento que permite introducir, directamente a células vivas, moléculas de ADN. Existen varios procedimientos que pueden lograr este objetivo: tratamiento con calcio, descarga eléctrica, pistolas génicas, etcétera.



ÍNDICE DE RECUADROS

- [I.1. Estructura y Replicación del ADN](#)
- [I.2. La expresión de la información genética](#)
- [I.3. Las técnicas de separación de las biomoléculas](#)
- [II. 1. La separación de los ácidos nucleicos](#)
- [II. 2. Los procedimientos básicos del ADN recombinante](#)
- [II. 3. El debate inicial sobre el ADN recombinante](#)
- [II. 4. El ADN sintético y sus aplicaciones](#)
- [II. 5. Procedimiento para obtener la secuencia del ADN.](#)
- [III. 1. Aislamiento de genes usando oligonucleótidos sintéticos](#)
- [III. 2. Obtención del ADN complementario](#)
- [IV. 1. El gene y sus partes](#)
- [IV 2. Proceso de la generación de anticuerpos](#)
- [IV 3. Ciclo de vida del virus que produce el SIDA](#)
- [IV. 4. Obtención de ratones transgénicos](#)
- [IV. 5. La ingeniería genética aplicada en las plantas](#)
- [IV 6. Los relojes moleculares](#)
- [V.1. Las compañías de biotecnología. Fundación de Genetech](#)
- [V.2. Proteínas terapéuticas expresadas por la ingeniería genética](#)
- [VI. 1. Estructura de las biomoléculas](#)
- [VI.2. Estrategias antivirales usando información estructural](#)



COLOFÓN

Este libro se terminó de imprimir y encuadernar en el mes de octubre de 1997 en los talleres de Impresora y Encuadernadora Progreso, SA. de C. V. (IEPSA), calzada de San Lorenzo 244, 09830 México, D.F.

Se tiraron 2,000 ejemplares.

La ciencia desde México es una colección coordinada editorialmente por *Marco Antonio Pulido* y *María del Carmen Farías*.



CONTRAPORTADA

La aventura de la biología experimental, desde sus albores con van Leeuwenhoek, pasando por Mendel, Darwin, Pasteur, hasta Watson y Crick produjo un cúmulo de conocimientos y la intuición de algo grandioso. Ese territorio estaba descubierto, pero no era conquistable. Su exploración requirió el ADN recombinante. Las riquezas halladas, en términos de conocimiento científico, son planteadas en este libro y también su utilización: la nueva biotecnología. Pero ¿serán estos tesoros causa de discordia y destrucción? Sólo la sociedad informada podrá plantear las condiciones para que sean beneficiosas.

El libro de Soberón Mainero tiene dos propósitos: primero, comunicar y entusiasmar al lego acerca de la situación actual de la moderna biología experimental —la ingeniería genética— y segundo, servir de base para que el lector pueda distinguir entre la charlatanería y la ciencia ficción de los nuevos avances científicos. La ingeniería genética puede contestar muchas de las preguntas que antes no tenían respuesta acerca de nuestra compleja diversidad biológica; tiene, además, la capacidad de transformar el mundo de los seres vivos. No obstante, la pregunta es: ¿podrá el hombre utilizar de manera adecuada esta capacidad?

Francisco Xavier Soberón Mainero es químico egresado de la Universidad Iberoamericana. Realizó la maestría y el doctorado en investigación biomédica básica en la UNAM; realizó estudios posdoctorales en la Universidad de California, en San Francisco. Desde una etapa temprana de su carrera tuvo acceso a las técnicas de ingeniería genética cuando recién habían sido traídas a México por el doctor Francisco Bolívar. Posteriormente, se especializó en la síntesis química del ADN y sus aplicaciones. Es investigador nacional nivel II, del Sistema Nacional de Investigadores, investigador titular "B" de tiempo completo del Instituto de Biotecnología de la UNAM y secretario académico de dicho Instituto. Ha publicado numerosos artículos en revistas y libros en México y en el extranjero. Se ha desempeñado como profesor y director de tesis profesionales y de posgrado.

Inicio

