

35

CAPÍTULO

Tecnología del ADN recombinante

Entre las ciencias teórica y técnica existe una relación dialéctica. La teoría busca el conocimiento de las leyes generales de la naturaleza a partir del estudio detallado de numerosos fenómenos, en tanto, la técnica persigue el objetivo de convertir esos conocimientos en instrumentos prácticos vinculados directa o indirectamente a la producción material.

Esta interacción se ha hecho tan evidente en las últimas décadas, con la aparición de la revolución científicotécnica, que ha llevado a formular la tesis de la conversión de la ciencia en una fuerza productiva; pero existe también la relación inversa, o sea, los avances tecnológicos también contribuyen, de forma considerable, al desarrollo de la ciencia teórica con la producción de instrumentos que alcanzan cada vez un grado más elevado de perfección y que sirven para profundizar aún más en el conocimiento de la naturaleza. A esta situación no escapan algunos campos, al parecer tan alejados, de la vida práctica como la genética molecular.

Existen muchos ejemplos de como en los últimos 40 años, el desarrollo tecnológico ha conducido a gigantescos pasos de avance en el conocimiento de la biología molecular. La difracción de rayos X permitió a los investigadores tener una visión detallada de la estructura de las macromoléculas, así como la técnica de centrifugación en gradientes de densidad de CsCl abrió las puertas al conocimiento del mecanismo de replicación del ADN. La adquisición más reciente lo constituye la técnica para unir moléculas de ADN *in vitro*, denominada tecnología del ADN recombinante. Esta técnica básica y sus múltiples variantes han revolucionado el estudio de la genética de los eucariontes y ha proporcionado fuentes de proteínas específicas en cantidades consideradas anteriormente casi imposible.

En este capítulo se estudiarán los procedimientos generales de esta tecnología y algunas implicaciones de sus procedimientos, en especial aquéllos que más vinculados están con la práctica médica. No se pretende, ni mucho menos, hacer un análisis pormenorizado de este tema, que por lo demás está en constante crecimiento, ni siquiera dar una descripción de sus múltiples procedimientos. El objetivo principal es dar a los lectores una idea de cómo estos conocimientos del nivel molecular de la biología pueden ser utilizados en la práctica.

Procedimiento general

Existen numerosos procedimientos para la manipulación de los genes, de acuerdo con los objetivos que se persigan. Un procedimiento general para la

obtención de cantidades apreciables de productos génicos se puede dividir en las etapas siguientes:

1. Obtención de un segmento de ADN, o sea un gen, a partir de genoma de un organismo dado.
2. Unión de este gen a una molécula de ADN capaz de replicarse.
3. Establecimiento de un medio adecuado que permita la propagación de la unidad de ADN así formada.

La molécula de ADN utilizada para la propagación del gen deseado se refiere entonces como vector; éste es el vehículo molecular que porta la información genética, en la cual se está interesado. Cuando el gen deseado se propaga en ese medio y se replica, se llegan a obtener numerosas copias, se dice entonces que el gen ha sido clonado, y por ende, a este proceso se le da el nombre de clonación. El término clonación se utilizó por primera vez para describir el fenómeno por el cual se obtiene un gran número de células a partir de un antepasado único, por lo tanto aquí sólo se ha hecho una extensión del concepto hacia la obtención de un gran número de genes iguales a partir de un gen inicial único.

Se hará una somera descripción de cada una de estas etapas, haciendo énfasis en la estrategia que se debe seguir mediante los procedimientos técnicos indispensable para la comprensión general del proceso (Fig. 35.1).

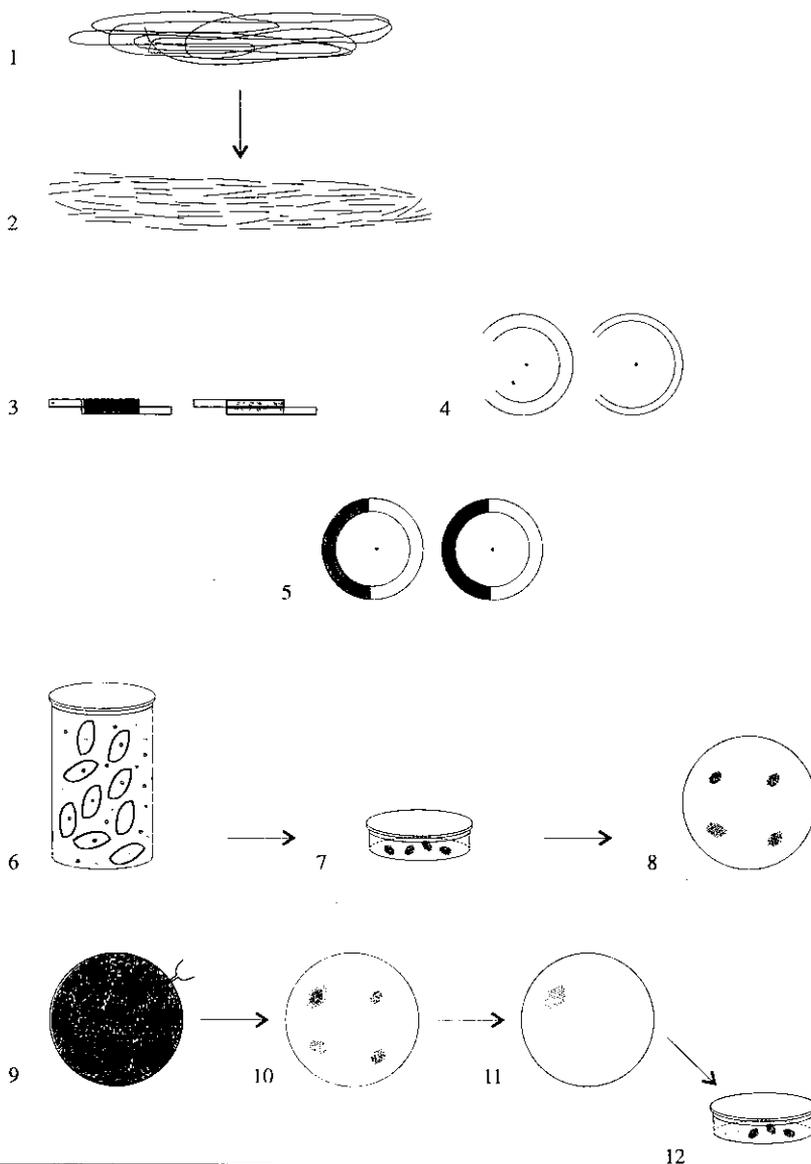


Fig. 35.1. Procedimiento general. El ADN del genoma de una célula de mamífero (1) es fragmentado por la acción de una enzima de restricción (2), algunos de esos fragmentos puede incluir el gen deseado (3 en color). Numerosas copias de un plásmido son tratadas con la misma enzima (4). Los plásmidos y los fragmentos del genoma se mezclan y unen por acción de la ADN ligasa y estos plásmidos recombinados se introducen en las bacterias (6). Las bacterias se siembran en una placa (7) suficientemente separadas, como para que cada una de ellas pueda dar origen a una colonia en que todas las células sean descendientes de una sola, o sea, formen un clon. Sólo algunos clones celulares contendrán el plásmido con el gen deseado. Existe una forma muy simple de localizar ese clon, si se posee el ARNm derivado del gen, y se puede utilizar como una sonda. Una muestra de las colonias se transfiere a un papel de filtro, las células son rotas para exponer su ADN (8) y se le añade el ARNm sonda marcado con un isótopo radiactivo (9), que se hibrida con el ADN deseado solamente, y el exceso es descartado (10). Se realiza entonces la autorradiografía del papel de filtro (11) y, comparando la aparición de la marca radiactiva con la posición de las colonias en la placa original, se identifica la colonia buscada (12).

Obtención de genes específicos

El mayor impacto de esta tecnología fue sobre los mecanismos de las células eucariotas, por eso sólo se hará referencia a la obtención de genes eucariontes en forma simplificada, pues en ocasiones, la complejidad del proceso rebasa los límites de este texto.

El primer intento de obtención de un gen eucarionte fue directamente de la célula; se extraían las moléculas de ADN y se exponían a la acción de una enzima de restricción; los fragmentos que se obtenían solían ser muy grandes y era necesario volver a fragmentarlos mediante una endonucleasa con especificidad diferente a la primera; esto podía repetirse varias veces hasta obtener fragmentos de tamaño adecuado para su manipulación. El estudio de los puntos de corte de varias enzimas sobre una molécula de ADN origina los llamados mapas de restricción, que consisten en la representación de la molécula de ADN, señalando los puntos donde es cortada por cada una de las endonucleasas ensayadas; cuando se tenía el fragmento deseado se procedía a su inserción en un vector. Pero este procedimiento no dio los resultados esperados; a partir de experiencias de este tipo fue que quedaron establecidos el carácter discontinuo de los genes eucariontes y la existencia de los intrones; estas características entorpecían la expresión de los genes eucariontes en bacterias.

El segundo procedimiento consistió en aislar no al gen, sino al ARNm transcrito a partir de él, para ello generalmente se seleccionaba una célula especializada en la síntesis de determinada proteína, de manera que la concentración del ARNm fuera lo más elevada posible, por ejemplo, los reticulocitos para el ARNm de la globina, las células β del páncreas para ARNm de insulina, etcétera. Este proceder tiene la ventaja de que ya han sido eliminados los intrones. Para la obtención del gen se incuban el ARNm con los 4 dNTP y una enzima que se obtiene de retrovirus, que es capaz de formar una molécula de ADN tomando como molde una de ARN, por lo cual se le ha denominado ADN polimerasa dependiente de ARN, transcriptasa inversa o enzima de Temin, en honor a *Howard Temin*, quien la descubrió en 1970. En este procedimiento se obtiene el llamado ADN complementario (ADNc), en el cual se conserva la información necesaria para la síntesis de proteínas, pero se han eliminado los intrones y, por lo tanto, no se requiere del procesamiento del transcrito primario.

El tercer procedimiento consiste en hacer la síntesis artificial del gen; en estos casos se parte de la secuencia de aminoácidos del péptido, pues la síntesis de ADN muy largos no ha sido posible aún, y se deduce la secuencia de bases del ADN mediante el código genético.

Esta secuencia no necesariamente es igual a la del gen natural debido al carácter degenerado del código. Por procedimientos complicados de síntesis artificial se logra una copia del gen con la secuencia de bases específicas.

Recombinación *in vitro*

Para el proceso de recombinación *in vitro* son necesarias las enzimas de restricción, que ya fueron estudiadas en el capítulo 33. A los efectos de este procedimiento se tendrán en cuenta sólo 2 tipos de enzimas, aquéllas que al producir el corte sobre las 2 hebras del ADN lo hacen de forma que originan pequeños fragmentos monofibrilares, y las que cortan en el mismo sitio las 2 hebras sin dejar en el producto este tipo de fragmento; esta distinción se hace porque, de acuerdo con el tipo de enzima empleada, el procedimiento que se debe seguir será diferente.

En el primer caso se opera de la forma siguiente: se extrae el ADN de la célula y se digiere con una enzima de restricción, sea la EcoRI, de esta forma se obtienen numerosos fragmentos. El vector que se va a emplear se digiere igualmente con la misma enzima; se trata de que el vector empleado sólo tenga un sitio sensible a la acción de la endonucleasa empleada; después se incuban juntas las 2 muestras de ADN para permitir su recombinación y se añade ADN ligasa para sellar las brechas y dejar la molécula insertada en el vector (Fig. 35.2).

En el segundo caso se requiere de una enzima que es algo excepcional y que se obtiene de algunos tejidos animales, se trata de la nucleotidil transferasa terminal, la cual es una ADN polimerasa que añade desoxinucleótidos (a partir de dNTP) al extremo 3' -OH de un fragmento de ADN de cadena simple, con el hecho sobresaliente de que no requiere un molde para su acción.

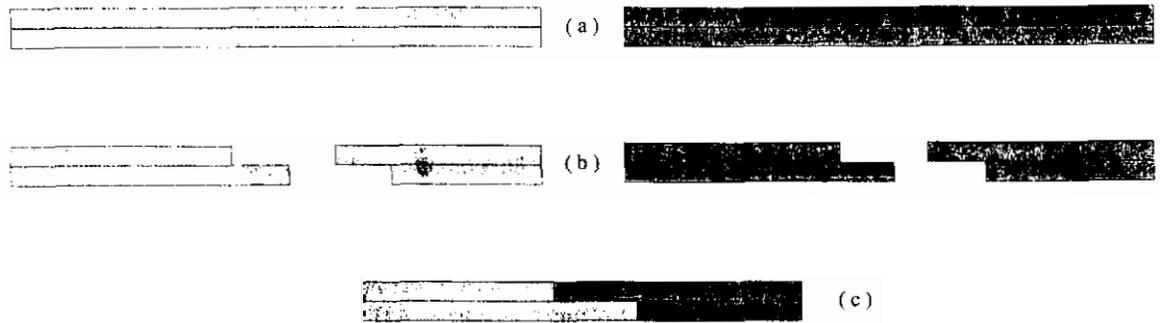


Fig. 35.2. Recombinación con enzimas que originan fragmentos monofibrilares. Como se muestra en la figura, si 2 ADN son tratados con una misma enzima de restricción, de las que originan fragmentos monofibrilares, al mezclar las 2 muestras en presencia de ADN ligasa la recombinación ocurre fácilmente.

El procedimiento entonces sería como sigue: se extrae el ADN de una célula y se digiere con una enzima de restricción, la HaeI, y los fragmentos se someten a la acción de una 5'-exonucleasa, específica para eliminar algunos de los nucleótidos terminales y originar un fragmento monocatenario con el extremo 3'-OH. Después, el ADN así tratado se incuba con un desoxirribonucleósido trifosfatado, puede ser dTTP, y la nucleotidil transferasa terminal que formará una cola de poli(T) en los 2 extremos 3'-OH. El vector puede ser cortado con cualquier enzima del mismo tipo, se trata con la 5'-exonucleasa y después se incuba con la nucleotidil transferasa terminal y el desoxinucleótico complementario al empleado en el caso anterior (dATP) y se formará una cola de poli(A) en ambos extremos 3'-OH del vector, por último, se incuban el ADN tratado y el vector con la ADN ligasa y se produce la recombinación (Fig. 35.3).

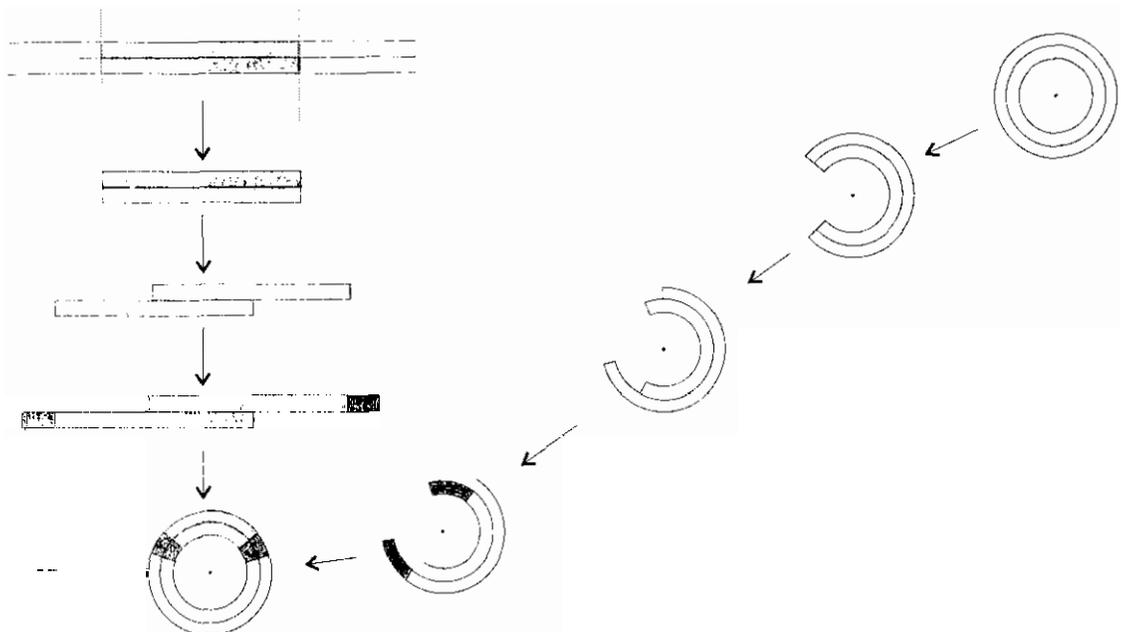


Fig. 35.3. Recombinación con enzimas que no originan fragmentos monofibrilares. Cuando la enzima de restricción no origina fragmentos monofibrilares es necesario la acción de la 5' exonucleasa que crea un pequeño fragmento monofibrilar, que será utilizado por la nucleotidil transferasa terminal para añadir nucleótidos al extremo 3'-OH. Si al fragmento de ADN de nuestro interés y al plásmido que usaremos en la recombinación se añaden nucleótidos de bases complementarias, se generan fragmentos monofibrilares que son complementarios y que al mezclarlos en presencia de ADN ligasa recombinan fácilmente.

La recombinación *in vitro* también ha permitido un modo relativamente fácil para la obtención de genes. En ocasiones es más sencillo trabajar con el genoma completo que con un gen particular, sobre todo si este último es desconocido; eso se logra de la forma siguiente: se extrae el ADN celular y se corta en fragmentos, utilizando enzimas de restricción en fases sucesivas hasta que los fragmentos tengan un tamaño de fácil manipulación, estos fragmentos se aíslan unos de otros y cada uno es recombinado con un ADN viral, generalmente de fagos. Las colonias de fagos bien identificadas se conservan, y pueden servir para la identificación de genes específicos; a esta colección del genoma de una célula en fragmentos guardados en vectores específicos, casi siempre en virus, se le da el nombre de genoteca.

¿Cómo buscar un gen en una genoteca? Existen varios procedimientos pero sólo se hará referencia a uno de ellos, un ejemplo hipotético será más ilustrativo. Suponga que un tipo de bacterias sintetiza una sustancia Pq , que es necesaria para su crecimiento y reproducción, se obtiene un mutante de fenotipo Pq^- , que no sintetiza esa sustancia; si se tiene una genoteca de la bacteria Pq^+ se puede aislar el gen mutado, para ello haga crecer las bacterias Pq^- en varias colonias añadiendo al medio de cultivo la sustancia Pq , luego infecte cada una de las colonias con un virus de la genoteca portador de un fragmento del ADN. Si se elimina la sustancia Pq del medio de cultivo, sólo podrán crecer aquellas bacterias que han incorporado de la genoteca el gen mutado. Como el fragmento está identificado puede fragmentarse con enzimas de restricción y hacer una subgenoteca, que vuelve a probarse en otros cultivos, y así sucesivamente hasta obtener el gen que se busca. Por un procedimiento similar a éste se pudo descubrir y aislar el oncogen ras.

Otros procedimientos de recombinación *in vitro* no serán discutidos.

Vectores

En el acápite anterior se hizo referencia a los vectores; se entiende por vector a una molécula de ADN que se emplea para introducir el gen deseado en una célula. Para que un vector sea útil debe reunir las condiciones siguientes:

1. Debe ser capaz de replicarse.
2. Debe existir algún procedimiento para detectar su presencia.
3. Debe haber alguna forma de introducir el vector en una célula.

Los 3 tipos fundamentales de vectores empleados en estos procedimientos y que, por lo tanto, cumplen estos requisitos son los plásmidos, algunos virus- especialmente los bacteriófagos- y los llamados cromosomas artificiales de levadura.

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN extracromosómico encontradas en muchas bacterias y en algunas especies de eucariontes. Muchos plásmidos contienen genes que son esenciales en determinados medios; por ejemplo, los plásmidos del tipo R contienen genes que aportan a la célula la resistencia a determinados antibióticos, que pueden aparecer en el medio por acción humana o por la presencia de otros microorganismos que los producen. Los plásmidos de éste y otros tipos son generalmente identificados por los genes que portan, sin embargo, en ocasiones, el plásmido es encontrado de manera accidental como una pequeña molécula circular de ADN presente en una muestra aislada de un extracto celular.

Los plásmidos tienen por lo regular una sola molécula de ADN, cuyo peso molecular está entre 10^6 para los menores y 10^8 para los mayores.

Los plásmidos sólo pueden replicarse dentro de su propia célula, pero la forma en que lo hacen no es necesariamente igual a la que se utiliza en los cromosomas, incluso 2 plásmidos de una misma célula pueden tener formas distintas de replicación. Se pueden distinguir 2 tipos de plásmidos de acuerdo con el control de su replicación: los de control estricto y los de control relajado; los del primer tipo existen en muy pocas copias por célula y su replicación se realiza junto con el ADN cromosómico, y al dividirse la célula se reparten de forma equitativa entre las 2 células hijas, y los del segundo tipo existen en un número mayor y su replicación es independiente de la del

ADN cromosómico. Si se inhibe la síntesis de proteínas, estos plásmidos se multiplican rápidamente y pueden llegar a haber cientos por célula por lo que son preferidos para ser empleados como vectores.

Muchos plásmidos pueden transferir una réplica de ellos desde una célula donante a una receptora; por ejemplo, si una sola célula de *E. coli* que contiene el plásmido F se añade a un cultivo de células tipo F⁻ que no contengan el plásmido, después de varias generaciones una gran proporción de células contendrá el plásmido F, o sea, se ha realizado la transferencia de una réplica del plásmido F, de una célula F⁺ a una célula F⁻, sin que la célula inicial haya perdido el suyo. Como después de la transferencia, F se replica, con cada transferencia aparecen más células donantes y como el fenómeno ocurre 1 a 2 veces por generación, el plásmido se propaga rápidamente en el cultivo. Estas características de los plásmidos, así como su posibilidad de conjugación (capítulo 31) hacen de ellos unos magníficos portadores de genes para la tecnología del ADN recombinante.

Los demás vectores más empleados son los virus, éstos se encuentran formados por una molécula de ADN y una cubierta de proteínas. Cuando un virus se añade a un cultivo bacteriano, éste se fija a la pared celular e inyecta su ADN al interior, en tanto, las proteínas de la cubierta quedan fuera, como se muestra en la figura 35.4.

Dentro de la célula el virus utiliza el aparato metabólico de ésta para la replicación de su ADN y la síntesis de las proteínas virales, de manera que con un solo virus que penetre en una célula pueden obtenerse cientos de copias del ADN viral, que después puede recuperarse con relativa facilidad.

Los cromosomas artificiales de levadura son grandes moléculas de ADN, que se construyen con los centrómeros y los telómeros de cromosomas de levaduras y segmentos de ADN extraño; también contienen las secuencias necesarias para la replicación. El criterio de selección del vector está determinado esencialmente por el tamaño del gen deseado. Los plásmidos son capaces de acomodar los genes más pequeños, en tanto los cromosomas artificiales de levadura acomodan los de gran tamaño y los virus, los de tamaño intermedio.

Una vez que el gen deseado ha quedado incorporado al vector, éste debe ser transferido al interior de una célula, lo cual en el caso de los plásmidos puede hacerse mediante sales de calcio que aumenten la permeabilidad de las membranas de las células bacterianas.

En el interior de la célula el ADN se replica muchas veces, por lo que se originan numerosas copias del gen deseado, o sea, el gen ha sido clonado.

Si el gen no es muy grande puede realizarse la clonación *in vitro* mediante el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa; para ello es necesario contar con 2 pequeños oligonucleótidos que sean complementarios a los extremos 5' del gen, los cuales tendrán la función de servir de iniciadores; se procede de la forma siguiente: el ADN se calienta a una temperatura de aproximadamente 94 °C para provocar su desnaturalización, después se añaden los oligonucleótidos y se enfría lentamente hasta unos 56 °C, para permitir la hibridación de los oligonucleótidos a los extremos 5' de las 2 hebras del ADN desnaturalizado; entonces se añade una ADN polimerasa y la temperatura se eleva a 72 °C para realizar la elongación del iniciador.

En la actualidad todos los componentes del sistema, incluyendo los 4 desoxinucleósidos trifosfatados, se incuban simultáneamente, pues se utiliza la enzima Taq, extraída del *Thermophilus aquaticus*, que es resistente a los cambios de temperatura. Existen equipos que hacen todo el procedimiento de manera automática. El primer ciclo demora casi 90 segundos, pero para los siguientes pueden utilizarse entre 50 y 60 segundos; se debe tener presente que en cada ciclo, el número de moléculas de ADN presentes se duplica, por lo cual existe un crecimiento exponencial del tipo 2ⁿ, donde n es el número de ciclos. Por este procedimiento pueden obtenerse numerosas copias del gen en escasos minutos.

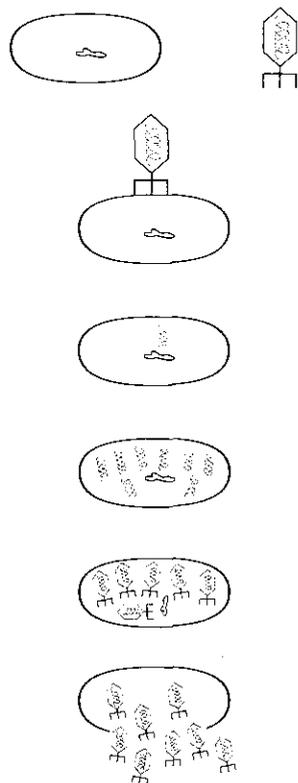


Fig. 35.4. Mecanismo de la penetración de un virus. Los virus se fijan a la pared de las células bacterianas e inyectan su material genético al interior de la célula, en tanto, las proteínas que forman la cubierta de virus se quedan en el exterior; esto hace que los virus puedan ser utilizados eficientemente como vectores en las experiencias de ADN recombinante.

Identificación del gen recombinado

El plásmido más empleado para la clonación es el pBR322 de *E. coli*, que tiene un peso molecular de $2,9 \times 10^6$ y porta los genes para la resistencia a la tetraciclina (tet) y a la ampicilina (amp), por lo que las bacterias que contienen el plásmido pueden ser detectadas al ponerlas a crecer en un medio que contenga esos antibióticos. Además, este plásmido presenta 7 sitios de restricción para otro tanto número de enzimas.

El método más empleado para detectar el plásmido recombinante es el llamado **inactivación por inserción**. Los sitios para las enzimas *Bam*HI y *Sal*I están dentro del gen tet, luego si se produce la recombinación utilizando cualquiera de estas enzimas, el plásmido se torna amp⁺ y tet⁻, o sea, ha ocurrido una inactivación del gen tet por la inserción del ADN que queremos clonar.

El procedimiento en líneas generales es como sigue: el gen deseado se inserta en el gen tet del plásmido pBR322 y éste se añade a un cultivo de *E. coli* que sea amp⁻ tet⁻. Después de esperar un tiempo adecuado para permitir la penetración del plásmido, las células se transfieren a un medio que contiene cicloserina y tetraciclina. La cicloserina mata a las células que crecen, se multiplican y que son resistentes a la tetraciclina. Las que contienen el plásmido recombinado no pueden crecer por la presencia de tetraciclina en el medio; después de un tiempo prudencial las células se lavan y se cambian a un medio que contiene ampicilina, al cual las células son resistentes.

Por este procedimiento sobreviven las células amp⁺ tet⁻, que son precisamente las que contienen el plásmido recombinado (Fig. 35.5)

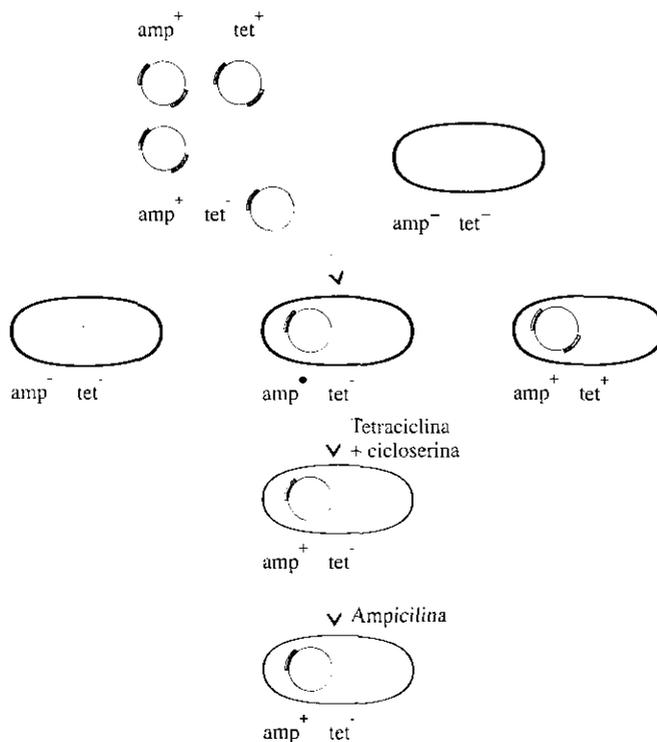


Fig. 35.5. Identificación del plásmido recombinado. Si empleamos un plásmido que tiene los genes para la resistencia a la tetraciclina (tet) y a la ampicilina (amp), o sea, es de tipo tet⁺ amp⁺, y el ADN de nuestro interés se incorpora en la zona del gen tet, se origina un plásmido que es tet⁻ amp⁺. Si este plásmido recombinado se introduce en una bacteria que sea tet⁻ amp⁻, la bacteria se torna tet⁻ amp⁺. Estas bacterias se exponen a la acción simultánea de la tetraciclina y la cicloserina. Como las bacterias que sean tet⁺ crecen y se multiplican, la cicloserina las mata, en tanto, las tet⁻, como presentan una inhibición de su crecimiento, no son afectadas por la cicloserina. Si después las bacterias sobrevivientes se pasan a un medio que contiene ampicilina, sólo quedarán aquellas que sean resistentes y, por lo tanto, sean tet⁻ amp⁺, que son las que han incorporado el plásmido recombinado.

Problemas en la producción de proteínas eucariontes

La utilización de bacterias para la producción de proteínas de eucariontes origina los problemas siguientes:

1. Las ARN polimerasas bacterianas no reconocen los promotores de eucariontes.
2. Los ARNm transcritos de genes eucariontes no contienen en el extremo conductor la secuencia rica en purinas, que permite a los ARNm de procariontes unirse específicamente al ribosoma.
3. Las proteínas eucariontes sufren modificaciones postraduccionales específicas.
4. Las bacterias contienen proteasas que reconocen como extrañas las proteínas eucariontes y las hidrolizan.

Los problemas 1 y 2 pueden eliminarse si el gen se une previamente a un promotor bacteriano, por ejemplo, el promotor del operón lac.

El procesamiento de las proteínas en general se realiza *in vitro*. La protección contra las proteasas se logra en ocasiones por la obtención de bacterias mutantes, que carecen de esa actividad específica, o por el empleo de inhibidores. Aun así, no es fácil lograr todas las condiciones requeridas para un caso específico, de ahí que el número de experiencias exitosas no sea aun muy elevado.

Expresión de genes clonados

Para la expresión de los genes clonados es necesario que éstos sean transcritos y traducidos, para eso debe construirse el llamado vector de expresión.

Si el vector utilizado en la clonación contiene un promotor cerca del sitio de inserción, este promotor puede ser usado, pero en muchos casos el vector carece del promotor adecuado, entonces es necesario reconstruirlo de forma que contenga, además del gen de interés, el promotor adecuado. En estos casos se trata de emplear un promotor fuerte para hacer máxima la transcripción, o un promotor que presente alguna característica especial.

El procedimiento comúnmente utilizado es rediseñar un plásmido, de manera que contenga la región promotor operador del operón lac y hasta un pequeño sector del gen de la β -galactosidasa seguido del gen deseado. En estas condiciones la adición del inductor conectará el sistema que producirá la proteína deseada, y la adición de glucosa desconectará el sistema al aumentar la concentración intracelular del AMPc.

El trabajo más difícil consiste en la purificación de la proteína producida, pues es una tarea muy laboriosa que requiere una gran destreza y en la mayoría de los casos no poca imaginación.

A pesar de todos estos recursos no siempre se logra la expresión del gen; sólo una de las 2 hebras del ADN es utilizada como molde en la transcripción, y en el proceso de recombinación artificial se introduce ADN de doble hebra. Como los 2 extremos son iguales, por la simetría de la secuencia, existe la posibilidad de que el apareamiento se produzca de forma que coincida la cadena codificadora del promotor con la no codificadora del gen insertado, en este caso la expresión es imposible.

Basta que una o varias células logren la incorporación del gen en la forma adecuada, para que al cabo de algunas horas se tengan tantas copias como se quiera; la *E. coli* tiene un tiempo de duplicación de sólo 30 minutos.

Experiencia típica

Una vez conocidos todos los elementos de trabajo, así como las dificultades que encierran estos experimentos, se describirá una experiencia exitosa de síntesis de un producto eucarionte por medio del aparato metabólico de la *E. Coli*, se trata de la

somatostatina, una hormona polipeptídica de 14 aminoácidos que se sintetiza normalmente en el hipotálamo y el páncreas.

Como el número de aminoácidos es pequeño, se procedió a la síntesis artificial del gen que contiene 51 pb, cuya secuencia en la banda codificadora sería:

T A C-(las 42 bases que codifican la somatostatina)-A C T A C T

la secuencia de bases en el ARNm sería

A U G-(las 42 bases de la somatostatina)-U G A U G A.

Así, este ARNm tiene un codon para la metionina (que no se emplea en la iniciación), la secuencia codificadora y 2 codones de terminación consecutivos.

Se utilizó como vector un plásmido de *E. coli* que fue reconstruido con un segmento del operón lac y que contenía la zona del promotor operador, así como un pequeño sector del extremo N-terminal de la β galactosidasa. El vector fue cortado mediante una enzima de restricción y recombinado con el ADN sintetizado.

Una vez lograda la incorporación del plásmido a la bacteria, éstas fueron colocadas en un medio de cultivo carente de glucosa al que se adicionó isopropiltiogalactósido (IPTG), un inductor gratuito del operón lac.

Cuando se produce la inducción se obtiene una proteína que contiene un segmento del extremo N-terminal de la β -galactosidasa, unido a la somatostatina mediante la metionina, y que termina gracias a la doble señal de terminación del ADN sintetizado. Esta proteína es purificada y tratada con bromuro de cianógeno, un agente que provoca la ruptura de enlaces peptídicos del lado carboxílico de la metionina, de esta forma la metionina ligante queda unida al extremo de la galactosidasa y se libera la somatostatina (Fig. 35.6).

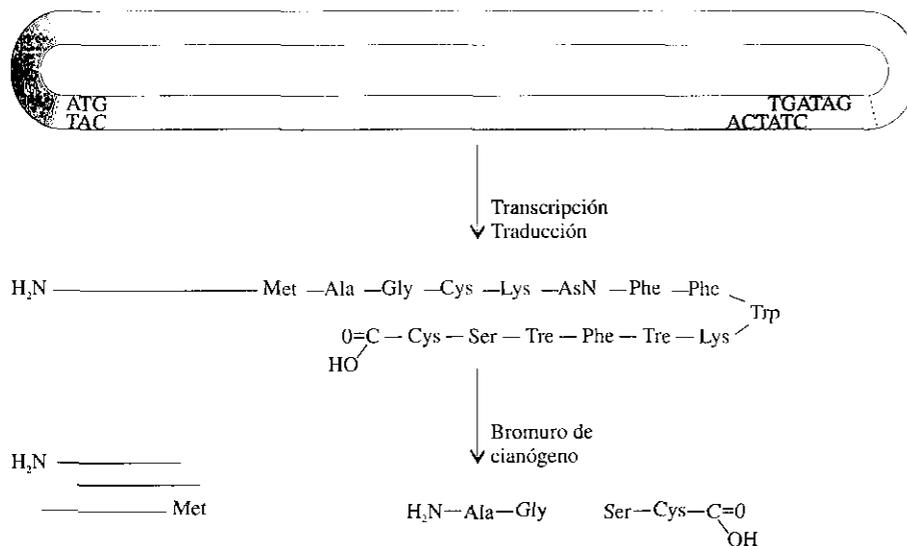


Fig. 35.6. Síntesis de la somatostatina. El plásmido fue reconstruido con el gen de la somatostatina, sintetizado artificialmente, y el promotor del operón lac. El codon para la metionina permitió que al tratar el producto con bromuro de cianógeno se liberara la somatostatina del segmento de β -galactosidasa que tenía unido.

El uso de la metionina como ligante puede ser útil en la síntesis de péptidos pequeños, a menos que la metionina forme parte de la estructura del péptido.

En la actualidad se han logrado sintetizar otras proteínas de eucariontes mediante procedimientos similares al descrito como son: la insulina, hormona pancreática de gran importancia en el tratamiento de la diabetes mellitus, la ovoalbúmina y especialmente el interferón humano, un potente agente antiviral y posiblemente antitumoral. Esta proteína es producida actualmente en nuestro país por diferentes procedimientos como ingeniería genética y fue utilizada en el tratamiento de la epidemia de dengue hemorrágico, introducida de manera criminal en Cuba y que costó la vida a más de 100 personas entre ellas a muchos niños.

En principio cualquier proteína eucarionte puede ser producida mediante esta tecnología con un sistema apropiado.

Empleo diagnóstico

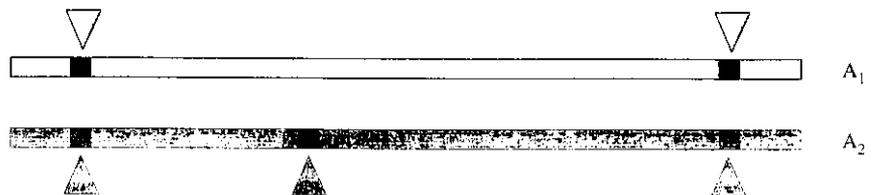
La presencia de formas alélicas de un gen en un individuo, que en algunos casos pudiera ser patológica, es detectada habitualmente por electroforesis o métodos antigénicos de las variantes de proteínas, aun cuando se sabe que ello se debe en última instancia a variaciones en la secuencia de bases del ADN en los *loci* cromosómicos correspondientes. Recientemente métodos derivados de la tecnología del ADN recombinante han permitido el análisis directo de las secuencias del gen, así como determinar sus alteraciones específicas que provocan cambios estructurales de una proteína particular. La utilidad de esta técnica es que permite la distinción entre 2 copias de un *locus* particular del genoma humano.

El método más utilizado en la práctica para el estudio de las variaciones génicas es el uso de las enzimas de restricción; como estas enzimas realizan su acción en sitios específicos del ADN, un cambio en la secuencia puede conducir a la aparición o desaparición de un sitio particular y, por lo tanto, se altera el tamaño de los fragmentos que se obtienen cuando el ADN es digerido utilizando esa enzima; lo mismo ocurre si existen deleciones o inserciones.

La diferencia en los tamaños de los fragmentos de una región determinada de cromosomas homólogos puede ser detectada, con lo que se determina la existencia de los alelos.

Suponga que un gen presenta 2 alelos A1 y A2, en el A1 existen 2 sitios reconocidos por una enzima de restricción separados por una distancia de 20 kb; pero en A2, producto de las mutaciones, ha aparecido un nuevo sitio de restricción para la misma enzima entre los 2 anteriores, de manera que la acción de la enzima dará lugar a 2 fragmentos de 8 kb y 12 kb, respectivamente (Fig. 35.7).

Fig. 35.7. Alelos que difieren en sus sitios de restricción. Los genes A1 y A2 son alelos que se diferencian porque en uno de ellos la mutación ha originado un nuevo sitio de restricción. Así, cuando el ADN es tratado con esa enzima, el alelo A1 originará un solo fragmento de restricción de 20 kb, en tanto, que A2 origina un fragmento de 8 kb y otro de 12 kb.



Si el ADN de una célula se extrae y fragmenta con la enzima de restricción, se obtendrán numerosos fragmentos que deben ser sometidos a electroforesis en gel de agarosa para separarlos de acuerdo con su tamaño.

Se prepara un polinucleótido que contenga una secuencia de bases similar a la del fragmento con tamaño de 8 kb, utilizando dNTP marcado con fósforo radiactivo, que recibe el nombre genérico de sonda.

Una vez terminada la electroforesis, la placa de agarosa se transfiere a un soporte sólido embebido en una solución que contiene la sonda y se da el tiempo suficiente para permitir la hibridación entre la sonda y el ADN fragmentado. El soporte se separa de la solución y se cubre con una placa fotográfica (autorradiografía) que, al ser revelada, muestra la posición de los fragmentos de interés. Como la sonda sólo puede hibridarse en la zona del fragmento de 8 kb, aparecerá unida tanto al alelo A1 como al fragmento pequeño del alelo A2, que por ser de diferentes tamaños aparecen en sitios diferentes en la autorradiografía (Fig. 35.8).

Si una familia es portadora de una enfermedad genética producida por genes de este tipo, puede hacerse el diagnóstico prenatal mediante la obtención de células del líquido amniótico y procesándolas de esta manera. En nuestro país ha sido introducido, hace algunos años, un procedimiento similar para el diagnóstico prenatal de la sicklemlia. Procedimientos de este tipo pueden ser utilizados en los departamentos de

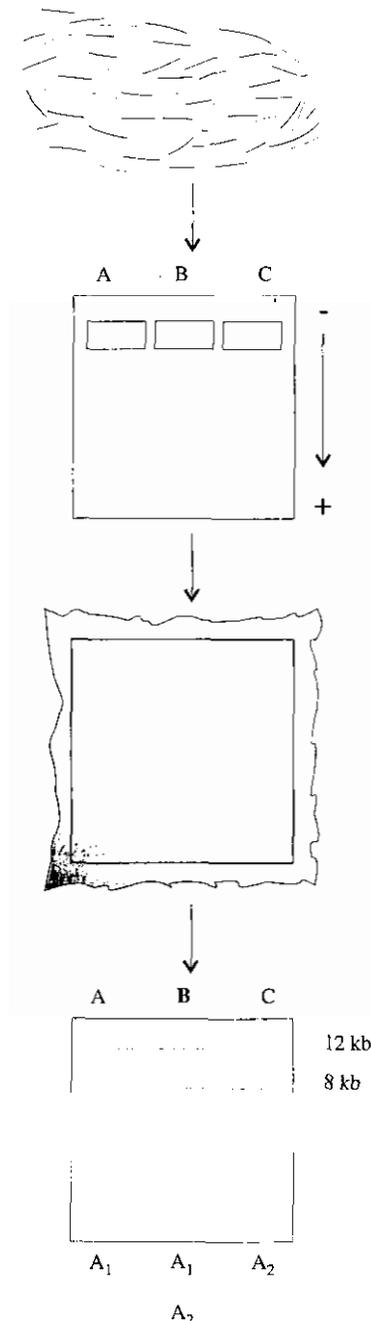


Fig. 35.8. Identificación de fragmentos de restricción. El ADN genómico de 3 individuos es fragmentado mediante una enzima de restricción. Los fragmentos se someten a una electroforesis en gel de agarosa que los separa de acuerdo con su longitud. Se transfieren a un soporte sólido y se embeben en una solución que contiene la sonda radiactiva durante el tiempo necesario para permitir la hibridación; después se somete a un proceso de autorradiografía que revela la posición de las zonas híbridas. Como se observa en los resultados, el sujeto A es homocigótico para el alelo A₁ (de 20 kb), el sujeto C es homocigótico para el alelo A₂ y el B es heterocigótico, pues presenta tanto el alelo A₁ de 20 kb como el A₂ que origina el fragmento de 8 kb.

trasplante de órganos para realizar una caracterización más profunda de la compatibilidad entre los donantes y los receptores. También este procedimiento puede ser utilizado en medicina legal, siempre que en un hecho delictivo queden como huellas células de los delincuentes, como en el caso de homicidios, violaciones, etcétera.

Perspectivas

Muchos son los campos del quehacer humano donde la tecnología del ADN recombinante puede dar grandes resultados. La introducción de genes específicos en bacterias puede ser de gran utilidad, si estos organismos con su actividad provocan un mejoramiento del suelo, un incremento en la fijación de nitrógeno u otras

modificaciones que hagan que se obtengan cosechas más productivas, tanto cualitativa como cuantitativamente.

La producción de agentes biológicos, que ayudan al hombre a combatir las enfermedades en formas inocua y económica, es también una de las posibilidades de estas técnicas.

La producción de microorganismos, que ayudan a combatir la contaminación ambiental tanto de la atmósfera como de los mares y ríos, propiciaría que el hombre pueda vivir en un planeta con ambiente menos agresivo; ésta entre otras producciones constituyen posibilidades casi inmediatas de la tecnología del ADN recombinante.

Aun cuando en estos momentos no se vislumbra, puede, que en un futuro no lejano, esta técnica sea capaz de enfrentar el tratamiento de enfermedades hereditarias, al producir rectificaciones de los genes alterados mediante su sustitución por los normales.

Se requieren muchos años de investigación y trabajo para que la humanidad agote las posibilidades de esta nueva conquista de la ciencia.

Es lamentable que la ingeniería genética también puede ser utilizada en contra de los hombres. La creación de organismos productores de enfermedades con elevada capacidad inefectiva, contra los cuales no existen tratamiento y la contaminación del ambiente con productos residuales del metabolismo de bacterias alteradas son ejemplos menores de cómo pueden utilizarse las manipulaciones genéticas contra sus propios descubridores.

Esto no debe llevar a suspender las investigaciones en este campo, pues el empleo que se dé a sus resultados no depende de los procedimientos empleados, sino de las concepciones ético-políticas de los gobernantes de los países donde se desarrolle esta importante tecnología.

La explosión de la bomba atómica en Hiroshima y Nagasaki, con toda su secuela de muerte y destrucción que se extiende hasta nuestros días, por una parte, y las grandes centrales átomo eléctricas que existen en numerosos países que han llevado la comodidad y el desarrollo a grandes núcleos de población, por otra, ejemplifican de forma clara que el peligro no está en las fuerzas de la naturaleza que el hombre descubre, sino en el empleo que el propio hombre hace de ellas.

En todo caso nuestra posición, desde el punto de vista ético, lleva a condenar el uso de estas -y de cualquier otra- conquistas de la ciencia como instrumento para provocar la destrucción de la humanidad, en vez de hacerlo para su bienestar y desarrollo.

Resumen

Uno de los éxitos más sobresalientes de la genética molecular ha sido la introducción de la tecnología del ADN recombinante, que ha permitido obtener proteínas eucariontes en cantidades antes insospechadas y al mismo tiempo un análisis del gen al nivel molecular.

El procedimiento general consiste en la obtención de un gen particular, su incorporación a un vector y su propagación. Los genes pueden obtenerse por fragmentación del ADN, por aislamiento del ARNm y síntesis del gen por la transcriptasa inversa o por síntesis artificial del gen. Los vectores más empleados son los plásmidos, los virus y los cromosomas artificiales de levadura. La unión del gen al vector puede ocurrir de 2 formas, según el tipo de enzima de restricción empleada en el proceso. Cuando la enzima no da fragmentos monofibrilares se requiere el concurso de la nucleotidil transferasa terminal.

La producción de proteínas eucariontes en bacterias presenta varias dificultades, pero basta con obtener algunas células recombinantes que, proporcionándoles el medio adecuado, en pocas horas se tendrán tantas como se quiera.

Mediante estos procedimientos se han obtenido numerosas proteínas, entre ellas la somatostatina, la insulina y el interferón, el cual se obtiene con éxito en nuestro país desde hace algunos años.

La tecnología del ADN recombinante puede ser útil en el análisis del genoma y proporciona un procedimiento preciso para el diagnóstico prenatal de algunas enfermedades genéticas; también puede ser utilizada en los departamentos de trasplante y en medicina legal.

Amplias son las perspectivas de esta tecnología para la agricultura, el saneamiento ambiental y la medicina. No obstante, también puede ser empleada en perjuicio del hombre, dependiendo de quienes sean los que la empleen y no de los procedimientos técnicos. La humanidad debe condenar enérgicamente el empleo criminal de estos procedimientos.

Ejercicios

1. ¿Cuáles cree usted que son las características que presentan los plásmidos que les permite servir de vectores en los procedimientos del ADN recombinante?
2. Haga un diseño de un experimento para recombinar *in vitro* un gen con un plásmido, utilizando alguna de las enzimas de restricción que aparecen relacionadas en el capítulo 33.
3. ¿Cuál fue el principal inconveniente encontrado al utilizar directamente los genes eucariontes para la recombinación *in vitro*? ¿Cómo pueden eliminarse esos inconvenientes?
4. ¿Por qué no siempre se logra la expresión de los genes aún cuando han sido incorporados al vector y éste se multiplica en la célula receptora?
5. ¿Qué ventaja representa la incorporación del promotor *lac* en los vectores?
6. ¿Cómo puede la tecnología del ADN recombinante favorecer el desarrollo de un departamento de trasplante de órganos?
7. ¿El hecho de que los procedimientos del ADN recombinante puedan ser utilizados para causar daño a la humanidad, debe indicarnos que hay que concluir las investigaciones en este campo?
8. ¿Qué perspectivas representa la tecnología del ADN recombinante para los países subdesarrollados?

Resumen de la sección

Esta sección se ha dedicado al estudio de los principales aspectos relacionados con la información genética interpretándolos desde el punto de vista de la estructura, las propiedades y las funciones de las macromoléculas.

La información genética es una de las formas de expresión de la información molecular que puede ser de tipo secuencial y conformacional; por lo que no se trata de un nuevo tipo de información, que distinguirla cualitativamente sólo pretende realzar su significado para la vida de las células. No obstante las diversidades de procesos y mecanismos, se pueden encontrar algunas generalidades que a manera de resumen general se exponen a continuación.

Toda la información genética que determina la identidad de cada organismo está codificada en la secuencia de bases nitrogenadas del ADN y por lo tanto es esencialmente de tipo secuencial. Pero el ADN contiene además en su estructura las instrucciones para su lectura, dadas por las irregularidades estructurales que surgen a lo largo de la molécula, de acuerdo con la secuencia de bases en sectores específicos. Todo el proceso de surgimiento y transformación de los seres vivos durante el período evolutivo alcanzan su última expresión en la lucha entre la estabilidad y la mutabilidad de esa secuencia de bases.

Conservar la información genética de un organismo y garantizar que éste origine siempre descendientes iguales a sí implica conservar inalterada la secuencia de bases de su ADN. Por el contrario, la aparición de variedades en la forma o las funciones de los organismos significa la alteración de la secuencia de bases de su ADN con respecto a la de sus progenitores. La existencia de secuencias no codificantes, de genes repetidos y los mecanismos de modificación-restricción por una parte y el complejo mecanismo de replicación del ADN, que implica una elevada fidelidad de copia, así como los de reparación aseguran a la estabilidad del material genético; mientras que las mutaciones y la recombinación genética contribuyen a la mutabilidad del mismo. Es evidente que aquí sólo se hace referencia a lo que sucede en el organismo, pues las condiciones del medio influirán decisivamente en determinar cuáles serán los organismos que permanecerán y cuáles no. De esta forma a la lucha entre la estabilidad y la mutabilidad del material genético se suma la lucha permanente entre el genoma y el ambiente; ambas han contribuido de forma decisiva al desarrollo histórico natural de los seres vivos, desde las formas más simples hasta las más complejas.

A pesar de las diferencias evidentes que existen entre todos los procesos de transferencia de información genética, hay en ellos una uniformidad fundamental. El mecanismo básico que se pone en juego en los diferentes fenómenos relacionados con la

información genética es el apareamiento de bases que es muy estricto en el ADN y menos en el ARN. Este mecanismo es el que sirve de base a la replicación, la transcripción, la recombinación y la reparación, también está presente en la traducción, pues la colocación de los aminoácidos en la cadena polipeptídica depende del apareamiento de bases entre el codon y el anticodon. Es por ello que en todos estos procesos siempre se utiliza una secuencia de bases que dirige el orden en que los diferentes componentes deben ser organizados.

La parte activa de todos los mecanismos la representan proteínas, un grupo de éstas tiene la característica de reconocer secuencia de bases específicas y proceder de acuerdo con ellas. El origen de replicación, el promotor, el operador, el terminador, las secuencias iniciales y finales de los intrones son algunos de estos ejemplos donde secuencias específicas de bases son reconocidas por proteínas específicas y ese reconocimiento es indispensable para su actividad. Otras tienen actividades enzimáticas especiales que se ajustan perfectamente a las características estructurales de los ácidos nucleicos y que no son posible encontrar en enzimas que actúen con otros sustratos. En casi todos los casos estas proteínas se asocian formando grandes complejos multiproteínicos que por sus diferentes actividades y su organización supramacromolecular constituyen verdaderos organitos subcelulares.

Por la importancia que tienen para la vida y por su elevado grado de complejidad, todos estos procesos necesariamente tienen que estar sometidos a finos mecanismos de regulación que permitan que ellos se realicen en el momento y en el lugar adecuados; este control se ejerce a varios niveles y responde a numerosas señales que forman vías de transferencia de información que van desde el entorno hasta el núcleo celular. Por los conocimientos actuales se sabe que esas vías forman verdaderas redes que convergen o divergen de nudos de acumulación de información y que muchas veces tienen carácter redundante. En estos momentos los mecanismos mejor conocidos son los de control transcripcional.

A pesar del avance alcanzado en los últimos años, el conocimiento actual que se tiene de estos fenómenos no permite arribar a otras conclusiones, pues en todos los mecanismos quedan aún aspectos importantes por dilucidar, sobre todo en lo referente a las propiedades de las proteínas que participan en ellos y a sus mecanismos de regulación.

Se espera que con la introducción de los procedimientos de la tecnología del ADN recombinante en los próximos años, muchos de estos aspectos queden esclarecidos, aunque de seguro el carácter inagotable del conocimiento de la naturaleza planteará problemas que hoy son totalmente desconocidos.