

Tema 64. La genética molecular. La ingeniería genética y sus aplicaciones. Su dimensión ética.

4º E.S.O. Genética y Evolución.

2º Bach. Bloque 3. La base química de la herencia. Bloque 6. Microbiología y biotecnología.

64.1. La genética molecular

64.1.1. Breve reseña histórica sobre los mecanismos de la duplicación del ADN

64.1.2. La regulación del mensaje genético. El modelo Operón

64.1.3. El ADN de los eucariontes

64.1.4. El control de la expresión génica en eucariontes

64.2. La ingeniería genética y sus aplicaciones. (Consultar en el Tema 46, el apartado 46.5)

64.2.1. Clonación del ADN

64.2.2. Sondeo de un gen específico.

64.2.3. Vectores eucarióticos.

64.2.4. Expresión del ADN foráneo en células eucariotas.

64.2.5. La técnica de la clonación aplicada a mamíferos

64.2.6. Fusión de células

64.3. Ingeniería microbiológica

64.4. Aplicaciones de la ingeniería genética

64.4.1. En Sanidad. Obtención de medicamentos

64.4.2. Producción de etanol

64.4.3. Aplicaciones agroalimentarias

64.4.4. Aplicaciones en la minería e industria (descontaminación)

64.4.5. Genética forense

64.4.6. El proyecto Genoma

64.5. Dimensión ética de la ingeniería genética.

64.5.1. Ingeniería genética y armas biológicas

64.5.2. Ingeniería genética humana

64.5.3. Ingeniería genética y economía

64.5.4. Opinión de los españoles sobre la ingeniería genética.

64.1. La genética molecular

Como es sabido los ácidos nucleicos son los portadores de toda la información biológica, es decir, de cómo son y de cómo serán las características morfológicas y fisiológicas del ser vivo, también a nivel celular y molecular. Esta información se transmite de generación en generación a través del ADN (algunos virus utilizan ARN), por lo que éste es el portador del mensaje genético.

Es evidente que el estudio de estas biomoléculas y su comportamiento, ha constituido y constituye una de las vías de investigación más importante dentro de la Biología. Nosotros haremos, en este apartado, un resumen de los hitos fundamentales en esta vía de investigación, renunciando a profundizar en cuestiones como la duplicación de ADN, la transcripción y la traducción (biosíntesis de proteínas) por considerar que su estudio corresponde a los temas 24 y 25 del presente temario.

La presencia del ADN en el núcleo y en los cromosomas dio lugar a las sospechas de que la información genética estaba en esa molécula o en las proteínas que también había en los cromosomas. Dado que las proteínas eran siempre las mismas en las distintas especies, se suponía que el ADN era el portador del mensaje genético. Otros aspectos que hicieron sospechar lo mismo fueron:

- La cantidad de ADN en las células de individuos de la misma especie es constante.
- Aunque con alguna excepción, cuánto más compleja es una especie, mayor cantidad de ADN contiene.
- La luz UV de 260 nm, que es la más absorbida por el ADN, es igualmente la que provoca más mutaciones.

La prueba definitiva la aportaron Avery, McLeod y McCarty en 1944, al investigar las transformaciones bacterianas que fueron observadas por Griffith en 1928 (un neumococo denominado *Diplococcus pneumoniae*). Demostraron experimentalmente que sólo los extractos de bacterias S muertas que contenían ADN eran capaces de infectar; luego **el ADN era la molécula portadora de la información biológica** ya que, a 65 °C, los enzimas se desnaturalizan.

64.1.1. Breve reseña histórica sobre los mecanismos de la duplicación del ADN

La estructura propuesta por **Watson y Crick** para el ADN bacteriano sugiere de inmediato un modelo de replicación en el que cada cadena sirve de "molde" para la síntesis de una cadena complementaria (**replicación semiconservativa**). Diversas pruebas experimentales apoyan la validez de este modelo tanto para el cromosoma bacteriano de *E. coli* (experimento de **Meselson y Stahl, y de Cairns**) como para el de eucariontes (experimento de **Taylor**).

En 1955, **Severo Ochoa y Grumberg-Manago** aislaron la enzima "polinucleótido fosforilasa", capaz de sintetizar ARNm sin necesidad de modelo y a partir de cualquier tipo de nucleótidos que hubiera en el medio.

El mecanismo de cómo a partir de una hebra de ADN se iba sintetizando sobre ella la nueva hebra complementaria y qué enzima regulaba este proceso fue estudiado por **Kornberg** (1956), discípulo de Severo Ochoa. Aisló la **ADN-polimerasa** y procedió a sintetizar ADN "in vitro" a partir de dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Mg^{2+} y un ADN que sirve de cebador. Así concluyó que la síntesis sólo tiene lugar en dirección 5'→3', es decir, unían los nuevos nucleótidos sólo al extremo 3' del ADN ya formado (la nueva hebra era antiparalela y complementaria).

En 1961, **Nirenberg** usando aminoácidos marcados con C^{14} , Leder y Khorama, acabaron por deducir la **clave genética** y confirmaron que la colinearidad (Crick 1953) debía establecerse entre los tripletes de nucleótidos y los aminoácidos.

Cairns (1963) observó la duplicación del ADN de *E. coli* en un medio con timina marcada con tritio (H^3). Ratificó la teoría semiconservativa y descubrió la existencia de un punto concreto como origen de la

replicación del ADN bacteriano y, erróneamente, se dedujo que la duplicación era bidireccional con lo que, en contra de lo que Kornberg dedujo, la ADN-polimerasa también debería copiar en dirección 3'→5', lo cual era imposible.

La solución al dilema fue el descubrimiento de los fragmentos de **Okazaki** (1968). Se trata de unos fragmentos constituidos por unos 50 nucleótidos de ARN y unos 1000 ó 2000 nucleótidos de ADN. Estos fragmentos se sintetizan por la ARN-polimerasa y por la ADN-polimerasa en dirección 5' → 3' sobre diferentes regiones de la hebra patrón (crecimiento discontinuo), pudiendo dar la sensación de que la nueva hebra de ADN crece en dirección 3'→ 5', al igual que, en la puerta de un cine, la acumulación de personas caminando hacia adelante en fila india forman una cola que crece hacia atrás.

64.1.2. La regulación del mensaje genético. El modelo Operón

Las células no están sintetizando constantemente todos los tipos de proteínas sobre los cuales tienen información. Si así fuera, se produciría un caos metabólico. Es evidente, pues, que debe existir un sistema de regulación. Como la cantidad de proteínas sintetizadas depende directamente de la cantidad de ARNm presente en el citoplasma, y como la vida media de éste es muy corta (minutos), la cantidad de ARNm sintetizado regula los niveles enzimáticos del medio. Es, pues, suficiente regular la síntesis de ARNm.

Esto depende, en los procariontes, del sustrato disponible y en las células eucariotas de los organismos pluricelulares, del ambiente hormonal del medio interno. Fue en bacterias donde se descubrió el modelo de control negativo o del operón y del control positivo o por AMP-cíclico (AMPC).

El modelo operón.

El descubrimiento de cómo se controla la síntesis de ARNm se inició a partir del llamado "efecto glucosa" observado por J. Monod (1947). Si a un medio de cultivo bacteriano con *E. coli* y lactosa se añade glucosa, el nivel de la enzima β-galactosidasa disminuye sensiblemente (de 5000 a 5 moléculas por célula).

Esta disminución es lógica, puesto que para conseguir glucosa no hace falta desdoblar la lactosa (proceso catalizado por la β-galactosidasa). Las enzimas sólo aparecen cuando se necesitan, degradándose después.

Posteriormente (años 50), Jacob y Monod, trabajando con *E. coli*, descubrieron que, en experimento anterior, eran tres los enzimas que intervenían: la β-galactosidasa, la β-galactósido permeasa y la β-galactósido transacetilasa. De este hecho se concluye que el sustrato (glucosa) no sólo reprimía una enzima, sino todo el conjunto de enzimas que intervienen en una misma vía metabólica.

En 1961, Jacob y Monod propusieron un modelo denominado operón que explica cómo se efectúa el control de la biosíntesis proteica. En este modelo se diferencian dos tipos de genes: los estructurales y los reguladores. Los **estructurales** son los que codifican las proteínas estructurales y las enzimáticas. Los **reguladores** son los que codifican las proteínas cuya misión es controlar la actividad de los genes estructurales (**proteínas represores**).

En el operón lac de la *E. coli* hay un solo gen regulador y tres estructurales. Estos se hallan contiguos y se transcriben todos a la vez. Junto a primer gen estructural que transcribe hay dos zonas específicas: la **zona promotor**, donde se fija la ARN-polimerasa, y la **zona operador**, que es donde se fija el represor.

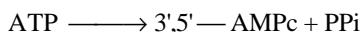


i = gen regulador del operón; P = zona promotor; O = zona operador; Z = gen estructural de la galactosidasa, Y = idem. de la permeasa; a = idem. de la transacetilasa

En el operón lac, el represor producido por el gen *i* se asocia al operador e impide que la ARN-polimerasa, que está en el promotor, transcriba los genes estructurales. Este operón funciona según la denominada **inducción enzimática**, ya que existen unas moléculas denominadas **inductores** (la lactosa en este caso), que, al asociarse a los represores, alteran su estructura. Por lo que pierden afinidad por la zona operador y la ARN-polimerasa, al no encontrar obstáculo para su actuación, transcribe los genes estructurales.

Otros operones funcionan según la denominada **represión enzimática**. Por ejemplo, el operón *his* de la *E. coli* (responsable de la síntesis de histidina). Si al medio se le añade histidina, desaparecen todas las enzimas necesarias para su síntesis. También se la llama "represión por el producto final". En ella, el represor en estado normal es inactivo; pero, si aparece otra molécula específica (correpresor), en este caso la histidina, el represor se activa y el complejo represor-correpresor se fija sobre la zona promotor y reprime la síntesis enzimática.

Control de la biosíntesis protéica por el AMP cíclico. Además del control de la biosíntesis a cargo del operón, se ha descrito este otro tipo de regulación, que está situado en la cara interna de la membrana citoplasmática. El AMPc se forma a partir del ATP por el enzima adenilato ciclasa.



El AMPc para actuar necesita el concurso de la proteína llama CAP (proteína activadora del catabolito). El complejo CAP-AMPc tiene una gran afinidad por una zona que hay en el promotor, cerca del gen *i* y a la izquierda del lugar donde se sitúa la ARN-polimerasa. Parece ser que, sin su presencia la enzima tiene grandes dificultades para asociarse a su lugar en la región promotor.

Se ha comprobado que el nivel de AMPc disminuye cuando aumenta el nivel de glucosa en la célula. Así, al aumentar la glucosa disminuye el AMPc lo que dificulta la actividad de la ARN-polimerasa y se dejan de sintetizar los enzimas necesarios para metabolizar la lactosa.

64.1.3. El ADN de los eucariontes

En los procariontes, el ADN contiene una copia de cada gen y éste está todo él seguido, es decir, sin intrones. Además, no hay apenas ADN silencioso (que no se transcribe). En los eucariontes, en cambio, la situación es totalmente al revés. A pesar de tener 1000 veces más ADN que los procariontes, sólo un 10 % de él son genes o elementos de control. Los intrones pueden aumentar incluso 10 veces la secuencia codificante. Existen especies próximas que tienen incluso seis veces más ADN que otras, y hay secuencias de nucleótidos que se encuentran varias veces repetidas. Se distinguen tres tipos de ADN:

- ADN altamente repetitivo o ADN satélite.** Supone un 10 % del total, aunque puede llegar al 50 %. Son cortas secuencias entre 10 y 20 pares de bases (pb) que se disponen en tándem y que llegan a repetirse de 10^6 a 10^8 veces. Se sitúan en las zonas de heterocromatina constitutiva (centrómero y telómero), que son zonas genéticamente inactivas (no transcriben nunca). Puede que su única función sea mecánica, como es el apareamiento y la segregación de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis.
- ADN moderadamente repetitivo.** Es el 20 % del total. Son secuencias que oscilan entre los 300 pb y los 5600 pb, existiendo varias familias de secuencias de un mismo genoma. El nº de copias oscila entre 10 a más de 1000 veces, llegando a veces a 10^5 . No ocupa unos cuantos puntos concretos en el cromosoma, sino que está intercalado en todo el genoma. Comprende los genes que codifican histonas, ARNr, ARNt y secuencias de función desconocida (familia de secuencias Alu en los humanos).
- ADN repetitivo o simple.** Es el 70 % del total. Contiene la mayor parte de la información que pasa al ARNm y da lugar a las proteínas y al ADN que está intercalado y que no se transcribe (ADN espaciador). Entre los genes se distinguen los de copia única en el genoma y los genes duplicados que pueden estar representados por varias copias. Éstas no siempre son iguales, sino que presentan pequeñas variaciones y dan lugar a proteínas más o menos aptas según sea el ambiente, el tejido que se considere, etc. En ocasiones son inservibles y no se transcriben nunca (pseudogenes).

Se ha sugerido que el origen de muchas secuencias altamente repetitivas serían virus o elementos transponibles (**transposones**)¹ que se han ido multiplicando dentro del ADN de la célula huésped, gracias a su alta capacidad de difusión y al mínimo perjuicio que producen, evitando así el efecto de la selección contra ellas (ADN egoísta).

64.1.4. El control de la expresión génica en eucariontes

Las células de los organismos eucarióticos pluricelulares con tejidos diferenciados responde sobre todo a las variaciones del medio interno. En ellos las hormonas provocan respuestas similares a las que el sustrato provoca en las bacterias. Aunque todas las células tienen el mismo ADN, no en todas se manifiesta la misma información. Por ejemplo, los genes de la hemoglobina sólo se expresan en los eritrocitos, los de la melanina en las células epidérmicas, etc. Los segmentos de ADN que se encuentran muy condensados no se expresan, mientras que los que están extendidos, incluso sin formar nucleosomas y facilitando la acción de la ARN-polimerasa, serán los que se transcriban. Según las zonas que queden condensadas aparece, durante el desarrollo embrionario, la diferenciación celular y con ella la organogénesis del embrión. Según el tipo de célula habrá unos receptores de membrana u otros y, por tanto, sólo serán células diana respecto a unas determinadas hormonas. El control de la expresión génica debido a la hormona difiere según se trate de hormonas lipídicas (penetran en las células y se unen a proteínas receptoras intracelulares formando el complejo HR) o protéicas (desencadenan la síntesis de AMPc).

Tanto el complejo H-R como el AMPc actúan, en el núcleo, de forma similar, ya que ponen en marcha la transcripción de determinados genes. Por ejemplo, las hormonas anabolizantes (lipídicas) desencadenan la síntesis de proteínas musculares.

A) Control genético del desarrollo

En un principio se pensó que el desarrollo podría tener lugar por medio de cambios permanentes en los cromosomas. Mediante la técnica del trasplante celular (introducir núcleos de células diferenciadas en huevos a punto de iniciar el desarrollo, previamente enucleados), demuestra que el núcleo transplantado puede llevar a cabo un desarrollo normal, lo que demuestra, a su vez, que el desarrollo no tiene lugar por una diferenciación cromosómica permanente. Es decir, el núcleo es **totipotente**: cualquier núcleo puede dar lugar a cualquier tipo de células.

Mediante diversos estudios (sapos africanos del género *Xenopus*, *Drosophila*, el nemátodo *Caenorhabditis elegans*), queda demostrado que la diferenciación celular puede y tiene lugar sin casi ningún cambio permanente en el material genético. La formación de los distintos órganos a partir de las capas embrionarias no sigue un patrón invariable (por ejemplo, se pueden formar células nerviosas a partir del mesodermo y no sólo del ectodermo). La mayoría de las veces, las células siguen un patrón relativamente fijo durante su desarrollo, aunque algunas células pueden responder a cambios en su ambiente alterando su destino en el desarrollo. Las células de eucariotas superiores pueden tener más flexibilidad a la hora de determinar su destino.

Se extiende cada vez más la idea de que uno o pocos genes controlen la expresión de otros muchos genes durante el desarrollo embrionario. Son **los genes homeóticos**, cuya mutación haría que un tipo celular siguiera un patrón de desarrollo característico de otros tipos celulares. Se han encontrado la caja homeótica² en genes de plantas, levaduras, erizos de mar, ranas y seres humanos. El alto grado de conservación de esta secuencia, entre organismos muy distintos, sugiere que esta secuencia es esencial para el funcionamiento de los genes homeóticos y que el mecanismo surgió tempranamente en la evolución.

B) Control genético de la transcripción

¹ regiones del genoma que se pueden desplazar de un sitio a otro. En algunos casos los elementos transponibles se mueven, en otros se inserta una copia en un lugar nuevo mientras que en el original se mantiene en el lugar de inserción original

² La misma secuencia, de unos 180 pares de bases, en distintos genes homeóticos.

Se cree que la expresión génica en eucariotas está controlada probablemente a nivel de la transcripción, como en procariotas y bacteriófagos. La metilación, por ejemplo, se cree que puede ser uno de los mecanismos que afectan al control de la transcripción. Hay evidencias, no obstante, de que la metilación puede no ser la única base de control de la expresión génica en eucariotas.

Si una secuencia concreta de ADN está metilada puede presentar protección contra las endonucleasas de restricción (ver página siguiente, 64.2.1. Clonación del ADN). En la mayoría de los organismos eucariotas un pequeño porcentaje de los residuos citosina están metilados, principalmente en secuencias de CG.

El grado de metilación del ADN está relacionado con su estado respecto a la transcripción. Genes que están inactivados en un tipo celular pero activados en otro, o genes que están inactivados en una etapa del desarrollo pero activados en otra, normalmente están menos metilados cuando están activados y totalmente metilados cuando están inactivados. Productos que impiden la metilación con frecuencia activan genes que se encontraban inactivados. Se puede demostrar que los genes activados no tienen metiladas las citosinas que habían estado previamente metiladas.

El descubrimiento del ADN Z (Ver tema 25, página 4) ha generado, recientemente, un mayor interés por el papel de la metilación en el control de la expresión génica ya que el ADN Z se puede estabilizar por metilación. Esta observación ha dado lugar a un modelo de regulación de transcripción basado en las estructuras alternativas del ADN. Existen secuencias (como las repeticiones CG) que podrían tener forma de ADN Z pero que se presentan como ADN B cuando se están transcribiendo. Si se ha de reprimir un gen, las secuencias CG se convierten en ADN Z estable, por metilación, y entonces se bloquea la transcripción.

También se ha sugerido que la metilación podría controlar la formación de nucleosomas. Se podría prevenir la formación de nucleosomas en las regiones que van a ser transcritas y quizás este control se ejerza a través de la metilación.

Hay algunas evidencias del control de la expresión génica en eucariotas mediante **transposones**. Aunque parece que tiene un efecto disruptivo y aleatorio en los procesos de desarrollo.

Las inmunoglobulinas (ver tema 62, página 8) no están formadas por genes individuales sino por trozos recombinados de distintos genes. El genoma humano puede formar hasta 10^8 anticuerpos distintos. Los receptores de los linfocitos T y los productos del complejo principal de histocompatibilidad son otros componentes genéticos variables del sistema inmune humano.

64.2. La ingeniería genética y sus aplicaciones. (Consultar en el Tema 46, el apartado 46.5)

Hasta el presente, para mejorar la utilización de las células vivas en investigaciones o en la industria los investigadores debían contentarse con seleccionar las mejores especies y las mejores variedades. Hoy es posible la fabricación a voluntad de células adaptadas a los deseos del hombre.

La biotecnología utiliza un conjunto de técnicas que resultan, bien de la modernización de las tecnologías clásicas, como la fermentación y la ingeniería enzimática, bien de innovaciones tecnológicas recientes, como la ingeniería genética y la fusión de células en cultivos "in vitro".

En esta actividad intervienen cuatro competencias: procesos de fermentación, enzimología e ingeniería enzimática, ingeniería genética y fusión celular.

Por su parte, los aspectos económicos implicados son múltiples: sanidad e industria farmacéutica, industria agrícola, agroalimentaria, utilización de biomasa para la obtención de energía, agronomía, depuración y protección del medio ambiente, extracción minera, etc. La atención de los científicos, industriales y del capital se inclina, fundamentalmente, por tres sectores: sanidad, producción de carburantes y la industria agroalimentaria.

Desde mediados de los años 70, el campo de la genética molecular ha experimentado un gran crecimiento, no solo para los genéticos sino también para médicos, agrónomos, zoólogos, inversores y público en general. Desde el punto de vista de los médicos clínicos e investigadores, se han puesto a su disposición nuevos métodos para el tratamiento de enfermedades. Los agrónomos ven la posibilidad de aumentar el rendimiento de los cultivos, y los zootécnicos de hacer lo mismo con la producción de alimentos a partir de animales domésticos.

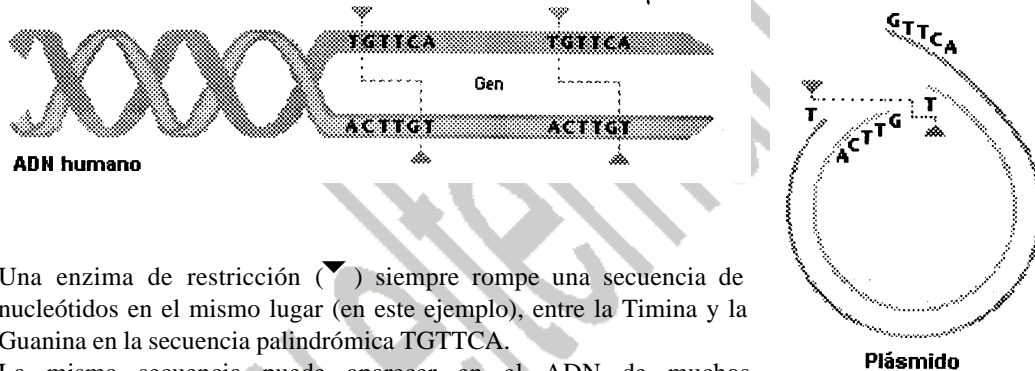
Las nuevas técnicas de manipulación del ADN, centradas en el aislamiento, amplificación, secuenciación y expresión de genes están basadas en la inserción de un determinado fragmento de ADN en un vector (plásmido o fago). Un plásmido se introduce en una célula huésped, procariótica o eucariótica, la cual se reproduce (produciendo un clon) y el vector con su fragmento de ADN foráneo también se replica. Un fago simplemente se multiplica en las células huésped. En ambos casos el gen foráneo resulta amplificado en número. Puede ser también expresado (transcrito y traducido a proteína) cuando está en un plásmido que se ha introducido en una célula huésped (se usa mucho como célula huésped la *E. Coli*). Después de su amplificación, se puede purificar el ADN foráneo y determinar su secuencia de nucleótidos. Cuando se expresa, se pueden obtener grandes cantidades de su producto génico.

La nueva tecnología se conoce con diversos nombres como **clonación génica**, **tecnología del ADN recombinante** o **ingeniería genética**.

La **ingeniería genética**, por tanto, consiste en modificar el patrimonio hereditario de un organismo introduciendo en su haber genético uno o varios genes pertenecientes a un organismo de una especie distinta. El proceso se puede utilizar tanto con bacterias como con células animales o vegetales.

64.2.1. Clonación del ADN

En 1978 se concedió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina a Arber, Smith y Nathans) por su trabajo pionero en el estudio de las **endonucleasas de restricción (enzimas de restricción)**. Se trata de enzimas que emplean las bacterias para destruir el ADN foráneo, generalmente de virus. Estos enzimas reconocen ciertas secuencias de nucleótidos que se encuentran en el ADN foráneo, generalmente entre 4 y 10 pb, y cortan el ADN en todos los puntos que contengan esta secuencia específica.



Una enzima de restricción (▼) siempre rompe una secuencia de nucleótidos en el mismo lugar (en este ejemplo), entre la Timina y la Guanina en la secuencia palindrómica TGTTC A.

La misma secuencia puede aparecer en el ADN de muchos organismos, o muchas veces en una cadena de ADN.

Un plásmido es una molécula circular adicional de ADN que se encuentra casi en todos los tipos de bacterias (ver tema 32)

Aunque se conocen tres tipos de endonucleasas de restricción (I, II y III), sólo es útil para la clonación de genes la II (reconoce puntos específicos³ y corta por esos puntos). La célula huésped protege su propio ADN del ataque de sus propias endonucleasas metilando esas regiones.

Una molécula de ADN circular cortada por un enzima de restricción específico se puede recircularizar si es cortada por un solo lugar o dos moléculas diferentes con los mismos extremos libres se pueden reasociar para formar moléculas híbridas. Sólo se necesita la acción de una ligasa para producir moléculas completas. Hoy es factible unir, in vitro, segmentos de ADN de distinta procedencia. Se usa la misma endonucleasa de restricción para cortar los ADN de un plásmido y de otro foráneo. En algunos casos los extremos

³ los sitios reconocidos son repeticiones invertidas (tienen un eje de simetría) por ejemplo, un tipo de endonucleasa reconoce la secuencia.

5' - GGA TCC-3' Al leer a partir del centro encontramos AGG en las dos cadenas. La secuencia, en
3' - CCT AGG-5' cierto sentido es un palíndromo (se lee igual en cualquier dirección).

cortados se unirán para formar un plásmido con fragmento de ADN foráneo. La ligasa sella la “mella”. El **plásmido híbrido** puede ser transferido a una célula.

Para que la clonación sea eficaz:

- El sitio de corte del plásmido no debe estar en una región esencial, si no el plásmido quedará inutilizado en el proceso.
- El ADN foráneo que se va a fusionar con el plásmido vector debe ser una unidad funcional (un gen completo o una región de interés intacta).
- La endonucleasa debe cortar el plásmido sólo por un punto. De no ser así quedaría fragmentado.

Una desventaja de la clonación con plásmidos normales de E. Coli es que son inestables si el ADN foráneo es muy largo (más de 15 kb), ya que el plásmido tiende a perder selectivamente partes del clon conforme se replica. Por esa razón los genéticos empezaron a usar el fago λ como vector (pueden mantener hasta 24 kb de ADN foráneo).

Este procedimiento de clonación puede dar tres tipos de productos: vectores con ADN foráneo apropiado; vectores con ADN foráneo no apropiado, y “basura” que incluye a vectores no cortados y fragmentos de vectores. Distintos métodos permiten seleccionar adecuadamente los vectores híbridos.

Con el fin de clonar un determinado gen (o segmento de ADN) el científico debe disponer de un fragmento de ADN bicatenario que contenga este gen. Hay muchas maneras de obtener este ADN, pero la mayoría suponen la formación o el aislamiento de un ARNm monocatenario que, por retrotranscripción (mediante la transcriptasa inversa), se convierte en un ADN bicatenario. El problema se reduce a la obtención del ARNm.

- Se puede aislar directamente, si la célula lo produce en grandes cantidades. Ej. Los eritrocitos de mamífero contienen mucho ARNm para la síntesis de la α y β -globulinas. También el ARN ribosómico y el ARNr son fáciles de aislar.

El ADN monocatenario resultante de la retrotranscripción se le conoce como ADNc (complementario). Por medio de la ADN polimerasa I, usando el ADNc como molde se forma el ADN bicatenario.

- Si no hay ARN disponible en cantidades suficientes, es posible sintetizar ADN directamente in vitro si se conoce la secuencia de aminoácidos de la proteína que codifica. La secuencia de nucleótidos se puede deducir de la secuencia de aa de la proteína utilizando el código genético. El ADN resultante omitirá el promotor del gen y las secuencias de regulación transcripcional así como otras zonas de ADN no traducidas. Hay técnicas que permiten añadir un promotor sintético y otras que permiten la clonación de fragmentos aleatorios de genoma.

Esta técnica se está experimentando en California. Utiliza un aparato llamado secuenciador que analiza los aminoácidos que componen las proteínas, después reconstruye el ARNm que origina su síntesis. Sólo queda fabricar una sonda en ARNm que permita localizar el ADN del gen implicado en la síntesis de la proteína descifrada.

64.2.2. Sondeo de un gen específico.

De todas las operaciones citadas, la única que ofrece dificultades es la de fabricación de las sondas destinadas a la búsqueda de los genes. Cuando el gen es conocido, es decir, cuando ha sido definido el orden en el que se suceden las bases que lo componen, la fabricación de la sonda no plantea problemas. Por el contrario, si el gen buscado aún no ha sido descifrado (lo que suele ocurrir en la mayoría de los casos), no es posible confeccionar una sonda, puesto que no se conoce ni el número ni, sobre todo, el orden de emplazamiento de las bases que lo constituyen.

Cuando se producen fragmentos de ADN al azar por endonucleasas o por cizallamiento físico, se debe localizar un gen específico. El gen podemos tratar de localizarlo antes o después de clonarlo.

A) Localización del gen antes de la clonación:

Es necesaria la producción de una sonda específica (ácidos nucleicos marcados radiactivamente cuya complementariedad localiza con precisión una determinada secuencia de nucleótidos en el ADN). Por lo tanto, si deseamos localizar el gen de la β -globina, deberemos proceder como sigue:

- Digerir el ADN con enzimas de restricción. Después se separan los distintos fragmentos de ADN obtenidos por electroforesis en gel de agarosa. Se desnaturaliza el ADN en cadenas sencillas y se transfiere a filtros de nitrocelulosa (transferencia de Southern). Con ARN se puede llevar a cabo una técnica similar (transferencia de Northern)
- Usar ARNm de la β -globina marcado radiactivamente o ADNc marcado radiactivamente. Se formarán híbridos de ARN-ADN o de ADN-ADN entre la cadena sencilla de ADN y la sonda radiactiva. La autorradiografía localizará entonces la sonda.

B) Localización de genes clonados:

Los métodos descritos son también útiles en la localización de genes que ya han sido clonados en plásmidos. Por ejemplo, en un determinado experimento, se cultivaron células de levadura en un medio con ^{32}P E. coli, para producir ARNt radiactivo (la sonda) que fue después aislado. Se hibridó un ADN plasmídico en E. coli con la sonda. La autorradiografía indicaba clones que llevaban genes del ARNt de la levadura. Esta técnica, hibridación de ADN clonado sin separación electroforética, se llama **punteado**.

Si se clona un gen eucariótico en un plásmido de E. coli, este gen puede expresarse y traducir una determinada proteína. Se puede localizar la proteína mediante un método análogo al de la transferencia de Southern antes citada o al punteado.

Hay otro campo en el que los investigadores de Instituto Tecnológico de California están trabajando, el de la síntesis de los genes. Se trata de reconstruir y ensamblar los nucleótidos que los componen. Tal procedimiento tiene la ventaja, frente al del clonaje, que permite modificar la disposición de las bases y con ello mejorar los rendimientos del gen o bien conferirle nuevas posibilidades.

En la mayoría de los casos se utiliza la bacteria Escherichia coli; los genes introducidos en su patrimonio hereditario gobiernan la síntesis de proteínas "útiles" para la industria o suponen un avance para la investigación médica o biológica. Para aumentar el rendimiento de la síntesis de proteína deseada se utiliza la técnica denominada de amplificación del gen, que permite obtener de una sola célula hasta tres mil copias del plásmido modificado (La técnica se llama PCR o reacción en cadena de la polimerasa, que permite duplicar repetidamente fragmentos de ADN). La proteína segregada se extrae, concentra y purifica por vía química a medida que se produce.

64.2.3. Vectores eucarióticos.

Lo hasta aquí descrito, relativo a la ingeniería genética, implica la producción de plásmidos en bacterias, principalmente E. coli. Sin embargo, éstas son incapaces de expresar completamente algunos genes eucarióticos por carecer de los correspondientes sistemas enzimáticos precisos. Por otro lado tiene un indudable interés: estudiar la organización y la expresión del genoma eucariótico in vivo, y aprender cómo manipular genomas de eucariotas por razones médicas y económicas.

Los estudios de ADN recombinante en levaduras (con plásmidos específicos producidos al efecto) han aumentado nuestro conocimiento sobre la regulación génica en eucariotas, de la forma de funcionar el centrómero y la manera como se replican los extremos de los cromosomas lineales eucarióticos (ver tema 25, página 5), y conocer largas secuencias de ADN eucariótico.

El vector más usado en animales superiores es el virus tumoral SV40, reemplazando su ADN por ADN foráneo. Así pueden replicarse y completar su ciclo biológico con la ayuda de virus no recombinantes, o pueden replicarse en el huésped sin producir partículas víricas activas, permaneciendo como plásmidos circulares en el citoplasma o integrándose en el cromosoma del huésped (así se fue clonado el gen de la β -globina de conejo). Gran parte de los nuevos conocimientos sobre la transformación (oncogénesis) se han obtenido usando virus tumorales como vectores.

El sistema de introducción de genes foráneos en plantas dicotiledóneas mejor estudiado es el sistema natural del tumor de la agalla producido por la bacteria Agrobacterium tumefaciens. El gen que confiere el carácter tumoral es portado por un plásmido de la bacteria (plásmido Ti). Este gen se inserta en la planta infectada por lo que es posible prever la transferencia de caracteres ventajosos asociados a este gen. La

técnica del plásmido Ti, en la fase actual, sólo es de aplicación en Dicotiledóneas, ya que la bacteria no infecta a las Monocotiledóneas (cereales).

Las agallas están formadas por células de la planta transformadas por el plásmido Ti (inductor de tumores). La transformación tiene lugar cuando el ADN transferido del plásmido se integra en el cromosoma de la célula huésped. Las células de las agallas producen unos derivados de aa llamados opinas.

En 1988 se confirmó la resistencia frente a la infección del virus del mosaico del tabaco (VMT) en unas plantas de tomate a base de introducir el gen de la proteína de la cubierta del VMT en la planta mediante el sistema *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido Ti. Las plantas que expresan el gen de la proteína de la cubierta son resistentes al ataque por el virus.

Recientemente, se ha fijado mucho la atención en la mala hierba de los prados, *Arabidopsis thaliana*, ya que posee un genoma pequeño (10^8 pb), repartidos en sólo cinco cromosomas ($2n = 10$). Este organismo se puede comparar a la mosca de la fruta y la levadura como organismos para el estudio de cuestiones de regulación génica en eucariotas, vegetales en este caso.

64.2.4. Expresión del ADN foráneo en células eucariotas.

Se puede introducir ADN foráneo en células eucarióticas mediante métodos similares a la transformación bacteriana (se suele llamar **Transfección** porque el término transformación en eucariotas significa crecimiento canceroso). Un organismo eucariótico que tome ADN foráneo se conoce con el nombre de **transgénico**.

En el caso de las células animales o vegetales, la recombinación genética se efectúa inyectando directamente en el núcleo, mediante una micropipeta, un fragmento de un cromosoma que se integra eventualmente en el haber genético de la célula huésped.

Por ejemplo, los ratones transgénicos se consiguen a partir de oocitos de una hembra de ratón después de un tratamiento hormonal apropiado; se les inyecta ADN clonado y se reimplantan las células en hembras receptoras.

Los animales transgénicos son útiles tanto para el estudio de la expresión y de la regulación de genes eucarióticos foráneos como también por sí mismos como receptores de terapia y de manipulación. En 1988 se patentó el primer animal modificado por ingeniería genética (un ratón transgénico propenso al cáncer).

La transfección también se puede llevar a cabo mediante retrovirus (virus con ARN y transcriptasa inversa). Por ejemplo con virus responsable una forma de leucemia de roedores. El virus fue manipulado eliminándole todos sus genes y se reemplazaron por otros adecuados. El virus se une a la superficie celular y pasa al interior de la célula, su ARN es convertido en ADN por la transcriptasa inversa y se incorpora a uno de los cromosomas de la célula. Este virus tan modificado no puede atacar y dañar las células mientras no se añada un virus auxiliar.

Hay otras técnicas recientes para la introducción de ADN recombinante:

- Electroporación. La célula toma el ADN exógeno al someterla brevemente a electricidad de alto voltaje.
- Por liposomas. El ADN foráneo es encapsulado en liposomas (vesículas con membrana artificial). Éstos llevan el ADN a la célula diana. Los éxitos son de un 50 %.
- Recientemente, se ha conseguido la transfección en mitocondrias y cloroplastos mediante la técnica llamada **biolística**. El ADN recombinante se suministra en forma de cubierta de microproyectiles de tungsteno disparados contra los orgánulos.

64.2.5. La técnica de la clonación aplicada a mamíferos

En la naturaleza existen clones, como los gemelos idénticos y las plantas que se reproducen por esquejes. Como hemos visto la clonación se ha venido aplicando, preferentemente, en la reproducción exacta de segmentos de ADN o genes mediante su inserción en microorganismos, animales y plantas. Pero también, está de actualidad, la utilización de la clonación para la obtención de individuos genéticamente idénticos a otros por técnicas de reproducción asexual en laboratorio. Durante 1997 se conmocionó el mundo de la ingeniería genética y causó un hondo impacto social, la obtención de una oveja clónica (Dolly).

Se hizo una transferencia nuclear desde una célula donante diferenciada a un ovocito no fecundado y enucleado, que luego fue implantado en una hembra portadora. Así, podemos decir, que Dolly tuvo tres madres.

- La madre genética, que estaba en el último trimestre de embarazo, aportó el núcleo de células mamarias. Estas células se cultivaron en el laboratorio. Las características del medio de cultivo permitió que los miles de células obtenidas entraran en hibernación, algo que se demostró clave para el éxito del experimento⁴.
- Una vez cultivadas las células de la oveja donante, se estimuló ováricamente a una oveja de cabeza negra y se le extrajeron los ovocitos. Se les eliminó el núcleo y se mantuvieron en hibernación en un cultivo. Los ovocitos sin núcleo (células receptoras) se pusieron en contacto con las células mamarias dentro de un aparato especial y fueron sometidas a descargas eléctricas para propiciar su fusión y el comienzo del desarrollo del embrión. La hibernación fue la que permitió, en contra de lo esperado, que se iniciara el desarrollo de un embrión normal.
- La sincronización de las fases entre las células donantes y las receptoras fue la clave del éxito. En los experimentos de enero de 1996, se obtuvieron más de 270 embriones, de los que sólo 29 se desarrollaron lo suficiente para implantarlos en el útero de 13 ovejas portadoras. Sólo nació una oveja (Dolly) el 5-6-1996.

La combinación de la clonación y la manipulación genética permitirán obtener, por ejemplo, muchas vacas idénticas que produzcan proteínas de interés farmacológico en su leche.

En 1997, en el instituto Roslin de genética molecular de Edimburgo (Escocia), se han obtenido, mediante técnicas de clonación a partir de células embrionarias, ovejas transgénicas portadoras de genes humanos. Para ello los investigadores añadieron un gen humano al núcleo de una célula de oveja., éste se fusionó con una célula embrionaria, previamente enucleada, y cada embrión engendrado fue implantado en una oveja adulta diferente.

En 1992 ya se habían obtenido ovejas transgénicas, no clónicas, portadoras de genes de otras especies (la oveja Tracy era portadora de un gen humano que permitía la producción en su leche de una proteína humana α Antitripsina 1 que sirve para tratar el edema pulmonar⁵).

Se abren nuevas posibilidades en las que será posible la obtención de vacas que produzcan mucha más leche o que produzcan otras proteínas humanas (la lactoferrina, estimulante del sistema inmunológico, seroalbúmina humana, proteína GAD que se utiliza en el tratamiento de diabéticos, etc.); cerdos transgénicos para utilizar sus órganos en transplantes humanos, etc.

El 20 octubre de 1997, en el Reino Unido, Jonathan Slack, mediante una modificación genética, obtuvo ranas sin cabeza ni cola (lo que abre la puerta a crear cuerpos humanos sin cabeza ni sistema nervioso).

64.2.6. Fusión de células

En el caso de los cultivos celulares, las técnicas que permiten **fusionar células** de especies distintas y obtener células híbridas que poseen los caracteres genéticos de las dos células madres han supuesto un paso muy importante.

Con las células animales, la técnica se utiliza para la obtención de hibridomas por fusión de células cancerosas del mieloma múltiple (de multiplicación indefinida, lo que asegura la duración del cultivo celular), y células del bazo. Las células resultantes producen anticuerpos específicos. El hibridoma se multiplica formando un **clon** (conjunto de células con idéntico acervo genético), y el anticuerpo producido recibe el nombre de "monoclonal").

Estos anticuerpos se puede aplicar en diversos aspectos de la investigación médica y del diagnóstico: preparación de vacunas, purificación de medicamentos por selección molecular, elaboración de reactivos específicos y, sobre todo, equipos de diagnóstico (enfermedad del legionario, enfermedades por micoplasmas, diagnóstico de la hepatitis B y de la rabia, test de embarazo, etc.)

Con las células vegetales también se puede obtener la fusión de celular, tras despojarlas de su pared celular. Se habla entonces de fusión de protoplastos. Las plantas regeneradas a partir de los protoplastos fusionados son frecuentemente estériles, pero se pueden reproducir por multiplicación vegetativa.

⁴ Hasta este momento se creía que sólo se podían obtener animales clónicos con células procedentes de embriones, indiferenciadas.

⁵ Producían 60 gr/litro al principio, posteriormente se pasó a unos 35 gr.

64.3. Ingeniería microbiológica

Otro sector de las biotecnologías es el de los **procesos de fermentación**, centro de las aplicaciones industriales de la microbiología y la ingeniería genética. Efectivamente, para producir sustancias útiles en la industria, los microorganismos naturales o portadores de un mensaje genético extraño se cultivan en cubas de fermentación. En los procesos clásicos, se llenan las cubas con un líquido nutritivo y la sustancia que se ha de transformar y se deja que los microorganismos actúen durante algunos días; después se vacían las cubas y los compuestos producidos se concentran y purifican.

Estos procedimientos se utilizan para la biosíntesis de antibióticos y vitaminas y para la producción industrial de enzimas usados en la industria del almidón o en la fabricación de levaduras.

Se está extendiendo la llamada **fermentación en continuo**. Consiste en introducir constantemente en la cuba un flujo de sustancias nutritivas y del sustrato que se va a transformar, y extraer de forma regular el producto de la fermentación. Estas operaciones se controlan automáticamente mediante procedimientos informáticos.

Asimismo, en la fermentación en continuo, los microorganismos o los enzimas aislados pueden estar en suspensión en el líquido, englobados en microsferas porosas (técnica del lecho fluido) o inmovilizados sobre un soporte sólido poroso, por cuyos intersticios circula el líquido.

La mejora de las condiciones con miras a incrementar el rendimiento de la fermentación, sea por inmovilización de los enzimas o las células, sea por el reciclaje de los procesos de floculación o centrifugación, constituye un foco de investigación muy activa: la **ingeniería enzimática**.

64.4. Aplicaciones de la ingeniería genética

Los sectores de aplicación son múltiples y variados. Incluye, en primer lugar, toda clase de actividades en las que intervienen procesos de fermentación: producción industrial de antibióticos por mohos y enzimas, hormonas o herbicidas por bacterias. En este marco también se incluyen los procesos de producción inducidos en el sector de la industria farmacéutica, en la industria alimentaria y en la producción de etanol. Pero también se puede prever la aplicación de estas innovaciones en la agricultura, la descontaminación por reciclado de desechos, extracción de minerales, etc.

64.4.1. En Sanidad. Obtención de medicamentos

Gracias a la ingeniería genética, y de otras técnicas, se pueden producir a escala industrial sustancias que los organismos vivos sólo sintetizan en cantidades infinitesimales, como el interferón, la hormona del crecimiento humano o ciertos anticuerpos. Pero, al mismo tiempo, la industria farmacéutica produce por fermentación un cierto número de sustancias de acción terapéutica: antibióticos (más de 4000 a a partir de *Penicillium* y de *Streptomyces*), vitaminas, hormonas y hormonas desde hace ya varios decenios. Los resultados obtenidos por cepas productoras mejoradas por selección o mutación han multiplicado el rendimiento de la producción por 1000 o por 10.000 desde que, hace medio siglo, se descubrieron los antibióticos.

Uno de los resultados iniciales más espectaculares de la ingeniería genética ha sido la síntesis del interferón, o más bien de los interferones, biosíntesis hoy ya en vías de industrialización.

Otros productos, en particular hormonas humanas, se han sintetizado por el mismo proceso: insulina, hormona del crecimiento, neuropéptidos, etc. La insulina humana es la primera hormona que se consiguió sintetizar por la *E. coli* (1978).

La insulina tiene dos cadenas de aminoácidos (el péptido A con 21 y el B con 30). Una vez aisladas, las dos secuencias de nucleótidos se introducen por separado, mediante plásmidos, en dos estirpes diferentes de bacterias, a nivel del operón lac. Éstas proporcionan en muy poco tiempo muchas bacterias portadoras de esos genes. Al añadir lactosa al medio, las bacterias empiezan a sintetizar péptidos A o B. Luego se retiran, purifican y se activan los grupos -SH para que interactúen los dos péptidos y se forme la insulina

humana madura. Como el metabolismo bacteriano es muy elevado, esta vía de obtención ha resultado rentable. Además se trata de insulina humana en lugar de la porcina empleada hasta ahora.

La hormona del crecimiento es un único polipéptido de 191 aminoácidos. También se ha introducido en bacterias gracias a un plásmido en el lugar regulado por el promotor del operón lac. Se emplea para tratar algunos casos de enanismo. Puede tener gran interés en la producción animal.

El interferón (IFN) es una proteína de peso molecular entre 16.000 y 20.000, que contiene una cadena glucosídica. Se aisló en células animales como respuesta a infecciones víricas. Esta sustancia limita e incluso anula los efectos de la infección. Su aplicación ha resultado eficaz en enfermedades víricas (resfriados, hepatitis, herpes, rabia, etc.) y, en aplicaciones prolongadas, disminuye los efectos del cáncer.

Se conocen tres tipos de interferones, según el tipo de células a partir de las cuales se extrae. En la actualidad se ha conseguido aislar el ADN responsable del interferón en leucocitos y fibroblastos infectados. Este ADN se ha introducido en colibacilos y, aunque la tasa de obtención es muy baja debido a la inestabilidad de esta molécula, se espera que en el futuro se mejorará el rendimiento.

Otras sustancias obtenidas son factores de crecimiento, factores de coagulación sanguínea y vacunas para enfermedades tales como la hepatitis B, el herpes y la rabia.

Grandes adelantos en la investigación sobre el SIDA y el cáncer (Ver tema 32)

Terapia génica

La **terapia génica germinal** (sobre células reproductoras humanas) ha sido descartada por consideraciones éticas y por el riesgo que suponen. La **terapia somática** (reparación de genes sobre células no reproductoras), está en un estadio de experimentación avanzada. Los procedimientos hoy experimentados sólo se orientan a la normalización de las funciones mediante la inserción de genes correctores. El uso de la terapia génica en humanos se aprobó en 1990.

La terapia génica permite tanto aumentar como disminuir la expresión de genes de interés; en el caso del cáncer o del SIDA el objetivo terapéutico puede ser el bloqueo de genes víricos, de oncogenes, o la potenciación de determinadas funciones celulares terapéuticamente útiles.

El descubrimiento en 1973, de que el fosfato cálcico facilitaba la entrada del ADN en solución al interior de las células abrió las puertas de la **transfección**.

- Consiste en sustituir genes de **retrovirus** por genes terapéuticos e introducirlos en las células que infecten. Para ellos los investigadores consiguieron las llamadas **líneas celulares productoras de vectores**. Se trata simplemente de células inmortalizadas (normalmente de ratón), en las que se introducen: el genoma vírico desprovisto de los genes que determinan su encapsidación, y ARN que contiene uno o más genes de interés médico, junto a la señal de encapsidación. Así, estas células fabrican todas las proteínas del virus, pero el único material genético con el que se pueden ensamblar es el que contiene dicha señal, en este caso los genes terapéuticos. Al infectar a las células, los nuevos virus les introducen los genes de interés y pueden integrar sus genes en los cromosomas. Este sistema, no obstante, presenta graves limitaciones: su escasa capacidad para albergar genes grandes, su producción a gran escala y el hecho de que sólo “transducen” eficazmente células en división (apenas actúan sobre células quiescentes).

Para obviar algunos de estos inconvenientes se han desarrollado nuevos vectores basados en virus con otras propiedades, los adenovirus.

- Los **adenovirus** contienen ADN, pueden albergar más información, tienen un amplio espectro de acción y no precisan que las células se dividan para “transducirlas”. El inconveniente que presentan es el de que, sus genes no se integran en los cromosomas de las células, por lo que a las pocas semanas o meses se diluyen y dejan de funcionar.
- Un tercer tipo de vectores actualmente muy de moda son los basados en los denominados **virus asociados a adenovirus** que permiten integrar genes en los cromosomas de manera estable.
- Por último, varios equipos están construyendo vectores a partir de virus del herpes simple, que se han demostrado eficaces en la transferencia de genes a células quiescentes como las neuronas.

- Otros métodos de desarrollo más recientes incluyen el uso de **liposomas**, ya citado. Dada la composición de las membranas celulares, los liposomas se funden con las células y vierten su contenido al interior de éstas. Aunque son sencillos de fabricar y carecen de toxicidad, son muy poco eficientes en la transferencia de genes, éstos no se integran en los cromosomas y con el tiempo se diluyen y desaparecen. Una versión más avanzada la constituyen los inmunoliposomas, que además contienen anticuerpos específicos que los dirigen al tipo de células deseado.
- El primer ensayo de terapia génica para una enfermedad genética se realizó con dos niñas con deficiencia del enzima adenosindeaminasa (ADA), que las hacía muy sensibles a las infecciones por una grave depresión del sistema inmunitario (Inmunodeficiencia severa o IDS), el gen está situado en el par 20. El tratamiento consistió en introducir copias normales del gen ADA en los linfocitos T. Después de diversos ciclos de tratamiento, finalizados en 1993, ambas niñas llevan una vida normal. Actualmente, en lugar de linfocitos, se están empleando células madre hematopoyéticas (ver tema 55) obtenidas del cordón umbilical. Aunque más reacias que los linfocitos a la introducción de los genes, tienen la ventaja de que, tras incorporar el gen e injertadas en el paciente, tienen una portentosa y casi inagotable capacidad de división.
- La hipercolesterolemia familiar consiste en un gen anómalo, situado en el par 19, que impide que las células del hígado capten el colesterol circulante. Para su tratamiento se extrajeron células del hígado, tras cultivarlas con un vector retroviral se inyectaron de nuevo. En los primeros pacientes se ha conseguido rebajar la cifra de colesterol en un 15-20 %.
- Cuando los genes son de gran tamaño la terapia génica se realiza con adenovirus o por liposomas. Es el caso del gen de la **fibrosis quística**⁶, ubicado en el par 7 y clonado desde 1989⁷.
- La talasemia (propia de poblaciones humanas de la cuenca mediterránea) es un grupo de enfermedades relacionadas con la falta total o parcial de ARNm de la globina α o de la globina β , provocando una anemia más o menos grave. Se debe a alteraciones en los genes de las globinas. Su tratamiento consiste en retirar células de la médula ósea del enfermo, mediante una punción, e introducir en ellas el gen correcto y volverlas al torrente sanguíneo para que se implanten de nuevo en la médula ósea.
- Hemofilia A (factor VIII) y B (factor IX), sobre fibroblastos o células hepáticas, en fase clínica.
- Enfisema hereditario, se trata de introducir el gen de la α -antitripsina en células pulmonares y hepáticas, en fase de estudios preliminares.
- Distrofia muscular, se trata de introducir el gen de la distrofina muscular sobre células musculares; también en fase de estudios preliminares.

64.4.2. Producción de etanol

Con miras a la producción de etanol a partir de celulosa, las investigaciones actuales inciden en la bioconversión de celulosa en glucosa por intervención de unos enzimas especiales (celulasas). Dichos enzimas son fabricados por diversos microorganismos (los hongos *Trichoderma*, *Schizophyllum*; y las bacterias *Thermomonospora* y *Clostridium*).

Los microorganismos producen el enzima en los fermentadores. Después, las moléculas del enzima se colocan en otros fermentadores llenos de pasta líquida de celulosa para hidrolizarla. La glucosa así obtenida se convierte en etanol en una tercera serie de fermentadores.

El acoplamiento entre celulasas y levaduras permite utilizar un sólo fermentador para convertir la celulosa en etanol en una sola operación. Para aumentar el rendimiento de esta operación se ha conseguido clonar los genes de las celulasas de hongos o bacterias en un plásmido de *E. coli*.

⁶producción de moco muy espeso, lo que facilita la aparición de infecciones respiratorias y problemas digestivos que los incapacitan y limitan sus esperanzas de vida.

⁷Actualmente están en marcha seis experiencias de tratamiento de la fibrosis, cinco de ellas utilizan adenovirus y una, liposomas.

64.4.3. Aplicaciones agroalimentarias

Los llamados **productos transgénicos**, normalmente de consumo, se obtienen de animales o plantas modificados genéticamente para dotarlos de cualidades deseadas, como tomates que tardan más en madurar, soja resistente a los herbicidas, etc. Ya están en el mercado.

Hoy, gracias a los criadores de plantas y a la ingeniería genética podemos, en su lugar, manipular las cosechas para que crezca en armonía con el medio ambiente, en lugar de hacerlo a pesar de él. En lugar de aportar grandes cantidades de fertilizantes, agua, herbicidas y pesticidas, podemos cultivar algunas variedades resistentes (ej. tomates regados con agua del mar, cepas de cereales,...).

La técnica de multiplicación vegetativa in vitro (**plantas probeta**), permite multiplicar una planta favorable a partir de fragmentos de diferentes partes de la planta. Así un solo rosal puede originar hasta 400.000 descendientes por año.

Mientras que actualmente sólo se pueden formar híbridos a partir de especies próximas, también se están realizando técnicas de fusión de protoplastos. En ella se juntan células de especies diferentes, a las que antes se les ha quitado su pared celular. Al juntarse, los núcleos pueden fusionarse y obtener, por cultivo de laboratorio, una nueva especie que reúna caracteres favorables de las dos especies. Pero la fusión de protoplastos, para ser útil, requiere que luego se llegue a poder formar un organismo completo. En la actualidad, el éxito ha sido escaso; como hecho espectacular de esta técnica se ha conseguido el pomate, hijo de la patata y del tomate, pero estéril.

Estas técnicas prometen conseguir nuevas plantas, que sean más eficaces, con menos necesidades y más resistentes. En especial, se buscan plantas que pudieran tomar nitrógeno de la atmósfera, para reducir así la dependencia de los abonos.

El premio Nobel Brolaug, predice los importantes beneficios que se derivarán en materia de producción de alimentos gracias al empleo de la ingeniería genética. Además de lo hasta aquí desarrollado, queda mucho por hacer para mejorar la resistencia de los cultivos a enfermedades e insectos y aumentar la tolerancia a ambientes extremos. Recientes experiencias permiten aumentar la resistencia a las condiciones agroclimáticas y del suelo dentro de cada especie: mayor resistencia a la sequía, a la toxicidad de algunos componentes de suelos salinos y ácidos⁸, o al frío⁹, y al calor.

Otra línea seguida estudia las posibilidades de cruzamiento entre especies, para obtener nuevos vegetales con mayor estabilidad ambiental: Ej. el tritcale (híbrido del trigo y del centeno), del que se obtienen ya rendimientos similares a los de los mejores trigos en ambientes óptimos; siendo su mayor ventaja sus posibilidades de cultivo en suelos arenosos o ácidos o en tierras marginales con temperaturas frías.

Otro foco de investigación se centra en la bacteria *Agrobacterium* (ver páginas 8 y 9). Los japoneses han comercializado un péptido herbicida producido por bacterias del género *Streptomyces*.

La inserción de los **genes nif**, posibilita el aprovechamiento del nitrógeno atmosférico por parte de algunas bacterias y cianobacterias, en el genoma de plantas superiores.

Las nuevas ideas agrícolas apuntan hacia la obtención de cosechas de plantas adaptadas al medio ambiente, abandonando la idea de modificar el medio para que pueda conseguirse una cosecha.

Estos adelantos constituyen las piezas clave de la inminente Revolución Genética, un cambio cualitativo aún más trascendental que la Revolución Verde o la anterior Revolución Agrícola. Para tener éxito, será necesaria más atención a la investigación, y una serie de nuevas estrategias económicas que cambien el estatus actual de la agricultura. La importancia de la recolección y conservación de los recursos genéticos vegetales, como base de la seguridad alimentaria de hoy y del futuro, ha movido a la FAO a aprobar, en 1983, un Compromiso Internacional en el que reconoce formalmente que los recursos genéticos vegetales

⁸ Introducción de toxinas de insectos en *Pseudomonas fluorescens* para proteger las raíces de las plantas. Otras técnicas incluyen el desarrollo de cepas bacterianas y virales para eliminar plagas como la del gusano del algodón y la polilla del abeto.

⁹ Se ha modificado *Pseudomonas syringae* mediante la delección de un gen para una proteína que actúa como núcleo en la formación de cristales de hielo. Se trata de sustituir bacterias normales por éstas.

son un patrimonio común de la humanidad que debe ser preservado y de libre intercambio entre naciones e instituciones.

La industria agroalimentaria constituye uno de los campos predilectos de la **ingeniería enzimática** (el 70 % de los enzimas del mercado son el resultado de este sector industrial). En la actualidad, el mercado se halla muy especializado, tanto en lo referido a los enzimas como en el de las industrias consumidoras. La industria del almidón (α -amilasa, glucoamilasa y glucosa isomerasa), mientras que el **cuajo** se emplea especialmente en las industrias lácteas.

La hidrólisis enzimática del almidón se lleva a cabo mediante el *Bacillus licheniformis* (posee una α -amilasa muy eficaz); la glucosa se transforma en fructosa (glucosa isomerasa) que tiene mayor poder edulcorante. Esta investigación fue consecuencia del encarecimiento del mercado del azúcar en 1974.

El **cuajo** (necesario en las industrias lácteas) es el único enzima de origen animal que se utiliza en gran escala. Se extrae del cuajar de la ternera, permite la coagulación de la leche al hidrolizar específicamente un enlace peptídico de la caseína. Actualmente se puede sustituir por proteasas de *Mucor* sp., de *Endothia* sp., etc. (el 40 % de los quesos de EE. UU. se fabrican con estos enzimas). Recientemente se ha conseguido aislar el gen responsable de la síntesis de la quimosina (uno de los constituyentes del cuajo); la comercialización del enzima fabricado por bacterias recombinantes es ya un hecho.

64.4.4. Aplicaciones en la minería e industria (descontaminación)

Algunos minerales contienen cantidades apreciables de metales preciosos (oro, plata, platino) o de interés económico (magnesio, molibdeno). Hay ya aplicaciones industriales para el caso de algunos de estos metales; por ejemplo, las aguas de lavado de extracciones mineras ricas en uranio pasan a través de fermentadores que contienen algas unicelulares (*Chlorella*) y bacterias (*Streptomyces*) inmovilizadas sobre soportes porosos. Para otros minerales se utilizan mohos (*Aspergillus* o *Penicillium*). El rendimiento de la recuperación es de un 90 a un 100 %.

A partir de bacterias (*E. coli*), por ingeniería genética, se pueden fabricar proteínas animales que quelan los metales (metalotioninas), y que tienen gran afinidad por el oro, la plata o el plomo. El sustrato puede ser el agua de lavado de extracciones mineras o incluso el agua del mar. Esta técnica se sitúa en la frontera entre la valorización de desechos mineros y la descontaminación, en el caso de que los metales fijados por las bacterias sean nocivos (Plomo).

Una aplicación importante es la **disminución de la contaminación** ocasionada por procesos industriales:

Mediante procesos de fermentación se podría atenuar la contaminación atmosférica causada por fábricas de purificación de cobre; el SO_2 sería transformado en H_2SO_4 . Así se evitaría la lluvia ácida, importante factor contaminante en los países industrializados.

La utilización sistemática de fermentaciones bacterianas para la descontaminación del medio ambiente está a la orden del día; permitiría eliminar toda clase de factores contaminantes de origen orgánico: desechos urbanos, residuos de industrias agroalimentarias, excrementos, pulpa de madera, paja, etc. Estos desechos podrían transformarse en biogás ($\text{CH}_4 + \text{CO}_2$), o bien servir para la nutrición de microorganismos para la producción de proteína de organismo unicelular (POU), que se utilizan para alimentar el ganado.

Los materiales pesados se pueden eliminar mediante **biosorción**: eliminación de metales y compuestos relacionados de una solución mediante material biológico. La biosorción propiamente dicha se refiere a procesos que son independientes del metabolismo microbiano (ligandos de superficie que forman complejos iónicos o covalentes con los metales), por lo que pueden tener lugar tanto en células vivas como en muertas. Por otro lado se habla de biosorción en procesos dependientes del metabolismo, que implican, como primer paso, el transporte de los metales pesados a través de membrana (intervienen ATPasas); tras éste, una opción será la compartimentalización en vacuolas, otra opción es la conversión en metales no tóxicos por unión o precipitación, o la síntesis de compuestos que incluyen metales en su

composición (metaltioninas y fitoquelatinas, por ejemplo). Si bien los procesos dependientes del metabolismo presentan tasas de incorporación de metales mucho más elevadas que los independientes, tienen problemas asociados, tales como la inviabilidad de la biomasa en un medio constituido por residuos industriales altamente tóxicos o la necesidad de diseñar procesos de desorción (recuperación del metal incorporado). Casi huelga decir el importante papel de la biotecnología en este cuadro de actuación, resumiéndolo en pocas palabras: selección y mejora de microorganismos de aplicación a la biosorción; como ejemplos, sirvan los siguientes:

Microorganismo	Clasificación	Metal incorporado
<i>Sphaerotilus natans</i>	Bacteria	Zn, Pb, Ni, Mn
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	“	U, Pb
<i>Bacillus subtilis</i>	“	Mg, Ca, Fe, Ni
<i>Escherichia coli</i>	“	Pb, Cr
<i>Sacharomyces cerevisae</i>	Levadura	U, Th, Pb, Cr
<i>Candida utilis</i>	“	Cu, Co, Zn
<i>Cyanidium caldararium</i>	Alga	Pb, Sn, Pt, Cr

64.4.5. Genética forense

Se usa para determinar la identidad del ADN de las células (sangre, pelo, semen) que quedan en la escena de un crimen, comparándola con la de cualquier sospechoso; también se usa en las disputas de paternidad.

Se basa en el hecho de que existen, como hemos visto, secuencias repetitivas agrupadas de ADN, dispersas en todo el genoma de los seres humanos. Cualquier secuencia de ADN (locus) que exista en copias múltiples alineadas juntas una después de la otra se llama locus NVRT (nº variable de locus repetidos en tandem)¹⁰. El número, patrón y la longitud de estas repeticiones son únicos en cada individuo. Sin considerar su longitud, cada repetición contiene una secuencia central común (generalmente 10-15 pares de bases) que puede ser reconocida por una sonda radiactiva adecuada, tras lo cual, se somete a autorradiografía. El patrón de bandas que se revela en la autorradiografía es único para cada individuo.

La técnica de PCR fue diseñada por el premio Nobel K. Mullis en 1985. La PCR está revolucionando el campo de la investigación criminal, ya que permite obtener “huellas genéticas” por amplificación del genoma que se puede extraer a partir de, por ejemplo, la saliva dejada en el filtro de un cigarrillo.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio de las consideradas preparativas ya que permite la obtención (amplificación) de hasta un millón de copias de una secuencia determinada de ADN de hasta 3 kb. La idea es sencilla pero, al mismo tiempo, brillante. Se parte de dos oligonucleótidos (de entre 15 y 20 nucleótidos cada uno) con capacidad para hibridar en los extremos de la doble hebra de ADN a amplificar, es decir, cada oligonucleótido es capaz de hibridar con el extremo de una de las cadenas de la doble hélice. Y se procede de la siguiente manera: se prepara una mezcla que contiene la secuencia de ADN, los mencionados oligonucleótidos, desoxirribonucleótidos en abundancia y enzima ADN polimerasa; a continuación se calienta dicha mezcla de forma que el ADN se desnaturaliza, esto es, se separan las dos hebras, lo que va a permitir que éstas hibriden con los oligonucleótidos cuando se deje enfriar. Una vez se ha producido la hibridación, la ADN polimerasa comienza la síntesis de dos nuevas hebras de ADN, por lo que tras este primer ciclo se obtendrán dos copias del ADN de partida (nótese que los oligonucleótidos han actuado como si de ARN primer se trataran). El procedimiento se repite una y otra vez hasta un número de ciclos, normalmente entre 25 y 50, que permita obtener la suficiente cantidad de copias de la secuencia de ADN. El problema que, al principio, se derivaba del hecho de que el calor también desnaturalizaba la polimerasa (ya que es una proteína), cuestión que obligaba a añadir una

¹⁰ Algunas sondas han puesto al descubierto algunos loci hipervariables con muchos alelos (cada persona posee solamente dos de los muchos alelos posibles. Estos loci contienen muchos segmentos cortos (10 a 60 pb) repetidos en tándem. Debido probablemente al entrecruzamiento desigual, se genera mucha variación en estos loci, denominados loci de número variable de repeticiones en tándem.(NVRT)

cantidad nueva de enzima en cada ciclo, se ha solucionado en la actualidad al disponer de ADN polimerasas termoestables.

64.4.6. El proyecto Genoma

Genoma es un concepto referido a toda la información hereditaria que es típica de un organismo particular, todo su material cromosómico portador de características heredables. El genoma humano es, pues, todo el ADN celular característico o propio de nuestra especie. El Proyecto Genoma Humano (PGH) pretende reconstruirlo. El proyecto incluye también a otros organismos modelo, que los genéticos utilizan en su investigación, como bacterias, levaduras (casi totalmente terminado), *Drosophila* y ratón entre otros.

Se ha logrado identificar, hasta 1997, el genoma completo de seis bacterias. El científico Craig Venter, líder en la secuenciación de genomas, ha logrado el inventario genético completo de la bacteria *Helicobacter pylori* (principal causa de las úlceras de estómago)¹¹, la importancia clínica de esta bacteria no puede ser subestimada, ya que acaba con toda una interpretación de las causas de la úlcera de estómago. El genoma más grande conocido al completo es el de la *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del pan), con unos 5800 genes y unos 12 millones de pares de bases.

Una de las sorprendentes conclusiones que se está demostrando es que en la especie humana se encuentran, en muchos casos, los mismos genes que en *Drosophila* o en la levadura; y que actúan fabricando los mismos productos y regulando la formación de los mismos órganos, aunque aparentemente tan distintos como el ojo compuesto de un insecto y el ojo de un vertebrado.

Los países más industrializados del mundo se han interesado por el PGH, destinando fondos públicos para acometerlo; está coordinado por La HUGO (Human Genome Organization). Su objetivo no es otro que el de identificar las secuencias de ADN de los genes que conforman el patrimonio genético humano y determinar sus principales funciones de síntesis proteica.

Su justificación inicial, y por consiguiente su legitimación pública, fue la de aislar los genes defectuosos con fines de terapia y diagnóstico médico. La tarea central del PGH es la de identificar, y aislar las secuencias de genes que codifican proteínas importantes. El resto del Proyecto se ocupará de la reconstrucción del inventario de genes que codifican las distintas secuencias de aminoácidos que caracterizan a cada proteína, permitiendo el descubrimiento de posibles genes implicados en disfunciones congénitas y potenciando las labores de diagnóstico y posible terapia génica.

Durante 1989, se inició la maquinaria administrativa para dirigir la secuenciación completa del genoma humano (unos 3.000.000.000 de pares de bases y unos 80.000 genes). Estimaciones iniciales calculaban necesarios unos 15 años con un costo de 3000 millones de dólares. Dos técnicas nuevas de mapeo han alentado las expectativas.

- a) **Hibridación in situ.** Consiste en hibridar una sonda de ADN monocatenario que contiene biotina marcada, con un cromosoma metafásico y desnaturalizado y extendido. El cromosoma extendido se expone a la proteína avidina que se ha marcado con un colorante fluorescente. La avidina se une firme y específicamente con la biotina. La ubicación de la sonda hibridada se revela mediante un microscopio fluorescente. Así se establece el orden de los numerosos fragmentos cromosómicos.
- C. Venter y colaboradores sugieren que debemos estar más interesados en los genes que se expresan que en secuenciar el genoma completo. Él y sus colegas han aislado ARNm y obtenido, a partir de él, ADNc y emplean éste como sonda para localizar en una genoteca los genes que se expresan. Hasta ahora han aislado ADNc de más de 600 genes activos en el cerebro humano.
- b) **Mapeo de híbridos por radiación.** Esta técnica se basa en la frecuencia con la que los marcadores ligados se separan después que el cromosoma se fragmenta por rayos X.

Por estas dos nuevas técnicas, se espera que sea posible el mapeo de 5000-7000 sondas, creando marcas separadas un promedio de un millón de pares de bases por todo el genoma de los seres humanos. Clones específicos de estas sondas pueden asignarse a los distintos laboratorios participantes en la secuencialización en todo el mundo.

¹¹ Tiene 1603 genes, en un único cromosoma que posee 1.667.867 pares de bases.

La decodificación de las secuencias de nucleótidos del genoma humana permitirá reconstruir un mapa completo de las regiones cromosómicas. La medicina puede ya adelantar, con relativo éxito, la identificación de genes responsables de malformaciones o problemas congénitos y, por tanto, la posibilidad de evitar la concurrencia de estos genes.

Otro aspecto del PGH es el de la detección de las diferencias individuales. Sólo mediante el establecimiento de las propias secuencias de ADN, el individuo puede ser genéticamente identificado para un correcto diagnóstico de susceptibilidad o propensión a dolencias hereditarias (diabetes, afecciones coronarias) y patologías de aparición retardada asociadas a su patrimonio genético (**rastreo genético**).

Algunos genes localizados y secuenciados gracias al PGH son:

- PC (cromosoma 1): Cáncer de próstata.
- HD (cromosoma 4): corea de Huntington, desorden neurovegetativo que causa movimientos involuntarios y deterioro intelectual progresivo.
- IDDM1 (cromosoma 6): Implicado en la diabetes juvenil en la que los linfocitos T se infiltran en el páncreas y destruyen las células productoras de insulina.
- WRN (cromosoma 8): síndrome de Werner que causa el envejecimiento prematuro de los niños.
- CDKN2 (cromosoma 9): Melanoma maligno (Cáncer de piel muy agresivo)
- PAH (cromosoma 12): Fenilcetonuria, que desencadena retraso mental.
- AD3 (cromosoma 13): Mal de Alzheimer.
- PKD1 (cromosoma 16): Enfermedad poliquística rena.
- ADA (Cromosoma 20) Incapacidad de producir el enzima adenosina desaminasa. Esta deficiencia produce inmunodeficiencia severa.

64.5. Dimensión ética de la ingeniería genética.

En julio de 1978 se sintetizó insulina humana obtenida por ingeniería genética. Dos años después la insulina procedente de bacterias fue el primer compuesto elaborado mediante ingeniería genética que recibía autorización para administrarlo al hombre. La insulina es tan sólo la primera de una numerosa serie de valiosas sustancias que se pueden elaborar con ayuda de bacterias manipuladas genéticamente. En la actualidad incluyen el interferón, la hormona del crecimiento, vacunas y proteínas plasmáticas.

Según un estudio publicado en estados Unidos los procesos más espectaculares que se darán hasta el año 2000, y su aplicación, son: creación de nuevas plantas fijadoras de nitrógeno, proteínas de organismos unicelulares comestibles, selección de plantas resistentes a las plagas, selección de bacterias para el tratamiento de compuestos petroquímicos, terapia del gen para corregir enfermedades de naturaleza genética, aislamiento de genes responsables de anomalías hereditarias, comprensión de los procesos inmunológicos, mejora del conocimiento del proceso geriátrico.

En 1975 se suscitó una gran controversia sobre la ingeniería genética (sólo comparable a la de la energía nuclear), a veces llamada también manipulación genética, clonación genética, etc. Con aquellas técnicas totalmente nuevas, los científicos podían manipular el ADN y era posible injertar genes de un organismo en otro e inducir las células a producir materiales que nunca habían sintetizado. Buena parte de la tormenta que se abatió sobre la oportunidad de proseguir con aquellas investigaciones, que inspiraban temor, se refería al espinoso asunto de los temibles y posibles riesgos (creación de "microbios asesinos") que podían correrse frente a probables beneficios, particularmente en la investigación biológica y la medicina.

En la actualidad la polémica ha remitido algo, y, lo que es más importante, se han acumulado hechos, lo que ha posibilitado la valoración razonada de los posibles riesgos, y acerca de como reducirlos. El argumento central de los detractores era que los organismos de nueva creación podrían producir enfermedades (convertir en bacteria patógena a la E. Coli).

Las primeras recopilaciones de directrices (USA, Reino Unido) fueron bastante restrictivas. Definían las condiciones de los laboratorios y las precauciones que deberían de tomarse para prevenir la fuga de microorganismos así como el tipo de microorganismos que podían emplearse. En 1983 muchas de esas limitaciones se habían relajado, aunque se mantiene un considerable número de medidas de seguridad. Esta liberación de las reglas se deben a que:

- a) El concepto de riesgo cero es algo virtualmente desprovisto de sentido en cualquier campo de la actividad humana. Hay que sopesar ventajas y riesgos.
- b) La mayoría de los biólogos están de acuerdo en que los riesgos de accidentes son mínimos. El escape de los microorganismos parece poco probable si atendemos a la experiencia de los microbiólogos con multitud de microorganismos patógenos. Por otro lado, la cepa de *E. coli* utilizada (K-12) sólo puede vivir con garantía de supervivencia en el ambiente artificial del laboratorio. Además se crearon cepas de *E. coli* (X176) que sólo sobreviven en ambientes con componentes raros o poco habituales (sales biliares + antibióticos + detergentes).
- c) Cuando se insertó el virus del polio de hámster en la *E. coli*, y ésta se le inyectó posteriormente sin resultados patógenos para el animal, la polémica fue perdiendo fuerza.
- d) No obstante, para los casos de microorganismos dotados de un gen extraño, se ha decidido instalar algunos laboratorios de alta seguridad; clases P₁ a P₄ según el grado de peligrosidad potencial, en los centros de investigación donde se realizan dichos experimentos.

La certeza de que los especialistas en ingeniería genética plantearán nuevas propuestas que han de requerir cuidadosas consideraciones hacen improbable que desaparezcan las presentes regulaciones.

Otro aspecto a tener en cuenta es el de las patentes. Mientras es imposible obtener una patente sobre un ser vivo, por ejemplo un microorganismo, existente en la naturaleza y descubierto en una investigación rutinaria, en cambio parece admisible conceder una patente a un microbio o a un ser vivo aislado y transformado por el inventor con el fin de cumplir una función que no realiza en condiciones naturales; en efecto, es la nueva forma la que permite obtener resultados interesantes, siendo el punto de partida de una innovación; se puede considerar también como un nuevo producto respecto al producto natural.

La concesión de patentes a cepas bacterianas, modificadas o no por técnicas de recombinación genética, promueve problemas de tipo filosófico y jurídico. Las decisiones tomadas en estados Unidos y otros países rechazan establecer diferencias entre un proceso vivo y un objeto o mecanismo físico, aunque patentar un ser vivo para ser utilizado en un caso particular no es equivalente a patentar el uso para el que se desea utilizar.

En Estados Unidos, desde 1983, se estipulan tres tipos de experimentos que deben obtener autorización de los institutos nacionales de sanidad antes de emprenderse: experimentos sobre la resistencia de los microorganismos a sustancias medicamentosas; sobre los genes que gobiernan la síntesis de toxinas, y operaciones que comportan la liberación al medio ambiente de organismos de genoma modificado, como los utilizados en la lucha contra las plagas de los cultivos.

El 4 de abril de 1997, quince países, entre ellos España, firmaron en Oviedo el Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina, el primer texto jurídico internacional con carácter vinculante destinado a proteger a las personas contra posibles abusos en las distintas aplicaciones biológicas y médicas. Se aprobó en noviembre de 1996 por el Consejo de Europa.

Prohíbe cualquier discriminación en virtud del patrimonio genético del individuo y sólo permite la realización de pruebas genéticas predictivas con fines exclusivamente terapéuticos. Se insiste en que la ingeniería genética no tenga por objeto la modificación del patrimonio genético del individuo; prohíbe la creación de embriones humanos con fines de investigación y exige una protección adecuada de los embriones que se empleen en la técnicas de reproducción asistida; incluye la prohibición expresa de clonar seres humanos, etc.

Actualmente se trabaja en distintos protocolos específicos adicionales, entre otros, los de trasplantes de órganos, protección del embrión humano y del feto, sobre investigación genética, etc.

64.5.1. Ingeniería genética y armas biológicas

Los observadores han prestado mucha atención a la utilización de la ingeniería genética para armas biológicas. Aunque las armas biológicas están prohibidas por tratados internacionales, la investigación

dirigida a proteger al pueblo de sus efectos no lo está. Existen pocas dudas del interés de los militares en la ingeniería genética y en la biotecnología en general. Se especula con que los avances en ingeniería genética aumente la puesta en práctica de las armas biológicas.

El uso masivo de dichas armas parece descartado dada la imposibilidad material de controlar totalmente epidemias masivas, o, en todo caso, la imposibilidad de incidir específicamente en una determinada población dada su diversidad genética. Otros dos aspectos merecen tenerse en cuenta:

- La posibilidad de su uso por grupos terroristas.
- Usar las armas biológicas para socavar la salud y estabilidad económicas de las naciones, especialmente las menos desarrolladas. Del mismo modo se podría incidir sobre sus cultivos, socavando la economía de dicha nación (hay acusaciones de Cuba sobre EE. UU. a este respecto, y de éstos sobre la URSS a propósito de la lluvia amarilla en el Sureste asiático).
- Otros dos aspectos de la biotecnología merecen una atención especial, son los **biosensores** (enzima o anticuerpo específico para la sustancia que desea medirse, se han utilizado para medir glucosa, creatinina, urea, antígenos de la hepatitis; también sustancias industriales: ácidos, alcoholes, fenoles) y los biochips (insertar moléculas semiconductoras en una proteína) utilizados para la detección de gases tóxicos.

Las reacciones frente a tales aspectos de la biotecnología entran en el campo de las opiniones personales. Existen signos esperanzadores de que por lo menos algunos grupos de científicos son conscientes del peligro que entraña este posible uso de la ingeniería genética. La National Academy of Science (USA) rechazó colaborar con la Armada de aquel país cuando recibió la solicitud de ayuda para reconocer "agentes del futuro", término que incluía microbios creados mediante ingeniería genética.

64.5.2. Ingeniería genética humana

La facultad para descubrir gran cantidad de datos acerca de la constitución genética de los individuos plantea algunas consideraciones éticas profundas. Hay dos preguntas principales ¿Cómo deberían adquirirse los datos? y ¿cómo deberían usarse?

Es posible decir si un individuo es portador de determinados genes defectuosos. Se usan sondas de ADN para diagnosticar enfermedades hereditarias.

Se dan informes genéticos (**consejo genético**) fiables sobre posibles defectos genéticos en los hijos. A medida que las posibilidades de detección aumenten el beneficio será obvio, pero, al mismo tiempo, más parejas se verán enfrentadas con el dilema de tener o no tener hijos o incluso a la posibilidad de pensar en tenerlos con otra persona que no sea portadora de los mismos factores de riesgo.

Más complejas son las cuestiones que plantean enfermedades que, como el cólera de Huntington, se manifiestan en edades intermedias y no tienen curación, y de las que se ha detectado el gen que las determina. ¿Qué hacer con los hijos de una persona que padezca dicha enfermedad? Los resultados de las pruebas de diagnóstico serían mezcla de temor y de esperanza.

La criba genética de los obreros de determinadas industrias es algo que se está considerando atentamente. Es evidente que todas las personas no tenemos la misma propensión a contraer enfermedades originadas por determinadas sustancias químicas. Si la detección de esta propensión se puede determinar mediante la **criba genética**, ¿qué pasará con sus perspectivas laborales?

Cuando el proyecto genoma cristalice será posible predecir, por ejemplo, la probabilidad de morir de muerte prematura (cáncer, diabetes, ataque cardíaco), la idoneidad para determinadas ocupaciones o la probabilidad de desarrollar enfermedades mentales. No se sabe en qué medida tales factores dependen de factores hereditarios personales y en qué medida de factores ambientales y sociales. ¿De qué manera reaccionaría la sociedad ante las sugerencias de que un niño que tiene la probabilidad de morir a una edad intermedia afectado por un cáncer o un ataque cardíaco no debería recibir la misma "inversión" en su

futuro que sus compañeros más afortunados? ¿Se consideraría adecuada para él una educación y unos cuidados médicos de segunda fila?

¿Hasta qué punto se debe usar la intervención genética para cambiar el curso de la vida de una persona?, ¿será normal que la gente sea transgénica.

El progreso en estos campos se tiene que controlar con cuidado. La primera necesidad es, sin lugar a dudas, alguna forma de derecho a la libertad de información: que nadie pueda obtener datos genéticos acerca de los individuos sin que queden claras sus repercusiones.

La Asamblea parlamentaria del Consejo de Europa (26-1-1982) examinó un proyecto de recomendaciones que intenta definir, por primera vez, la legitimidad de la aplicación de las técnicas de ingeniería genética en los seres humanos. Dicha propuesta representa la primera tentativa, a nivel internacional, de establecer una protección jurídica contra las consecuencias de las manipulaciones genéticas.

La National Academy of Science (USA) publicó, en 1988, un informe que recomendaba el apoyo al proyecto genoma. Se ha establecido un comité de ética como parte del proyecto genoma humano y se ha prometido un 3 % del presupuesto para el estudio de los problemas éticos implicados en la cartografía de nuestro genoma. Hay voces críticas que señalan que es preferible el apoyo a investigadores aislados, que sigue sus propios intereses, que la creación de un gran aparato burocrático. También se considera excesivo el coste necesario para alcanzar la secuencia completa.

A raíz de la clonación de la oveja Dolly se ha reavivado la polémica sobre la ingeniería genética humana. Hoy por hoy, tanto en Estado Unidos de América como en la UE, se rechaza la posibilidad de clonación humana. Lo cual no quiere decir que se desechen las aplicaciones de la tecnología para el uso humano, dejando abierta la puerta a la investigación con embriones de menos de 16 días, siempre que no se implanten en el útero materno. Todas las objeciones éticas se unen contra el aventurerismo científico defendido por algunos científicos (como el danés Steen Malte Willadsen) que sostienen que, la misión de la ciencia es la de violar las leyes de la Naturaleza; añaden que todas las cuestiones relacionadas con la ingeniería genética aplicada a humanos debe afrontarse sin hipocresías ni eufemismos ya que sospechan que la clonación de seres humanos ya se ha llevado a cabo.

64.5.3. Ingeniería genética y economía

Los países pioneros en biotecnología son EE. UU. y Japón. En los primeros es la iniciativa privada (multinacionales) la que impulsa el desarrollo de aquella; en el Japón es el gobierno el principal promotor. Su supremacía tecnológica queda demostrada por su virtual monopolio del comercio mundial de determinados aminoácidos, enzimas y aditivos alimentarios. Los países de la CEE son partidarios del modelo japonés.

Para que los países del Tercer Mundo se puedan beneficiar de las oportunidades que ofrece la ingeniería genética contra las enfermedades infecciosas o parasitarias es preciso encontrar una solución financiera. La OMS y otras instituciones internacionales tienen laboratorios de investigación, pero es urgente potenciar el desarrollo de nuevas posibilidades de investigación y comprobación no lucrativas a la vez que se aumentan los esfuerzos dedicados a la investigación fundamental.

Si pudieran reducirse las pérdidas en los cultivos debidas a la destrucción por plagas, tanto en el Tercer Mundo como en cualquier otro lugar, se dispondría de muchos más alimentos. En este campo hay dos estrategias:

- Obtener cultivos resistentes a determinadas plagas, o
- crear cultivos resistentes a los plaguicidas que permitirían usar poderosos plaguicidas para destruir las malas hierbas y organismos nocivos.

Es evidente las preferencias de las grandes compañías agroquímicas por la segunda opción. Pero, a largo plazo, debería prevalecer las ventajas agrícolas y ambientales de la eliminación de la necesidad de plaguicidas.

Uno de los mayores problemas económicos globales que se ven afectados por la revolución bioindustrial está relacionado con la caña de azúcar, que constituye uno de los principales apoyos de la economía de muchos países especialmente en la zona del Caribe. El aumento de la utilización del alcohol como combustible puede aumentar la demanda de caña de azúcar (desviando su uso como alimento), pero el

crecimiento del mercado de los edulcorantes (fructosa, aspartato), puede reducir los precios. Sólo podemos intuir las repercusiones de estas fuerzas contrapuestas.

En el próximo siglo los plásticos obtenidos a partir de organismos vivos podrán realizar muchas de las funciones que actualmente desempeñan los metales. Cualquier necesidad de metales podrá resolverse mediante las técnicas de minería microbiológica y, lo más importante, por la utilización de microorganismos capaces de reciclar los metales que ya han sido extraídos de la Tierra por métodos tradicionales.

De modo similar, las necesidades energéticas podrían derivarse de la energía solar mediante la utilización de vegetales para fabricar alcohol y del metano producido por los generadores que funcionan con residuos. Se trata de ideas grandiosas, pero factibles a la vista de que evoluciona la ingeniería genética.

El desarrollo de la biotecnología y las ventajas que cabe esperar de ella corren el riesgo de agravar más aún las profundas diferencias entre los países en vías de desarrollo y los países industrializados, e incluso en el seno de estos últimos. El esfuerzo de cooperación queda tanto más justificado puesto que los dos grupos de países se interesan por dos aspectos esenciales de la biotecnología: la conservación de la diversidad genética (mediante la creación de bancos de genes) y la innovación tecnológica.

Las Naciones Unidas proyectan la creación de un centro internacional de ingeniería genética y biotecnología cuya misión sería promover el traspaso de tecnología entre los países industrializados y los países en vías de desarrollo. Por su parte, La UNESCO continúa su política de promoción de la microbiología aplicada con miras a un mejor dominio de las biotecnologías.

64.5.4. Opinión de los españoles sobre la ingeniería genética.

Los resultados de una encuesta realizada en nuestro país en 1990, por el Instituto de Estudios Sociales Avanzados arroja, entre otros, los siguientes resultados:

La lectura de los porcentajes señala que, en términos generales, las mujeres se muestran más reticente a la manipulación genética que los hombres; los jóvenes indistintamente de su sexo, señalaron mejor disposición frente a éstas que los maduros (con más de 46 años). Por lo que hace a "creencias religiosas", a juzgar por los datos, parecieron menos preocupados por las connotaciones morales de la ingeniería genética en plantas y animales. Los católicos activos fueron los más reacios a la aceptación de estas prácticas, especialmente en embriones humanos. En todos los casos la aceptación de la manipulación genética aumentó paulatinamente a medida que se incrementaba el grado de instrucción de los encuestados, presentando un salto importante al alcanzar el indicador correspondiente al nivel "alto" de estudios.

A diferencia de lo sucedido en otros países europeos, en España la conciencia media en relación al impacto sobre la salud, ecológico y medioambiental de las nuevas tecnologías se mostraba en un estadio incipiente. Ningún colectivo manifestó haberse visto afectado por los efectos de la biotecnología, excepto quizá algunos casos puntuales de uso abusivo de hormonas de crecimiento y engorde animal. Se detectó un mayor grado de sensibilización en los grupos directamente asociados al consumo alimenticio -sobre todo mujeres y amas de casa- cuyo rechazo fue comparativamente mayor.

De la muestra afloraba una visión optimista del binomio ciencia-progreso, manifestando, no obstante, la necesidad de regulación y control en la ciencia aplicada y la tecnología.

Las respuestas convergieron a favor del **control social del desarrollo científico y técnico**, aunque divergieron en relación a los agentes responsables del tal protagonismo social. Las respuestas fueron particularmente adversas hacia el sector industrial y algo más generosas con el colectivo científico, aunque en ambos casos los encuestados parecieron contrarios a admitir el control del desarrollo tecnológico y aplicado por parte de cualquiera de los gremios en exclusiva. La mayor desconfianza del público fue hacia los intereses económicos del consorcio tecnología-industria y tampoco acabaron de fiarse de la administración pública, siendo los organismos internacionales los que alcanzaron la más alta puntuación de respuesta.

En marzo de 1997, el Centro de Investigaciones Sociológicas (CIS) entrevistó a 2500 personas de 163 municipios y 44 provincias distintas para conocer la opinión de los españoles respecto a los avances en ingeniería genética y biotecnología. Desconocían aún que el 20 octubre de 1997, en el Reino Unido, Jonathan Slack, mediante una modificación genética, obtuvo ranas sin cabeza ni cola (lo que abre la puerta a crear cuerpos humanos sin cabeza ni sistema nervioso).

A raíz del nacimiento de la oveja Dolly, al 33 % de los encuestados el experimento les pareció más bien negativo y al 31 % muy negativo.

Al 70 % les pareció posible la clonación humana en unos 10 o 20 años; siendo el mismo % los que opinaban que las autoridades deberían impedir los experimentos encaminados a la clonación humana (en España está prohibida desde 1986).

Un 38 % opinaba que los riesgos del desarrollo científico y tecnológico superarán a los beneficios en los próximos 20 años, siendo un 29 % los que opinaban lo contrario.

La investigaciones genéticas que más aceptación provocaron son las que sirven para diagnosticar las enfermedades hereditarias de las personas y para aplicar nuevos tratamientos médicos. Y los que más rechazo cosecharon son los experimentos para conseguir ganado de engorde más rápidamente y peces de mayor tamaño para el consumo.

La mayoría se mostró en desacuerdo con que se utilicen las pruebas con las células humanas para mejorar las características físicas que puedan heredar los niños.