

DNA Recombinante

Introducción:

Se podría decir que el camino que ha recorrido la manipulación genética se inicia en 1665, cuando el científico Británico Robert Hooke publicó un libro titulado *Micrographia*, en el que daba cuenta de las observaciones que había realizado por medio del microscopio (Grace, 1999). Aunque la biotecnología puede ser una denominación nueva, existe una historia muy antigua que describe el uso de procesos biológicos para la fabricación de productos, la cual abarca desde el primer empleo de la fermentación alcohólica a la mucho mas reciente generación de de antibióticos. Pero sin lugar a dudas el descubrimiento más trascendental llegó en 1953 de la mano de James Watson y Francis Crick, dos jóvenes investigadores de la universidad de Cambridge. Que construyeron un modelo de ADN compuesta de dos filamentos entrelazados, la famosa doble hélice (Grace, 1999). Durante muchos años la ingeniería genética se basó en una visión en que los cromosomas eran cadenas estáticas de ADN y proteínas. Se estimaba que los genes se activaban o se desactivaban según las señales externas que recibían. Si a un cromosoma se le inyectaba un gen nuevo, éste se transformaría usualmente en una proteína. La presencia o la actividad de esta proteína influiría en la célula, el tejido o el organismo 1.

En los últimos años se ha ido produciendo una revolución en la biología. Inicialmente su desarrollo estuvo centrado en los estudios a nivel molecular, pero ya son pocas las áreas de la biología aplicada y pura que permanecen intactas. La causa de toda esta agitación es la aparición de una serie de técnicas indistintamente referidas como ingeniería genética, clonación genética, tecnología del DNA recombinante o manipulación genética *in Vitro* (Walter & Gingold, 1997).

Cada descubrimiento que viene revoluciona por completo no sólo los conocimientos de la genética animal y vegetal, sino sobre todo, la comprensión de las enfermedades genéticas humanas. Al mismo tiempo, se están inventando nuevos sistemas para detectar las enfermedades genéticas, y se están haciendo esfuerzos prometedores para su curación (Curtis & Barnes, 2000).

El hecho más característico en esta nueva tecnología es la posibilidad de introducir material genético en las células, de tal modo que el DNA sea capaz de replicarse y ser transferido a la progenie. En otras palabras, la posibilidad de alterar la composición genética de las células incluyéndoles DNA desde el exterior. Ese DNA puede proceder, virtualmente, de cualquier fuente: animales, vegetales, microbios o síntesis. Sea cual sea, puede introducirse en especies bacterianas, hongos, células vegetales, células animales o incluso en las propias plantas y animales; las posibilidades parecen ilimitadas (Walter & Gingold, 1997).

Conocidos estos procesos se fue profundizando más y más en lo que se ha denominado tecnología del DNA recombinante o ingeniería genética. Se refiere ésta a la reunión artificial de moléculas de DNA o de partes de estas moléculas que no se encuentran juntas en la naturaleza. Este tipo de tecnología se está utilizando actualmente para producir medicinas, leche, e incluso, parte de la comida de los supermercados 2.

Desarrollo del Tema:

Para poder realizar el trabajo de DNA recombinante, los científicos deben tener segmentos de DNA que sean lo suficientemente pequeños para ser analizados y manipulados, tener grandes cantidades de estos pequeños segmentos, conocer la secuencia de nucleótidos en los segmentos, y ser capaz de identificar los segmentos que interesan. No representan cuatro pasos consecutivos. El orden en que estos trabajos se desarrollan depende de los objetivos de un determinado proyecto. En algunos casos, por ejemplo, los científicos conocen de antemano las secuencias de los nucleótidos en que están interesados y donde hay que buscarlas. En otros casos, el objetivo es descifrar las secuencias y determinar el lugar que ocupan en el cromosoma (Curtis & Barnes,

1997).

Obtención de segmentos cortos de DNA

Durante los estudios que se llevaron a cabo con los bacteriófago, se encontró algo desconcertante: los virus que infectaban una cepa de *E. coli* eran incapaces de infectar otras cepas. Esta restricción en la infección vírica se encontró a que se debía a la presencia en la bacteria de enzimas que cortaban las moléculas de DNA extrañas en fragmentos pequeños antes de que pudieran replicarse o transcribirse. Estas enzimas se llamaron enzimas de restricción.

Estas enzimas cortan el DNA extraño por unas secuencias específicas de nucleótidos, generalmente constituidas por cuatro u ocho pares de bases. Estas secuencias se conocen como secuencia de reconocimiento, el cromosoma bacteriano mismo contiene esta secuencia químicamente modificada para protegerla de las enzimas de restricción. Algunas enzimas de restricción producen un corte recto, perpendicular a las dos cadenas de la molécula de DNA. Otras en cambio cortan la cadena por lugares separados por varios nucleótidos. Como resultado, aparecen pequeñas secuencias de nucleótidos desaparejados a cada lado del corte. Estos extremos se llaman pegajosos puesto que pueden unirse de nuevo cuando se restablecen los puentes de hidrogeno espontáneamente entre las bases complementarias. Para cerrar el proceso de sellado de las dos cadenas se necesita un tipo de enzima llamada DNA ligasa, que cataliza la reacción de enlace entre los dos extremos de cada cadena. Se han aislado hasta la fecha mas de 200 enzimas de restricción, a partir de distintas bacterias. Esto a permitido cortar las moléculas de DNA siguiendo mas de 90 secuencias de reconocimiento. Gracias a la utilización de distintas enzimas de restricción que cortan por secuencias de reconocimientos distintas, las moléculas de DNA de casi cualquier organismo puede ser troceado en fragmentos suficientemente cortos para analizarlos y manipularlos. Estos segmentos pueden separarse por tamaños usando la técnica de electroforesis.

Corte específico del ADN: en fragmentos pequeños y manejables mediante la utilización de un tipo de enzimas conocidas como **enzimas de restricción** que pueden considerarse como las "tijeras moleculares". Estas enzimas se aislaron en bacterias y se identifican con distintos nombres, siendo lo característico de ellas estos dos principios:

- Cada enzima de restricción **reconoce una secuencia específica** de nucleótidos y corta en ese punto **cada una** de las cadenas de ADN.
- Los extremos libres que quedan se llaman **extremos pegajosos**, porque pueden unirse a otros fragmentos de ADN que hayan sido cortados por la misma enzima de restricción.

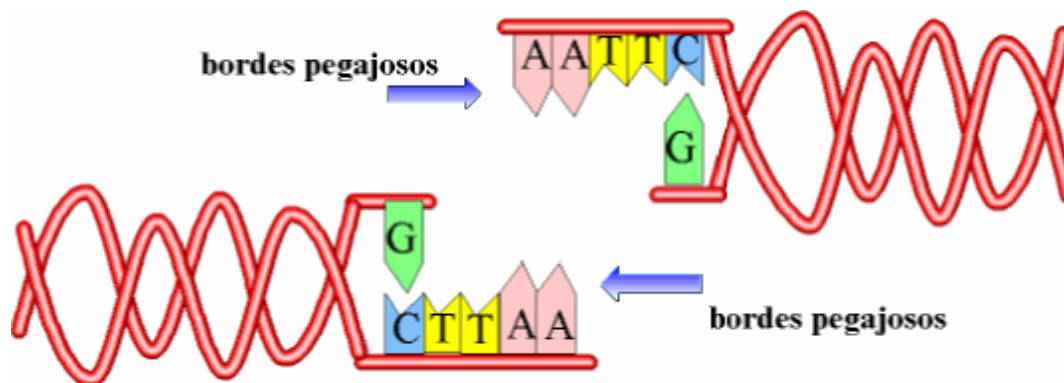


Fig. 2: esquema donde se ve el resultado de la actuación de la enzima de restricción.

Ha quedado rota la molécula de ADN, quedando unos bordes pegajosos por donde puede unirse este ADN, con otro aunque sea de una especie diferente. (Extraído de

<http://apuntes.rincondelvago.com/adnacido-desoxirribonucleico-recombinante.html>).

Obtención de copias repetitivas (clonación de DNA)

Desde hace tiempo se sabe que es factible la introducción de DNA en células de ciertas especies bacterianas para cambiar su constitución genética. Este proceso, denominado *transformación*, contribuyó a aclarar el papel del DNA como material genético pero no tenía una rígida limitación: el DNA debía proceder de la misma especie e integrarse en el cromosoma para ser operativo. Si queremos que el gen sea capaz de replicarse debe ser ligado a una molécula susceptible de multiplicación en una célula bacteriana. Esta molécula ha de poseer un origen de replicación bacteriano, esto es, la secuencia de DNA reconocida por las enzimas de la célula huésped como punto de iniciación de dicho proceso. Una especie bacteriana como *E. coli* jamás reconocerá un origen eucariótico y de ahí la necesidad de unir el DNA extraño a una molécula portadora de una secuencia que funcione como origen para el propio *E. coli*. Estas moléculas portadoras se denominan vectores (Walter & Gingold, 1997).

En la práctica, para trabajar con DNA recombinante hace falta disponer de muchísimas copias de los segmentos de DNA para usarlos en el estudio y manipulación. Una manera de obtener copias es tomar prestados los poderes replicativos de los Plásmidos y virus (Curtis & Barnes, 1997).

Los Plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico que se encuentran en muchas bacterias. Lo mismo que el cromosoma, son moléculas cerradas, circulares, si bien el tamaño es mas pequeño. A diferencia del cromosoma no son necesarias para la viabilidad general de la célula, aunque pueden transportar algunos genes, como los que confieren resistencia a antibióticos, que contribuyen a la supervivencia en condiciones especiales. Además algunos Plásmidos poseen la propiedad conocida como replicación relajada esto es, que se encuentran presentes en forma de muchas copias por célula. Estos Plásmidos multicopiados pueden ser convenientemente aislados y purificados, algo esencial para un vector de clonación.

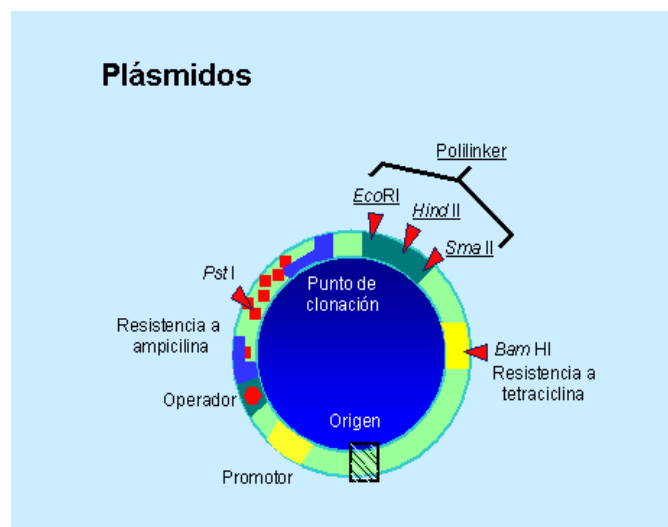


Fig. 1. Esquema general de un Plásmido.

La segunda clase de vector está constituida por los virus bacterianos o fagos. El DNA de un fago puede también evidentemente, replicarse dentro de la bacteria y originar muchas moléculas hijas (Walter & Gingold, 1997).

En consecuencia la clonación de ciertos organismos microscópicos consta de las siguientes etapas
(3) www.laguna.fmedic.unam.mx/evazquez/0403/adn.html

I. Cortar al ADN en posiciones precisas con endonucleasas de restricción que actúan como tijeras moleculares.

II. Unir los fragmentos obtenidos, proceso que hace naturalmente la ADN ligasa.

III. Seleccionar una pequeña molécula de ADN capaz de autoreplicarse. Esto se logra utilizando plásmidos o ADN virales (vectores de clonación). Las moléculas de ADN que están compuestas de material genético de diferentes fuentes se denominan ADN recombinantes.

IV. Insertar los vectores de clonación a células específicas que contienen toda la maquinaria genética para la expresión de la información contenida en el vector.

- Seleccionar o identificar a las células que contienen al ADN recombinante.

Fig. 3. esquema general de clonación de un plasmido.

Celula huésped

Una vez que el vector presente el gen de interés, se transfiere a la célula huésped. Un buen organismo huésped debe caracterizarse por:

- Poder crecer rápidamente.
- Hacerlo de manera barata.
- Que sea fácilmente manipulable.

Hay tres tipos de células huésped: bacterias, especialmente cepas de *Escherichia coli*, levaduras y ciertas células eucariotas como las líneas celulares derivadas de algún mamífero. Cada uno de estos tipos celulares tiene sus ventajas e inconvenientes. Las bacterias se caracterizan porque su material genético es muy simple, suelen crecer muy rápido y las condiciones de crecimiento son bastante sencillas. Su principal inconveniente es que no llevan a cabo algunas de las modificaciones que sí realizan las células eucariotas en las proteínas, por ejemplo la glicosilación. Las levaduras y las líneas celulares son más complicadas, especialmente estas últimas, no crecen tan rápido y suelen ser más difíciles de tratar. No obstante, la ventaja es que ambos sistemas pueden llevar a cabo modificaciones como las descritas anteriormente.

Discusión y conclusión:

Dentro de las aplicaciones de la tecnología de DNA recombinante podemos destacar las siguientes:

Cartografía de los genes humanos: es decir, definición de la posición de cada gen en su cromosoma respectivo. Con el desarrollo de la tecnología de DNA recombinante podemos asignar el hipotético gen que produce una enfermedad a un locus cromosómico específico. Para ello se han diseñado diferentes técnicas como RFLP e híbridos de células somáticas, entre otras.

Terapia génica: durante décadas se han utilizado algunos productos genéticos, como la insulina, para tratamientos terapéuticos. La terapia génica persigue modificar el genoma de las células somáticas para que produzcan cantidades adecuadas del producto génico normal. Para ello se usan vectores que portan los genes de interés al interior de las células u organismos. Tanto algunos tipos de cáncer como muchas enfermedades genéticas están hoy en estudio experimental de terapia génica.

Diagnóstico de enfermedades genéticas en niños y adultos: se han desarrollado actualmente pruebas muy fiables que junto con la amniocentesis, hacen posible una diagnosis prenatal de varias enfermedades genéticas, como la PKU, la anemia falciforme y las formas más comunes de hemofilia y distrofia muscular. Se ha preparado también una prueba para identificar aquellos individuos que tienen un mayor riesgo de contraer la corea de Huntington, todas estas pruebas utilizan enzimas de restricción, las sondas de ácidos nucleicos o ambas a la vez.

En esta línea de aplicaciones prácticas de los hallazgos genéticos, William Evans y Mary Relling, del Departamento de Ciencias Farmacéuticas del Hospital Infantil Saint Jude, en Memphis, Tennessee, han realizado un trabajo de revisión sobre el diseño de fármacos a medida o específicamente creados para las características genéticas de cada paciente. Evans y Relling indican que las diferencias genéticas entre las personas pueden provocar respuestas diferentes al mismo medicamento. En algunos casos, la eficacia del fármaco aumenta o disminuye, y en otros, incluso puede ser tóxico con determinadas dosis.

Los autores del trabajo ilustran con un ejemplo cómo la farmacogenómica puede marcar un cambio radical en el diseño tradicional del fármaco, para desarrollar medicamentos siempre seguros y eficaces. En el caso de la leucemia linfoblástica aguda, ya se sabe que los polimorfismos genéticos en los fármacos que metabolizan enzimas pueden actuar significativamente sobre la toxicidad y la eficacia de los medicamentos administrados; también se ha establecido que el genotipo de estos linfoblastos constituye una importante variable pronóstica, útil para guiar la intensidad del tratamiento.

Biotecnología: diversas compañías de biotecnología han utilizado las técnicas de DNA recombinante para desarrollar a escala industrial productos como hormonas, factores de coagulación, plantas resistentes a herbicidas, tomates mejorados en su sabor y aspecto, animales transgénicos que engordan más rápido y producen más carne. Actualmente se trabaja en vacunas, que a diferencia de las ya existentes (con virus muertos o atenuados), puedan ingerirse en vez de inyectarse. Serían baratas y se facilitaría su uso en países en vías de desarrollo. Son las denominadas vacunas de subunidad. Consisten en una o más proteínas de virus o de bacterias. La vacuna de la hepatitis B se basa en este modelo. (Tortora & Reynolds, 2002).

Medicina forense: en los EE.UU. las huellas moleculares del DNA se han utilizado desde 1988 con fines jurídicos. La técnica se basa en el análisis de las bandas producidas en un gel tras cortar el DNA de una muestra encontrada en el lugar del crimen (cabello, semen, tejido cutáneo o sangre) con una enzima de restricción. Se compara el patrón de bandas de esa muestra con el producido por la víctima y los posibles sospechosos. Si hay coincidencia, el asesino ha sido detectado. La probabilidad de que dos individuos escogidos al azar tengan el mismo patrón de bandas para un corte enzimático dado es menor de 1/1011.

Transferencia de genes entre células Eucariotas: la transferencia de genes entre células eucariotas es un proceso extremadamente complejo. Primero es necesario preparar el gen que ha de introducirse en un cromosoma y luego ha de expresarse. Pero esto solo es el comienzo. El nuevo gen debe introducirse en un número muy grande de células del tipo apropiado, y estar sujeto a los controles reguladores de un gen normal (Curtis & Barnes, 2000).

Es difícil enfatizar demasiado el impacto que el surgimiento de las técnicas de DNA recombinante ha tenido en la capacidad de generación de conocimiento y en la capacidad de manipulación de organismos vivos. Vivimos una época de acumulación de conocimientos sin precedente. Por mucho que los logros de aplicación práctica se hayan quedado cortos respecto a ciertas expectativas, nos encontramos cada día con más productos y procesos biotecnológicos inimaginables hace un par de décadas. El progreso paulatino observado en épocas pasadas, como por ejemplo el mejoramiento de procesos de fermentación, o de cepas productoras de antibióticos, de razas animales y variedades de plantas de cultivos, están siendo suplantados por progresos cualitativamente diferentes, que se hacen posibles por el nuevo conocimiento y herramientas de manipulación. Hoy día hablamos de plantas y animales transgénicos, expresión de proteínas humanas en bacterias, hongos y células de cultivo, terapia génica, ingeniería de vías metabólicas, diagnóstico a partir de cantidades minúsculas de material biológico, etc. ¿Cómo es que el DNA recombinante ha hecho esto posible? Los fundamentos básicos de esta metodología los conocemos muchos de nosotros. La conservación de la naturaleza química del material genético de todos los organismos vivos permitió que éste se pudiera combinar para formar moléculas híbridas. En consecuencia, se hizo finalmente posible aislar, caracterizar y manipular genes de cualquier especie. Un ejemplo como la clonación de un gene humano, digamos la hormona del crecimiento, su expresión en bacterias y su uso como tratamiento contra el enanismo, nos da una idea de lo que puede hacerse con estas herramientas. Pero es hoy día sólo la punta del iceberg. El cúmulo de

metodologías y conocimientos, que se potencian unos a otros, constituyen actualmente un verdadero arsenal de posibilidades. Incluso los especialistas se ven abrumados por la cantidad, calidad y originalidad de trabajos en los que se revelan importantes procesos biológicos. Las técnicas se emplean de las maneras más ingeniosas. Se emprenden proyectos cada vez más ambiciosos (Walter & Gingold, 1997).

Con respecto a la discusión que genera el tema la gente sigue preocupándose por los peligros de trabajar con DNA recombinante. Hay una preocupación inmediata y obvia de que genes de cáncer o de toxinas puedan escaparse del laboratorio. En otras palabras esta tecnología puede crear una bacteria o un plasmido modificados podrían infectar accidentalmente a la gente. La comunidad medica esta mostrando una extrema precaución en el uso de la tecnología del DNA recombinante para el tratamiento de personas. Sin embargo ahora ha resurgido una nueva discusión entre la libertad académica y el secreto industrial. Parece que esta tecnología es muy lucrativa. Sin embargo, las filosofías de la empresa privada y la universidad están en conflicto. Los esfuerzos académicos se hacen presumiblemente en forma abierta con intercambio libre de información entre los colegas, mientras que la empresa privada impone cierto grado de secretismo por lo menos hasta que hayan obtenido las patentes para proteger las inversiones de las empresas. No esta claro cual será el resultado de estos conflictos para las instituciones de investigación americanas e internacionales (Curtis & Barnes, 2000).

Bibliografía:

Curtis, H. & Barnes (1997) Invitación a la biología. Editorial medica panamericana. 5º edición, capítulo 18. Pág. 301 –316.

Grace, E. (1998) La biotecnología al desnudo. Promesas y realidades. Editorial Anagrama, S.A. España.

Tortora, G. & Reynolds, S. (2002) Principios de la Anatomía y Fisiología. Editorial Harcourt S.A. 7º edición. España.

Walter J.M. & Gingold E.B. (1997) Biología molecular y biotecnología. Editorial Acribia, S.A. Segunda edición. España. Capítulo 2. Pág. 23 – 52.

Fuentes de Internet:

<http://apuntes.rincondelvago.com/adnacido-desoxirribonucleico-recombinante.html>

www.laguna.fmedic.unam.mx/evazquez/0403/adn.html

http://biotec.amgen.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/amgen/pak_biotec.muestradoc?p_item=8

<http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403dna%20recombinante.html>