

Infectologika revisiones

Aplicaciones de la ingeniería genética en la medicina

D. Ramón-Vidal, J.B. Salom Sanvalero*,
S. Ferrer Soler, E. Vicente Pedrós
y F. Uruburu Fernández

PALABRAS CLAVE:

Ingeniería genética, clonación, DNA recombinante, diagnóstico genético, terapia genética.

En ocasiones, el curso de los acontecimientos humanos puede parecerse al de los ríos. Un río serpentea, recoge pequeños arroyos, se ensancha y finalmente se une a otro para formar uno más poderoso e importante. De manera similar, la confluencia de dos grandes ciencias, la genética y la bioquímica, ha originado en los últimos diez años la aparición de una nueva y poderosa tecnología: la ingeniería genética (1).

La aplicación de las técnicas del DNA recombinante en la medicina ofrece unas perspectivas impresionantes, tanto desde el punto de vista del diagnóstico y terapia de enfermedades genéticas, como desde el de la obtención de metabolitos con interés farmacológico (2-4).

A lo largo de este artículo vamos a analizar en primer lugar las bases teóricas de la clonación molecular, para posteriormente estudiar algunas de sus aplicaciones en el campo de la medicina.

Introducción

Al empezar a hablar de ingeniería genética es

Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Literaria de Valencia. Unidad de Circulación Cerebral. Centro de Investigaciones del Hospital «La Fe». Valencia.

importante dar una definición de la misma. Tal vez la más sencilla y clara de todas sea la que entiende por ingeniería genética la introducción de una planificación humana en la formación de nuevos genes y nuevas combinaciones de genes.

De esta definición se deduce que el objetivo principal de esta tecnología es la clonación de un gen o grupo de genes. Esto consistirá simplemente en extraer a partir de una célula donadora el gen deseado e introducirlo en una célula receptora (Fig. 1). Ahora bien, si se lleva a cabo esta experiencia se observa que el DNA exógeno que penetra en la célula receptora se expresa con una eficiencia bajísima, pudiendo decirse que prácticamente no es introducido o, si lo es, resulta degradado en su mayor parte.

¿Cómo clonar pues? Para ello hay que buscar algo que, ligado al gen que se desea clonar, sea capaz de penetrar en el citoplasma de la célula receptora y proteger al DNA exógeno de la degradación. Ese «algo» son los vectores de clonación.

¿Cómo ligar el gen a clonar con su vector? Para ello simplemente se precisa del concurso de una serie de enzimas implicados en el metabolismo del DNA. Con todo ello el esquema de una típica experiencia de ingeniería genética se completa algo más (Fig. 2).

Vectores de clonación

Un vector de clonación es un DNA de doble

D. Ramón-Vidal y cols.

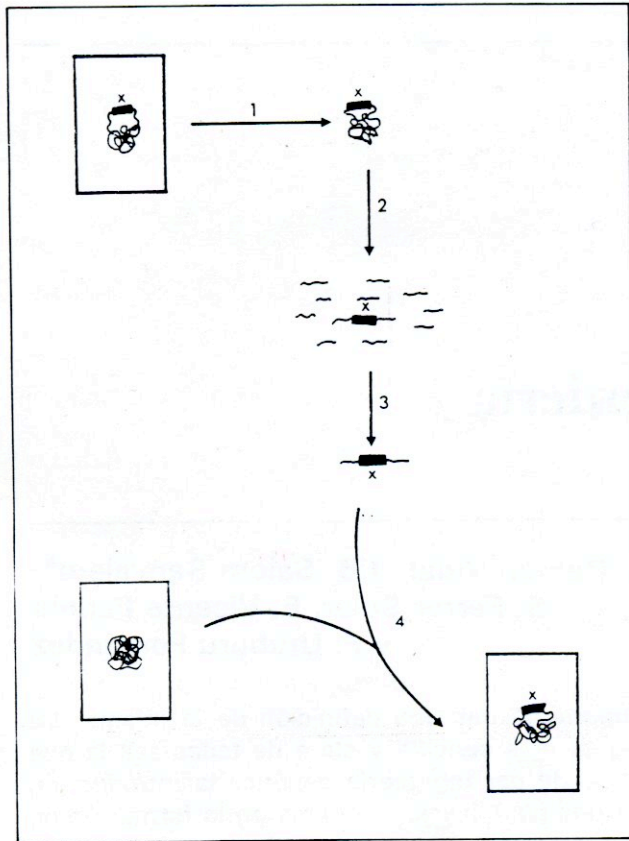


Figura 1. De una célula donadora se extrae el DNA (1) y se fragmenta (2). Del conjunto de fragmentos resultantes se escoge el que porta el gen que se desea clonar (3), en este caso el gen «x», y se introduce en el interior de una célula receptora (4).

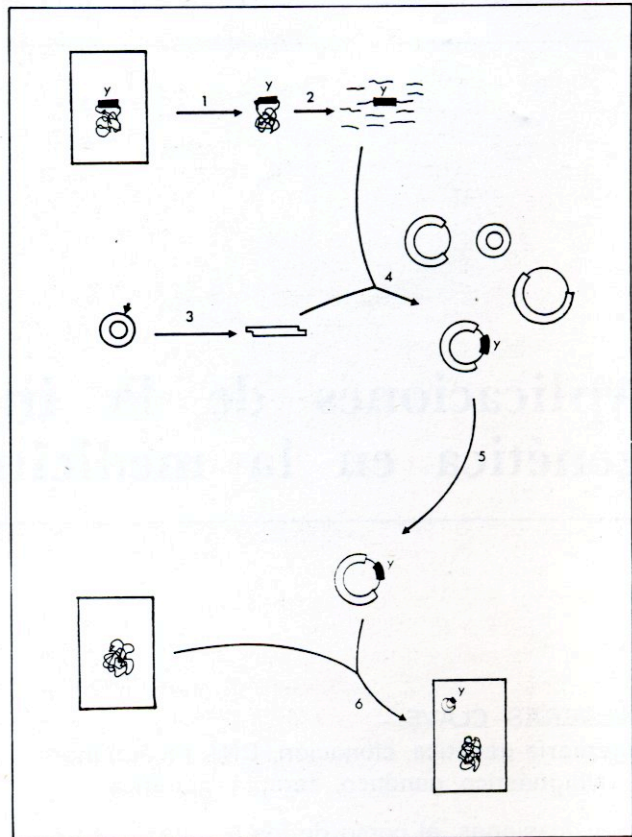


Figura 2. De una célula donadora se extrae el DNA (1) y se fragmenta (2). Por otra parte, se fragmenta el vector de clonación (3). Se ponen en contacto vector y fragmentos del DNA (4), produciéndose una serie de DNAs recombinantes. De todos ellos se escoge el que porta el gen a clonar (5), en este caso el gen «y», y se introduce en el interior de una célula receptora (6).

cadena en el que se inserta el gen que se desea clonar (5). Debe cumplir las siguientes propiedades:

- a) Ser capaz de penetrar la membrana citoplasmática.
- b) Ser estable en el citoplasma o, lo que es lo mismo, portar un origen de replicación que le permita independizarse del núcleo.
- c) Estar relacionado con el DNA de la célula receptora para no ser degradado.
- d) Contener algún gen que le confiera características fenotípicas que permitan seleccionar fácilmente las células receptoras que lo posean.

Fundamentalmente se utilizan como vectores de clonación los plásmidos y los virus, aunque últimamente se han desarrollado dos nuevos tipos de vectores basados en los anteriores: los cósmidos y los fásmidos.

1. Plásmidos

Son determinantes hereditarios extracromosómicos que se multiplican autónomamente al poseer un origen de replicación propio. Ello conlleva el que puedan ser heredados por la progenie de una forma estable.

Se ha descrito su presencia tanto en procariontas como en eucariotas. Se trata de moléculas de DNA circular covalentemente cerrado, pudiendo variar mucho su tamaño (se han encontrado plásmidos con tamaños desde 1 a 200 Kpb). El número de plásmidos por célula está en función directa del peso molecular del mismo, de forma que de un plásmido con bajo peso molecular pueden haber de 50 a 100 copias por célula. Si el peso molecular es alto el número de

Aplicaciones de la ingeniería genética en la medicina

copias por célula varía de 1 a 5.

La información genética que contienen es muy variada y puede ir desde funciones biológicas (factor F de sexualidad bacteriana) hasta la utilización de sustratos especiales (degradación del tolueno). Tal vez la más importante desde el punto de vista médico y de la manipulación genética sea el conferir resistencia a determinadas drogas antimicrobianas.

No todos los plásmidos pueden ser utilizados como vectores de clonación. Para ello deben cumplir los siguientes requisitos:

a) Poseer un bajo peso molecular. Ello da lugar a que estén en mayor número por célula, además de ser más fáciles de manejar y purificar en el laboratorio.

b) Conferir un fenotipo fácilmente seleccionable, tal como la resistencia a un antibiótico o la utilización de sustancias poco comunes como fuentes de carbono. Ello permite en los medios adecuados (adicionados del antibiótico o suplementados con la fuente de carbono) distinguir los clones portadores del plásmido de los que no lo son (Fig. 3).

c) Poderse aumentar artificialmente el número de copias por célula. Esto se puede lograr mediante tratamientos con antibióticos que detengan la síntesis proteica (cloramfenicol o espectinomycin) pudiéndose alcanzar de 1.000 a 3.000 copias del plásmido por célula; proceso que se conoce con el nombre de amplificación.

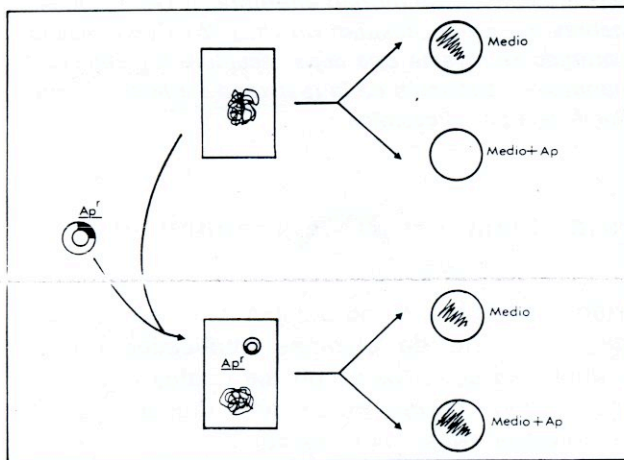


Figura 3. Una célula carente de plásmido es incapaz de crecer en medio con ampicilina. Por el contrario, cuando se le introduce un plásmido portador del gen que codifica resistencia puede crecer en medio con ampicilina.

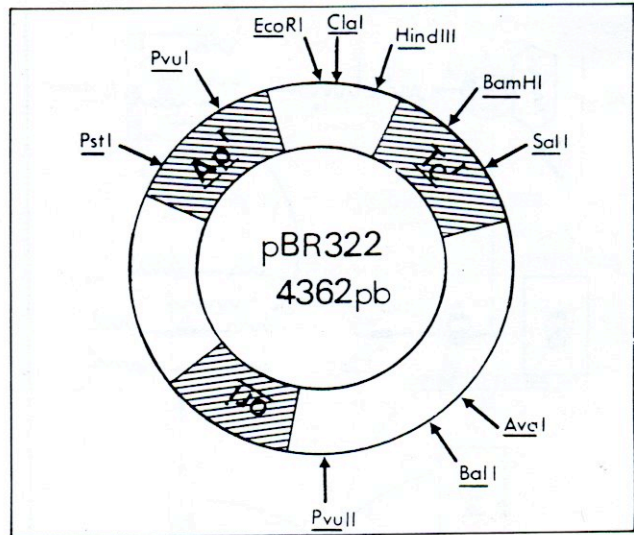


Figura 4. Mapa físico del pBR322. Se presentan los puntos de corte para diferentes enzimas de restricción.

El plásmido modelo en ingeniería genética es pBR322 (Fig. 4). Construido de forma artificial en el laboratorio (6), su bajo peso molecular (4362 pb) unido a la posesión de genes que codifican resistencias a ampicilina y tetraciclina y al hecho de poderse amplificar fácilmente en cultivo hacen de él un vector de clonación idóneo.

2. Virus

La utilización de un virus como vector de clonación hace uso de una sencilla estrategia que consiste en aislar el DNA del virus en cuestión y ligarle el gen a clonar. El DNA recombinante así formado se encapsula «in vitro», y con los viriones obtenidos se infecta a las células receptoras. (Fig. 5).

Al igual que ocurre con los plásmidos, hay también virus preferidos para su manejo como vectores de clonación. Tal es el caso del fago λ cuando la célula receptora es procarionta o del virus SV40 para células receptoras de mamífero (7).

3. Cósmidos y fásmidos

Los cósmidos son vectores especialmente diseñados para clonar fragmentos grandes de DNA eucariótico, por ejemplo la α-2 colágeno de pollo con 38 Kpb. Estos fragmentos por su tamaño no pueden ser clonados en plásmidos o virus.

Un cósmido no es más que un plásmido al que se le han ligado las secuencias cos del fago

D. Ramón-Vidal y cols.

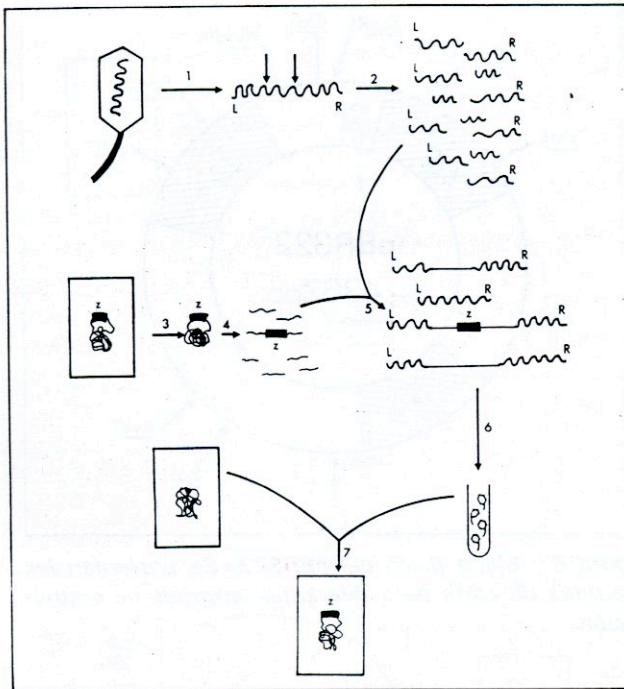


Figura 5. El DNA del fago (1) se fragmenta (2). Por otra parte, de una célula donadora se extrae el DNA (3) y se fragmenta (4). Ambos DNAs se ponen en contacto (5), formándose DNAs recombinantes entre los fragmentos correspondientes al extremo izquierdo (L) y derecho (R) del DNA de y el DNA a clonar. Con todos ellos se realiza una encapsulación «in vitro» (6). Con el lisado se infecta un cultivo de células receptoras (7), introduciéndose de esta forma en el interior de las mismas el DNA exógeno.

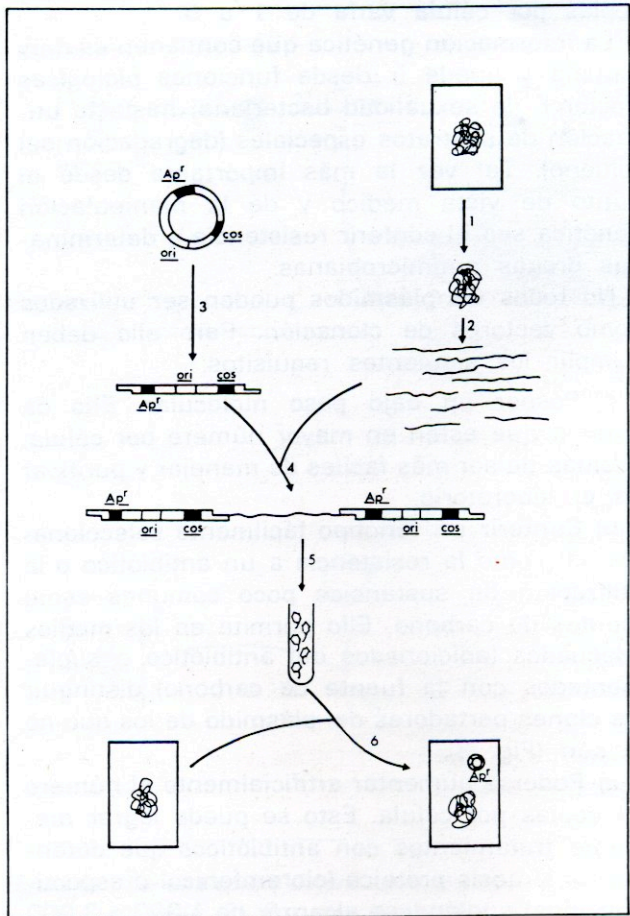


Figura 6. El DNA de la célula donadora se extrae (1) y se fragmenta (2). Un cósmido que codifica resistencia a ampicilina se fragmenta con el mismo enzima de restricción (3) y las dos muestras de DNA se ponen en contacto (4). Se forman diferentes DNAs recombinantes que se encapsulan «in vitro» (5). Con el lisado obtenido se inyecta una cepa receptora (6), seleccionándose la aparición de la resistencia a la ampicilina codificada por el cósmido.

λ. Con ello puede aceptar hasta 45 Kpb de información genética exógena. El encapsulamiento «in vitro» posterior, seguido de la infección en *Escherichia coli* permite clonar dichos genes (Fig. 6).

Un fásmido es el DNA de un fago al cual se le ha insertado un origen de replicación proveniente de un plásmido. Con ello, al producirse la infección se puede lograr el ciclo lisogénico sin necesidad de que el virus se integre en el cromosoma de la célula receptora. Su utilidad en ingeniería genética es, hoy por hoy, muy limitada.

¿Cuándo utilizar uno u otro vector? Depende de las circunstancias. Si lo que se desea es clonar fragmentos de bajo peso molecular los plásmidos son idóneos. Si los fragmentos a clonar son de alto peso molecular pueden utilizarse fagos o cósmidos, según el tamaño.

Enzimología del DNA recombinante

Las técnicas de la ingeniería genética no serían realizables de no ser por la existencia de toda una serie de enzimas implicados en el metabolismo del DNA y con los cuales el investigador puede cortar, modificar y unir los genes de la forma más conveniente.

Entre todos estos enzimas destacan las endonucleasas de restricción. Se trata de enzimas bacterianos que reconocen secuencias de nucleótidos en el DNA. Las secuencias reconocidas son palindrómicas y suelen estar formadas

Aplicaciones de la ingeniería genética en la medicina

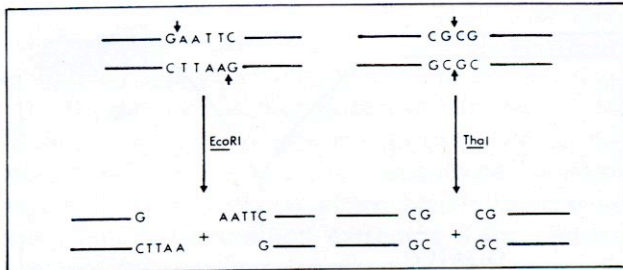


Figura 7. A la izquierda de la figura, un fragmento de DNA que contiene una secuencia de reconocimiento para Eco RI. Su digestión con dicho enzima rinde dos fragmentos de extremos cohesivos. A la derecha, otro fragmento de DNA que contiene en este caso la secuencia de reconocimiento para Tha I. Su digestión rinde también dos fragmentos, pero de extremos romos.

por cuatro o seis pares de bases. El enzima corta el DNA en el centro o en el extremo de la secuencia, generando respectivamente fragmentos romos o cohesivos (Fig. 7).

¿Cuál es la utilidad de estos enzimas? Evidentemente el poder unir DNAs de diferentes orígenes tratados con el mismo enzima de restricción, ya que sus extremos cohesivos presentan complementariedad de bases (Fig. 8).

Otro enzima básico a la hora de unir DNAs de

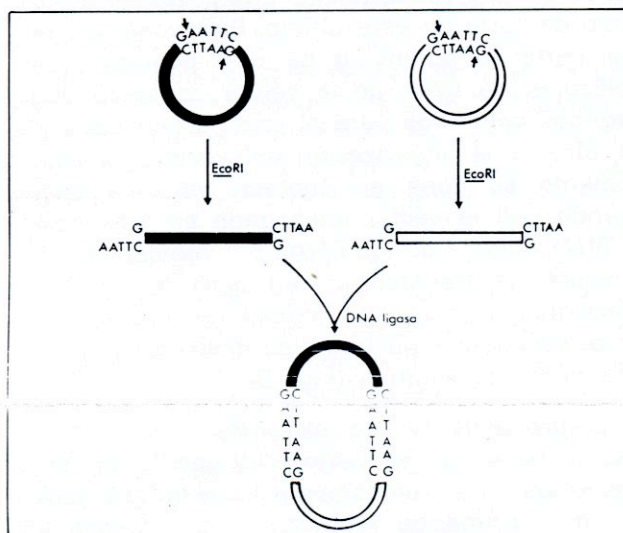


Figura 8. Dos DNAs de diferente origen presentan una única secuencia de reconocimiento para Eco RI. Al someterlos a digestión con dicho enzima, se forman dos fragmentos lineales de extremos cohesivos. Al poner ambas muestras en contacto en presencia de DNA ligasa la complementariedad de bases favorece la formación del DNA recombinante entre ambos.

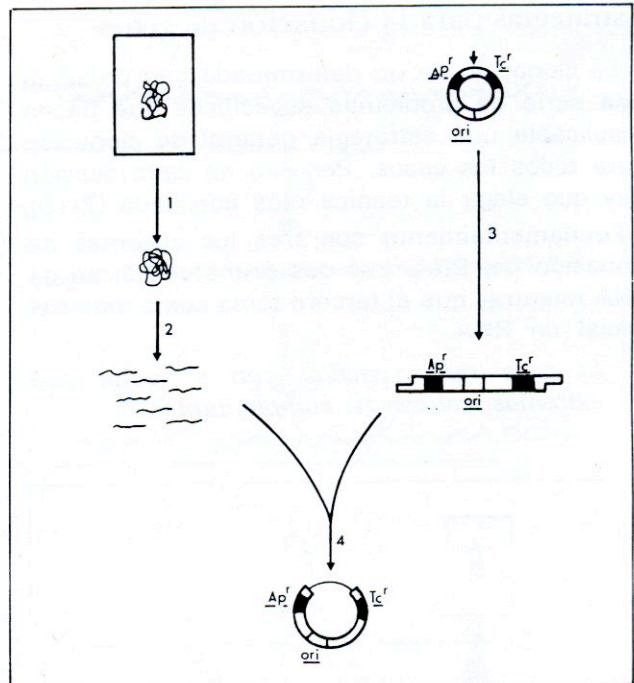


Figura 9. De una célula donadora se extrae su DNA (1) y se digiere con un enzima de restricción (2). Por otra parte, el vector, en este caso un plásmido que confiere resistencia a ampicilina y tetraciclina, se digiere con el mismo enzima (3). El DNA y el vector digeridos se ponen en contacto en presencia de DNA ligasa (4), formándose los DNAs recombinantes. Posteriormente se transformará con los mismos una cepa receptora, seleccionándose la aparición de resistencia a los dos antibióticos codificada por el plásmido.

diferentes orígenes es la DNA ligasa (Fig. 8). Este enzima cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre un extremo 3'OH y un 5'fosfato adyacentes en el DNA. Mediante su actuación se consigue la unión de los extremos complementarios aparecidos tras la incubación del DNA con un enzima de restricción e incluso, bajo ciertas condiciones de ensayo, la DNA ligasa puede unir extremos romos.

A veces es interesante añadir a un fragmento de DNA una secuencia repetida de un determinado nucleótido. Para ello se emplea el enzima terminal transferasa, el cual cataliza la adición de desoxinucleótidos al extremo 3'OH terminal de las moléculas de DNA.

La lista de los enzimas más utilizados en ingeniería genética quedaría incompleta si no hablásemos de la transcriptasa inversa. Este enzima cataliza la síntesis de DNA tomando como molde una molécula de RNA.

D. Ramón-Vidal y cols.

Estrategias para la clonación de genes

La clonación de un determinado gen presenta una serie de problemas específicos que hacen inaplicable una estrategia general de clonación para todos los casos. Por ello en cada ocasión hay que elegir la técnica más adecuada (7-10).

Fundamentalmente son tres los sistemas de clonación del DNA. Los dos primeros parten de DNA mientras que el tercero toma como material inicial un RNA.

1. El caso más sencillo: gen y vector con extremos cohesivos complementarios

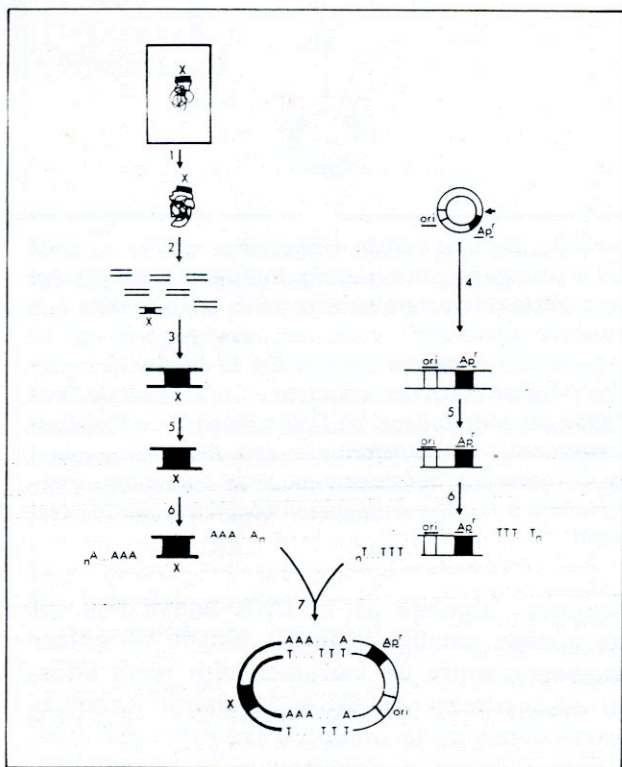


Figura 10. De una célula donadora se extrae su DNA (1) y se corta (2). De entre todos los fragmentos se selecciona el que porta el gen a clonar, en este caso el gen «x» (3). El vector de clonación también se fragmenta (4). A ambas muestras, gen a clonar y vector, se las trata con exonucleasa del fago (5) para obtener pequeños extremos de cadena sencilla. A continuación se añade como fuente de nucleótidos adenina a la muestra del gen y el nucleótido complementario, en este caso la timidina, a la muestra del vector. Se hace actuar la terminal transferasa (6), que añade una cola poli (A) al gen y una poli (T) al vector. Ambas muestras se ponen en contacto con DNA ligasa (7) y, gracias a la complementariedad adenina-timina, se produce el DNA recombinante.

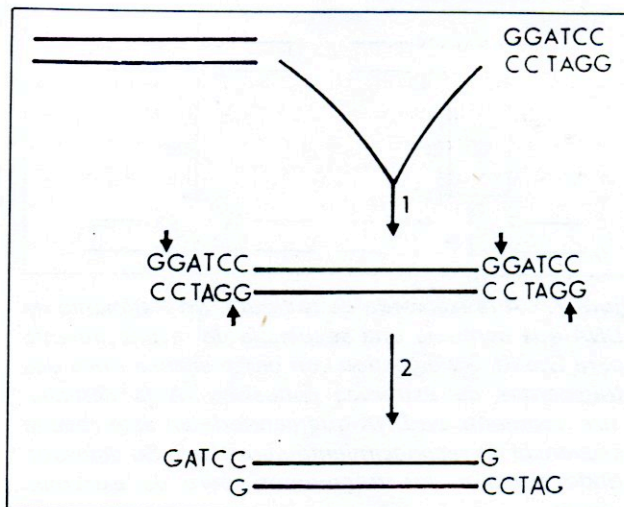


Figura 11. Un prendedor con la secuencia de reconocimiento de Eco RI se pone en contacto con el DNA a clonar en presencia de DNA ligasa (1). A ambos extremos del DNA a clonar se unen prendedores, de forma que la digestión de ese nuevo DNA con Eco RI (2) rinde un DNA de extremos complementarios.

En esta primera estrategia de clonación hay que partir del aislamiento del DNA total de la célula donadora. A continuación se digiere por separado tanto este DNA total como el vector con un enzima de restricción que posea un único punto de corte en este último. Esto conlleva por una parte la obtención de una población de moléculas de DNA de la célula donadora con extremos cohesivos para el enzima empleado y, por otra, a la linearización del vector. En este momento se pone en contacto el DNA total digerido con el vector linearizado en presencia de DNA ligasa. Con los DNAs recombinantes así formados se transforma una cepa bacteriana, seleccionando para los marcadores codificados por el vector que no han sido destruidos por el tratamiento enzimático (Fig. 9).

2. El problema de los extremos romos

¿Qué hacer si el vector, el gen o ambos poseen extremos romos como fruto de la actuación del enzima de restricción? La solución a este problema puede venir por diferentes vías.

En primer lugar se puede intentar la unión directa de vector y gen. Para ello es necesario trabajar con altas concentraciones de vector, gen y DNA ligasa, así como reforzar la actuación de esta última mediante la adición de RNA ligasa. Este protocolo presenta una eficiencia muy baja

Aplicaciones de la ingeniería genética en la medicina

y un alto costo, por lo que no es aconsejable.

Un método mucho más utilizado se apoya en el empleo del enzima terminal transferasa (Fig. 10). El protocolo comienza con el tratamiento del DNA de extremos romos con la exonucleasa del fago λ a tiempos cortos, con lo cual se eliminan algunos nucleótidos en el extremo 5'romo y se logra obtener pequeños extremos 3' de cadena sencilla. Sobre estos extremos de cadena sencilla ya puede actuar la terminal transferasa. Todo consiste en suministrar como sustrato de la terminal transferasa un determinado nucleótido para el DNA del gen a clonar y su complementario para el vector. Una vez el homopolímero alcanza una longitud de unos 20 nucleótidos se detiene la reacción. Nos encontramos pues ya con dos DNAs, vector y gen, de extremos complementarios, los cuales pueden unirse tal y como se ha descrito en el apartado anterior.

Aún existe una tercera vía de solución para el problema que toma como base el empleo de prendedores. Se trata de secuencias de nucleótidos sintetizadas químicamente y que son dianas de corte para diferentes enzimas de restricción. Mediante el empleo de DNA ligasa a altas concentraciones se unen a DNAs de extremos romos, digiriéndose con el enzima de restricción para el cual son diana. De esta forma se obtiene un DNA de extremos cohesivos (Fig. 11).

3. Clonaje a partir de RNAs mensajeros: el método de la transcriptasa inversa

Consideremos el caso de la clonación de un gen eucariótico. ¿Podrían aplicarse las técnicas descritas anteriormente? La respuesta a esta pregunta es sencilla: tan sólo en el caso de que el gen en cuestión no presente intrones. Desgraciadamente esto no es lo habitual, constituyendo los intrones un problema para la expresión en bacterias de los genes eucariotas clonados. Entonces se hace preciso el acudir a la búsqueda de RNAs mensajeros maduros, en los cuales los intrones han sido eliminados.

Para aislar el RNA mensajero correspondiente al gen que deseamos clonar hay que recurrir a la fuente biológica natural apropiada. Por ejemplo, para clonar el gen de la insulina obtendremos el RNA mensajero a partir de células pancreáticas, ya que en este tipo celular el RNA mensajero de la insulina representa un alto porcentaje del RNA mensajeron total.

Como los RNAs mensajeros eucariotas poseen una cola de polidesoxiadenina de unos 200 nucleótidos es fácil aislarlos mediante una cro-

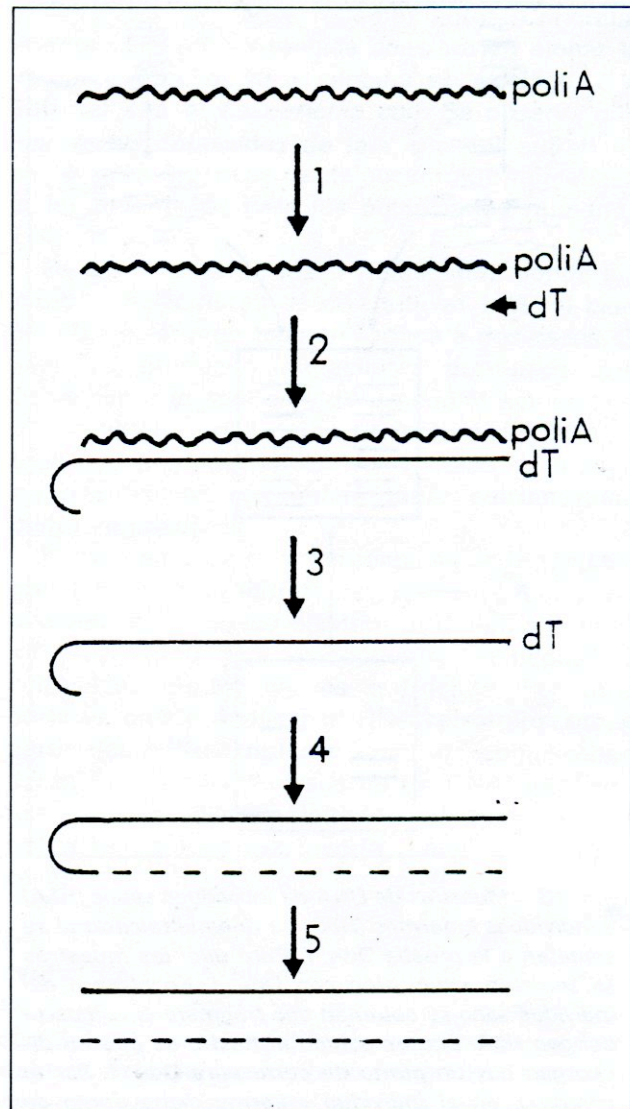


Figura 12. Al RNA mensajero del gen a clonar se le añade un cebador en forma de una pequeña cola de poli (T) (1). A partir del pequeño híbrido DNA-RNA comienza la síntesis por parte de la transcriptasa inversa del DNA copia del RNA mensajero (2). Del híbrido DNA-RNA formado se elimina la hebra de RNA por una hidrólisis alcalina (3), para posteriormente sintetizarse una hebra de DNA complementario al DNA copia (4). El codo formado por la actuación de la transcriptasa inversa se elimina por tratamiento con nucleasa S1 (5).

matografía de oligo (dT) celulosa. A partir de aquí se puede construir una copia en DNA de este RNA mensajero maduro aislado, simplemente mediante la acción de la transcriptasa inversa.

La reacción comienza con la adición al RNA mensajero de una pequeña molécula de unas 15

D. Ramón-Vidal y cols.

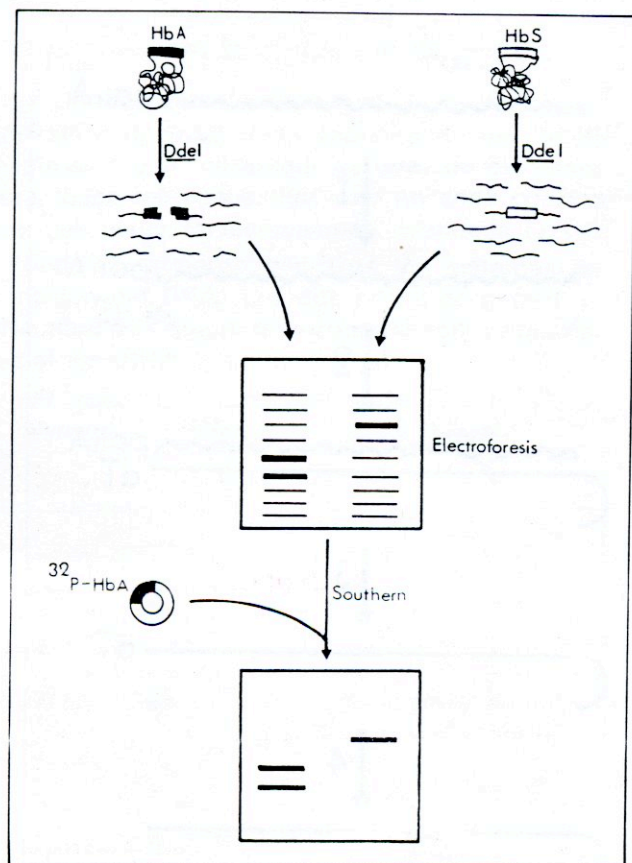


Figura 13. Muestras de DNA de individuos sanos (HbA) e individuos enfermos (HbS) de anemia falciforme se someten a la prueba Dde. I. Para ello, las muestras se someten a digestión con Dde. I. En el caso del individuo sano se obtienen dos fragmentos con parte del gen HbA. Ello es debido al hecho de que en dicho gen hay un punto de corte para Dde. I. Por el contrario, en el individuo enfermo dicho punto de corte ha desaparecido por la mutación y se obtiene un único fragmento. Una electroforesis nos permitirá separar los fragmentos de digestión merced a su tamaño. Cuando posteriormente hibridamos con el gen salvaje marcado radiactivamente, nos aparecerán dos bandas correspondientes a los dos fragmentos en el individuo sano y una única banda en el enfermo.

desoxitimidinas, la cual se hibrida con la cola poli (A). Esta pequeña estructura de cadena doble sirve como cebador a la transcriptasa inversa, que a partir de ahí, y tomando como molde el RNA mensajero, sintetizará una cadena de DNA complementaria. Se forma así un híbrido DNA-RNA.

A continuación se realiza una hidrólisis alcalina que elimina el RNA del híbrido. Sobre el DNA monocatenario resultante se hace actuar o

bien una DNA polimerasa o a la misma transcriptasa inversa, la cual, en virtud de su actividad DNA polimerasa DNA dependiente, es capaz de sintetizar la hebra de DNA complementaria. El único problema llegado este punto es la existencia de un codo de DNA de cadena sencilla producido por la actuación de la transcriptasa inversa. Este puede eliminarse fácilmente mediante la actuación de la nucleasa S1, la cual puede degradar selectivamente DNA de simple cadena (Fig. 12). Con todo se logra la construcción de un DNA copia, apropiado para clonar mediante las técnicas descritas anteriormente.

No obstante debemos tener en cuenta que nuestra población de DNAs no es pura tal y como la hemos obtenido. En todo caso, habiendo recurrido al tejido adecuado como fuente, el DNA a clonar se encontrará en proporción mayoritaria. Se hace pues necesario un proceso de selección de los clones deseados.

Diagnóstico de enfermedades hereditarias mediante técnicas de clonación molecular

Hay descritas cerca de 500 enfermedades hereditarias producidas por mutaciones recesivas. Las técnicas de ingeniería genética han servido para diagnosticar algunas de ellas.

1. Defectos en las globinas sanguíneas

La anemia falciforme surge como consecuencia de una mutación puntual en el gen que codifica para la cadena β de la hemoglobina. En concreto, la mutación consiste en el cambio de un triplete GAG por otro GTG. Esto conlleva en la proteína a un cambio de un resto de ácido glutámico por otro de valina.

Las técnicas de restricción «in vitro» del DNA nos permiten detectar estos mínimos cambios moleculares y establecerlos como base de la enfermedad que desencadenan. Concretamente, en el caso mencionado, la mutación de A a T supone la pérdida de un sitio de reconocimiento para el enzima de restricción Dde. I (11). La prueba consiste en tomar DNA presuntamente mutado y digerirlo con Dde. I. La muestra de DNA serán dos bandas de hibridación, ya que Dde. I los fragmentos. Posteriormente, se hibrida con un plásmido marcado radioactivamente que lleva clonado el gen salvaje de la β -globina. Si el DNA no contiene la mutación falciforme aparecerán dos bandas de hibridación ya que DdeI

Aplicaciones de la ingeniería genética en la medicina

corta en un punto al gen β -globina. Si el DNA, por el contrario, contiene la mutación rendirá una única banda ya que el paso de A a T destruye la secuencia de reconocimiento para *Dde. I* (Fig. 13).

Si bien la prueba *Dde. I* fue la primera utilizada en los laboratorios de biología molecular, no es muy adecuada para los análisis rutinarios que deben realizarse en el laboratorio de un hospital. Esto es debido a que *Dde. I* reconoce una secuencia relativamente corta (CTNAG), dando lugar a demasiados puntos de corte con lo cual se dificulta la separación e identificación por electroforesis de los fragmentos resultantes. Por suerte, existe hoy en día una alternativa más conveniente, la prueba *Mst. II* (12). Este enzima reconoce una secuencia más larga (CCTNAGG), rindiendo menos fragmentos y de tamaño más grande, con lo que su separación e identificación es mucho más fácil y clara.

Otra mutación que afecta a la β -globina es la denominada Hb OArab. Esta consiste en una sustitución del aminoácido en posición 121 de la cadena proteica, lo que da lugar a la pérdida de un sitio de reconocimiento por el enzima *EcoRI*, con lo cual se puede llevar a cabo una prueba de hibridación similar a las anteriormente descritas (13).

Con el nombre genérico de talasemias se designan a todos aquellos estados patológicos en los cuales un individuo muestra escasos o nulos niveles de alguno de los polipéptidos de globina. La gran cantidad de estudios moleculares sobre los mecanismos de biosíntesis de la hemoglobina nos han permitido conocer que sus polipéptidos componentes están codificados en dos grupos génicos: los genes α sobre el brazo corto del cromosoma 10 y los genes β sobre el brazo corto del cromosoma 11.

El estudio de las α -talasemias ha revelado algunas características sorprendentes del genoma humano. Normalmente los genes de la α -globina se encuentran duplicados y ligados físicamente en un espacio de tan sólo 4 Kpb. Algunos individuos afectados por esta enfermedad presentan un cromosoma con una copia simple de la secuencia α -globina, situación originada probablemente por un entrecruzamiento desigual dentro de la región α -globina. A esta conclusión se ha llegado por los datos conseguidos al observar con el microscopio electrónico genes clonados de la α -globina, además de una aproximación ingeniosa consistente en la

propagación de fagos recombinantes. Concretamente esta última técnica consiste en clonar la región génica de la α -globina en un fago λ e infectar con él *Escherichia coli*. Se observa que los genes duplicados de la α -globina sufren en la bacteria procesos de delección que mimetizan a los postulados para las poblaciones humanas (14).

Es en el caso de las β -talasemias donde las causas moleculares se diversifican más, si bien en último término todo se reduce a dos casos. O bien se producen mutaciones puntuales que conducen a la aparición de un codón sin sentido o un cambio en la pauta de lectura del DNA, o bien se producen delecciones más o menos importantes en los genes tanto estructurales como reguladores.

Se han empleado varias técnicas de ingeniería genética para descifrar las anomalías del DNA talasémico. Se puede secuenciar directamente el mRNA mutante que se encuentra en pequeñas cantidades dentro de los eritrocitos. Por otra parte se puede analizar el DNA retrotranscrito a partir del mRNA mutante tomando como cebadores fragmentos diversos de un DNA que contiene el gen salvaje clonado (15). Para ello se utiliza la transcriptasa inversa y aunque la técnica es más laboriosa los resultados son mejores.

El mapeo genético mediante enzimas de restricción permite encontrar las delecciones causantes de las β -talasemias (16). De esta forma se pudo esclarecer un caso en el que el gen mutante era unos 600 pb más corto que el salvaje. Estudios posteriores permitieron establecer que dicha delección afectaba al extremo 3' del gen de la β -globina.

Hay que aclarar que los estudios de mapeo genético mediante enzimas de restricción tienen una capacidad de resolución que está limitada por la presencia en el DNA de sitios de corte apropiados. Para poder localizar mejor las delecciones se emplean técnicas de microscopía electrónica (17). El DNA de un paciente de talasemia se clona en un bacteriófago y se hibrida con DNA salvaje clonado en un plásmido. Los lazos visualizados en las micrografías electrónicas permiten detectar la delección del gen mutante.

2. Defectos en enzimas de rutas metabólicas

La fenilcetonuria se produce por cambios puntuales en la secuencia del gen de la fenilalanina hidroxilasa. Mediante pruebas de hibridación similares a las pruebas *Ddel* y *MstII* se ha con-

D. Ramón-Vidal y cols.

seguido establecer una correlación entre patrón de restricción y la existencia de la enfermedad. Además se ha logrado detectar la condición de heterozigosis propia de los individuos portadores (18). Es por lo tanto posible hablar de un diagnóstico genético preventivo mediante técnicas de clonación molecular.

Vamos a fijarnos ahora en dos enfermedades metabólicas hereditarias a las que los técnicos en DNA recombinante también han prestado mucha atención, aunque con resultados menos satisfactorios. Se trata de la citrulinemia y el síndrome de Lesch-Nyhan. En ambos casos se ha conseguido clonar el alelo salvaje del gen implicado en la enfermedad. La aplicación de este gen clonado para pruebas de hibridación sobre DNA total, tanto de pacientes como de individuos sanos, no ha revelado diferencias entre sus patrones de restricción. Ello no significa que no haya una mutación en el DNA de los individuos enfermos sino tan sólo que no se puede detectar con los enzimas empleados porque no afecta a sus secuencias de reconocimiento (7).

Al emplear una técnica alternativa, el análisis de los mRNAs específicos de los genes implicados, se puede comprobar que son más cortos en los pacientes que en los individuos sanos. Estos datos parecen apuntar hacia anomalías en el proceso de maduración del mRNA.

Aplicación al diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas

La clonación de genes puede rendir dos tipos de productos interesantes para la medicina clínica: el DNA clonado, útil como reactivo específico en ensayos de diagnóstico por hibridación, o bien los productos proteicos de los genes clonados, usados como antígenos purificados para inmunodiagnóstico o en la producción de vacunas recombinantes (3).

Para el diagnóstico mediante hibridación las sondas se preparan clonando secuencias específicas del DNA del organismo a ensayar (19). No es necesario clonar todo un gen; cualquier secuencia de DNA que tenga la especificidad deseada puede usarse como sonda. De hecho la hibridación puede realizarse con sondas lo suficientemente cortas como para ser sintetizadas artificialmente.

Recientemente se ha propuesto una alternativa al marcaje radiactivo de sondas de DNA para

hibridación. Esta técnica se basa en la alta afinidad entre la biotina y la avidina. Las sondas se sintetizan incorporando nucleótidos biotinilados y su presencia se detecta con un complejo avidina-enzima acoplado a una reacción colorimétrica (20).

Las técnicas de hibridación se pueden aplicar tanto para la identificación de aislamientos bacterianos o virales como para la detección de patógenos en especies clínicas o patológicas. Además, se puede detectar directamente la presencia de DNA o RNA microbiano en tejidos huéspedes e incluso saber si un genoma huésped lleva integradas secuencias virales.

Se ha conseguido clonar una gran variedad de genes que codifican antígenos de virus, bacterias o parásitos patógenos. Su expresión en bacterias permite obtener cantidades suficientes de antígeno para detectar anticuerpos específicos mediante inmunoensayo. Un caso claro es el de la clonación del antígeno HBcAg del virus de la hepatitis B (21).

El estudio de la patogénesis microbiana también puede abordarse mediante técnicas de clonación molecular. Los factores de virulencia pueden manipularse para llegar a identificar los dominios activos de forma precisa. Ello conduce a la producción de mutantes inmunológicamente activos pero funcionalmente defectivos los cuales se pueden utilizar para la fabricación de vacunas. En *Vibrio cholerae*, mutagenizando «in vitro» el gen que codifica la toxina colérica y sustituyendo el alelo salvaje por el gen mutado, se ha logrado una cepa utilizable como vacuna e incapaz de producir toxina (22). Esto supone una gran ventaja ya que muchas de las vacunas actualmente aplicadas poseen un elevado coste de producción, tienen efectos potencialmente tóxicos o virulentos, u ofrecen una protección inadecuada. Algunos de estos problemas pueden evitarse mediante técnicas de DNA recombinante similares a las descritas para el caso anterior.

Perspectivas de la terapia genética

Se ha puesto a punto una serie de técnicas de terapia genética en animales de laboratorio y si bien la aplicación en humanos de estas técnicas no está desarrollada, su base experimental se encuentra en estadios avanzados (23).

En esencia se trata de la inserción de genes funcionales en la médula espinal de ratón. El sistema de introducción más efectivo usa vecto-

Aplicaciones de la ingeniería genética en la medicina

res basados en retrovirus que transfieren genes clonados a células de médula espinal murina en cultivo. Estas células se implantan posteriormente a animales receptores.

Estas técnicas de terapia genética somática son cada vez más eficientes. Su aplicación futura en seres humanos podría llevar a la corrección, al menos parcial, de algunas enfermedades genéticas. Sin embargo la seguridad de los procedimientos debe quedar previamente bien asentada mediante abundantes estudios en animales de experimentación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a D. Juan Carlos Terrasa Nicolau la ayuda prestada en el tratamiento informático del texto.

Bibliografía

1. KORNBERG A.: *Confluencia de las Ciencias Médicas: ingeniería genética*. Servicio de Reprografía de la Caja de Ahorros y Monte de Piedad de Valencia. Valencia, 1981.
2. HADGKINSON S. y SCAMBLER P.: *Recombinant DNA techniques in diagnostic and preventive medicine*. *Bio Essays*, 1: 12-15, 1984.
3. ENGLEBERG N.C. y EINSTEIN B.I.: *The impact of new cloning techniques on the diagnosis and treatment of infectious diseases*. *New Engl. J. Med.* 311: 892-901, 1984.
4. MOTULSKY A.G.: *Genetic engineering, medicine and medical genetics*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 38: 185-186, 1984.
5. MARTIN J.F.: *Plásmidos bacterianos y desarrollo de vectores de clonación*. En «Temas de Microbiología. Vol. 1». Págs. 125-141. ICE Salamanca. Salamanca, 1983.
6. BOLIVAR F., RODRIGUEZ R.L., GREENE P.J., BETHLACH M.C., HEYNECKER H.L., BOYER H.W., CROSA J.H. y FALKOW S.: *Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system*. *Gene*, 2: 95-113, 1977.
7. WATSON J.D., TOOZE J. y KURTZ D.T.: *Recombinant DNA. A short course*. Scientific American Books. W.H. Freeman and Company. Nueva York, 1983.
8. GLOVER D.M.: *Gene cloning. The mechanics of DNA manipulation*. Chapman & Hall. Londres, 1984.
9. MANIATIS T., FRITSCH E.F. y SAMBROOK J.: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Nueva York, 1982.
10. OLD R.W. y PRIMROSE S.B.: *Principles of gene manipulation. An introduction to genetic engineering*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, 1980.
11. CHANG J.C. y KAN Y.W.: *Antenatal diagnosis of sickle cell anaemia by direct analysis of the sickle mutation*. *Mutation Lancet*, 2: 1.127-1.129, 1981.
12. GEEVER R.F., WILSON L.R., NALLASETH F.S., MILNER P.F., BITTNER M. y WILSON J.T.: *Direct identification of sickle cell anaemia by blot hybridization*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 5.081-5.085, 1981.
13. FLAVELL R.A., KOOTER J.M., DE BOER E., LITTLE P.F.R. y WILLIAMSON R.: *Analysis of the β - δ - globin gene loci in normal and Hb lepre DNA: direct determination of gene linkage and intergene distance*. *Cell*, 15: 25-41, 1978.
14. LAVER J., SHEN C.K. y MANIATIS T.: *The chromosomal arrangement of human α -like globin gene: sequence homology and α -globin gene deletions*. *Cell*, 20: 119-130, 1980.
15. CHANG J.C.: *β^0 thalassemia, a nonsense mutation in man*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 2.886-2.889, 1979.
16. ORKIN S.H., OLD J.M., WEATHERALL D.J. y NATHAN D.G.: *Partial deletion of β -globin gene DNA in certain patients with β -thalassemia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 2.400-2.404, 1979.
17. ORKIN S.G., KOLODNER R., MICHELSON A. y HUSSON R.: *Cloning and direct examination of a structurally abnormal human β -thalassemia globin gene*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 3.558-3.562, 1980.
18. WOO S.L.C., LIDSKY A.S., GUTTLER F., CHANDRA T. y ROBSON K.J.H.: *Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria*. *Nature*, 306: 151-155, 1983.
19. MOSELEY S.L., ECHEVARRIA P. y SERIWATANA J.: *Identification of enterotoxigenic Escherichia coli by colony hybridization using three enterotoxin gene probes*. *J. Infect. Dis.*, 145: 863-869, 1982.
20. LEARY J.J., BRIGATI D.J. y WARD D.C.: *Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labelled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: bio-dots*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 4.045-4.049, 1983.
21. PEUTHERER J.F., MacKAY P., ROSS R., STAHL S. y MURRAY K.: *Use of hepatitis B antigen produced in Escherichia coli in an assay for anti-HBc*. *Med. Lab. Sci.*, 38: 355-358, 1981.
22. KAPER J.B., LOCKMAN H., BALDINI M.M. y LEVINE M.M.: *Recombinant nontoxigenic Vibrio cholerae strains as attenuated cholera vaccine candidates*. *Nature*, 308: 665-668, 1984.
23. ANDERSON W.F.: *Prospects for human gene therapy*. *Science*, 226: 401-409, 1984.