

DISCURSO DE APERTURA

DEL CURSO ACADEMICO 1975-76

POR

JOSE ANTONIO LOZANO TERUEL

Catedrático de Bioquímica de la Universidad
de Murcia

EXCMO. Y MAGFCO. SR. RECTOR,
EXCMOS. E ILMOS. SRS.,
SEÑORAS Y SEÑORES:

El cumplimiento del turno reglamentario y la ocasión de ser en la actualidad el catedrático más antiguo de la Facultad de Medicina, me deparan el grato deber de ocupar esta tribuna con motivo de la antigua y solemne tradición académica, cada año renovada, de la apertura del curso académico.

Pronunciar en nombre del Claustro Universitario el discurso de inauguración representa siempre un gran honor, que en mi caso concreto va unido a la emoción de ser y sentirme universitario murciano, formado en esta Universidad, en cuyas aulas tanto hube de aprender de mis maestros, que en gran parte se encuentran aquí presentes y a los que deseo dedicar un recuerdo de profunda gratitud y afecto.

Por otra parte, desearía que Vds. me permitiesen destacar unas circunstancias que considero emotivas, destacando en primer lugar que no ocupa hoy el sillón rectoral, tras el dilatado período de tiempo de su mandato en tan alto cargo académico, el profesor Dr. D. Manuel Batlle Vázquez quien, querido y respetado por todos nosotros, ha sabido darnos el ejemplo del celo con que supo atender simultáneamente no sólo la función docente e investigadora sino la delicada y, a veces, ingrata tarea de dirigir los destinos de la Universidad de Murcia. A nuestra tristeza ante este hecho, se unen en mi caso otros motivos de agradecimiento al Prof. Batlle, pues su cariño hacia mí y su interés por la Facultad de Medicina, aunque yo no me considere con méritos para ello, hizo posible mi rápida incorporación al Claustro Universitario de la Universidad de Murcia desde mi anterior puesto académico en la Universidad de La Laguna. La atención y dedicación del Prof. Batlle hacia la Facultad de Medicina han sido bien notorias para todos los que hemos ido viviendo su desarrollo, por lo que estamos convencidos de que hoy podemos compartir con el Prof. Batlle y con el Prof. Gomar, Decano-Comisario de la Facultad durante sus 6 años de vida, la satisfacción que ha de producirles el ver prácticamente terminadas, en situación de puesta en servicio, las obras del edificio destinado al período preclínico de la Facultad de Medicina. Y también estamos seguros de participar en la misma alegría que nuestro antiguo Rector ha de sentir por el hecho de que nuestro nuevo Rector, el Prof. Sabater, sea un fruto espléndido de la Universidad de Murcia, desarrollado y madurado en ella, bajo la rectoría del Prof. Batlle.

Mi condición de discípulo y amigo del Prof. Sabater me dispensa de pronunciar los elogios que él tanto merece. Sólo deseo señalar, en este día pleno de promesas y de realidades, que estoy convencido que estamos viviendo un momento singular de la Universidad de Murcia, que si bien ya poseía entidad propia durante la invasión árabe, diversas vicisitudes posteriores hicieron que los años 1310, 1840 y 1869 significaran esfuerzos muy serios para la fundación de una Universidad murciana estable, lo que no se conseguiría hasta 1915. Es mi creencia de que, 60 años después, 1975 representará para nuestra Universidad una nueva etapa, la etapa de su desarrollo integral, hasta cubrir las metas que todos deseamos alcanzar recorriendo un camino en el que estaremos aconsejados y dirigidos por la prudencia, honestidad y buen hacer universitario del Prof. Sabater.

El tema de este discurso inaugural versa sobre diversos aspectos relacionados con la Genética bioquímica. La responsabilidad de dirigirme a una audiencia tan ilustre y heterogénea me ha hecho intentar la tarea, quizás imposible, de no aburrirles a Vds. con un tema concreto y específico dentro de la Bioquímica, sino procurar más bien explorar la situación general que presenta el fascinante campo de la Genética, contemplada a nivel molecular, insistiendo sobre todo en cuales son sus perspectivas actuales y futuras, sus riesgos y las implicaciones éticas y sociales de las investigaciones que se desarrollarán en un futuro próximo.

que puedan tratar desde problemas tales como los mecanismos de transmisión del impulso nervioso, de la contracción muscular, del crecimiento y del aprendizaje, hasta otros como el conocimiento molecular de procesos como la fotosíntesis, la floración o las posibilidades de defensa de una célula ante una invasión por virus, la historia molecular de la evolución desde las condiciones prebióticas hasta nuestros días, la diferenciación molecular responsable de las diferencias entre los diversos seres vivos o cuales son las señales que van dando pauta al proceso de diferenciación y desarrollo a partir de un embrión hasta el ser adulto. Por todo lo anterior, no es de extrañar que la bioquímica tienda a especializarse y nos encontremos con divisiones tales como: fisiología, bioquímica clínica, bioquímica molecular, genética molecular, bioquímica celular, etc.

Perspectivas de la

Genética bioquímica

Al situarse la genética bioquímica en el campo de la fisiología, es indudable que se tienen que producir algunas conexiones entre las demostraciones que se utilizan para delimitar unos determinados tipos de mutaciones; y ello es más especialmente evidente si estos son de tipo genético.

BIOQUIMICA Y GENETICA MOLECULAR O BIOQUIMICA

En un caso como la Fisiología, la Química o las Matemáticas y en otros la Medicina, la Física o dentro de la expresión general de Biología.

El objeto de la Bioquímica es tremendamente ambicioso; tratar de explicar en términos moleculares todos y cada uno de los procesos que desde el punto de vista físico y químico constituyen ese fenómeno al que denominamos vida, que el bioquímico ve como una serie muy compleja de reacciones químicas que obedecen a las leyes generales de la Física y de la Química, lo que permite su estudio con los instrumentos y medios usuales en los laboratorios.

El campo que abarca la Bioquímica es por tanto muy extenso. Como ejemplos de diversos aspectos podríamos citar: conocer todos los componentes de los seres vivos, incluyendo a microorganismos, plantas y animales, aclarando la distribución de tales componentes no ya solo entre los diferentes seres vivos, sino también en los diferentes órganos, tejidos, células o porciones subcelulares; estudiar el metabolismo, o sea, los caminos de conversión química, catalizados por enzimas, de unas moléculas en otras utilizando o proporcionando energía durante el proceso; dilucidar al nivel molecular cada una de las funciones de los seres vivos,

que pueden tratar desde problemas tales como los mecanismos de transmisión del impulso nervioso, de la contracción muscular, del envejecimiento o del aprendizaje, hasta otros como el conocimiento molecular de procesos como la fotosíntesis, la floración o las posibilidades de defensa de una célula ante una invasión por virus, la historia molecular de la evolución desde las condiciones prebióticas hasta nuestros días, la diferenciación molecular responsable de las diferencias entre los diversos seres vivos o cuales son las señales que van dando pauta al proceso de diferenciación y desarrollo a partir de un embrión hasta el ser adulto. Por todo lo anterior, no es de extrañar que la Bioquímica tienda a especializarse y nos encontremos con divisiones tales como Biofísica, Enzimología, Bioquímica Estructural, Genética Molecular, Bioquímica comparada, etc.

Al situarse la Bioquímica en una encrucijada entre la Física, la Química y lo que tradicionalmente se ha considerado como Biología, es indudable que se tienen que producir algunas confusiones entre las denominaciones que se utilizan para delimitar unos determinados tipos de estudios; y ello es más especialmente evidente si estos son de tipo genético, especialidad donde, al igual que en la mayoría de los especialidades bioquímicas, trabajan conjuntamente investigadores cuyo origen formativo ha sido en unos casos la Química, la Física o las Matemáticas y en otros la Medicina, la Farmacia o dentro de la expresión general de Biología, específicamente la Fisiología, Microbiología, Botánica o, claro es, la Genética. Un par de ejemplos serán significativos: Crick, un físico, en 1962 obtuvo el Premio Nobel de Medicina junto a Watson y Wilkins por sus trabajos de dilucidación de la estructura del material genético: el ADN. Más aún, Gilbert, Dr. en Matemáticas y convertido primeramente en físico teórico y después en bioquímico, ha sido, junto con Ptashne, uno de los dos investigadores que por primera vez consiguieron aislar una molécula de *represor*, proteína que juega un papel importante en el modelo Operon del control genético de la síntesis de proteínas y cuyo aislamiento ha sido durante muchos años la meta de varios grupos de trabajo.

Por otra parte, la unidad bioquímica de los seres vivos significa que los caminos metabólicos básicos son semejantes en todos los seres vivos, lo que hace que, por ejemplo, el trabajo del investigador que trata del efecto del antibiótico cloranfenicol sobre la síntesis de proteínas en cloroplastos de hojas de guisantes, pueda tener utilidad posteriormente para resolver un problema planteado quizás en términos de Patología Médica.

Esta unidad bioquímica es la que indujo a Szent Györgyi, premio Nobel hace ya algunos años, a decir que "desde el punto de vista bioquímico existe poca diferencia entre una col y un rey". Efectivamente, el que las consecuencias de la investigación bioquímica puedan ser aplicables no solo a la Medicina sino a la Agricultura, Microbiología, etc., ha hecho que se estimulen en gran manera las investigaciones a nivel molecular, ya que a este nivel es donde muchos científicos creen hallar las contestaciones a su curiosidad y afán investigador. Por ello no es de extrañar que desde hace unos 30 años un porcentaje mayoritario de los Premios Nobel, tanto de Medicina como de Química, hayan sido concedidos a bioquímicos que con sus hallazgos están preparando las futuras soluciones a los grandes problemas biológicos existentes. Este interés por la Bioquímica, y, en general, por las Ciencias Básicas, queda claramente demostrado por el hecho de que si se repasan las 3.515 tesis doctorales (1) sobre ciencias médicas que se han aceptado por la Universidades norteamericanas y canadienses entre julio de 1973 y mayo de 1975, un 39% de ellas corresponden a temas claramente bioquímicos, siguiendo la Fisiología con un 11%, con lo que entre las dos materias suponen un 50%. Las disciplinas situadas a continuación son Microbiología y Farmacología con un 9% cada una e Ingeniería Biomédica, Anatomía y Patología del habla con un 3% cada una. El resto de especialidades, incluyendo aquellas que se consideran más clásicas, poseen porcentajes inferiores.

El caso concreto de la Genética, investigada a nivel molecular, es uno de los de desarrollo más acelerado y espectacular en los últimos tiempos y la citada tendencia a la especialización hace que nos encontremos con diversas denominaciones: Biología Molecular, Genética bioquímica, Genética molecular, Genética química, etc. Sin entrar en discusiones sobre el término más acertado, el hecho es que, tal como señala Kornberg (2), los puntos de vista sobre la genética y en concreto sobre el ADN, principal material genético, han cambiado radicalmente y actualmente la genética o el estudio del ADN se aborda en términos químicos, no dudando Kornberg en clasificar estos estudios como una rama de la Química.

En cualquier caso la realidad es que, siguiendo la exposición de este premio Nobel, "a pesar de su complejidad química, el ADN se puede

(1) Dissertations in the Medical Sciences; Xerox University Microfilms, Ann Arbor, Michigan, 1975.

(2) A. KORNBERG; en *DNA Synthesis*, W. H. Freeman, S. Francisco, 1974, págs. 371-373.

modificar, disecar, analizar e incluso sintetizar en un tubo de ensayo. Hay posibilidades de profundizar en un dinamismo metabólico del ADN que no había sido anticipado. El ADN sufre lesiones y se repara. Moléculas de ADN intercambian partes con otras. Las moléculas de ADN se modifican y degradan específicamente, giran y se relajan, se transcriben hasta ARN o en forma inversa, desde ARN. El ADN funciona no solamente en el núcleo sino también en mitocondrias y cloroplastos... Hay confianza en que el metabolismo del ADN en la célula pueda llegar a ser comprendido tan en detalle como hoy el de la glucosa o el del glutamato, por ejemplo”.

Como la mayor parte de las características que diferencian una especie de otra, un ser de otro, o la célula de un tejido de la de otro radican en el distinto contenido o expresión de sus genes, es evidente que el haber llegado a un momento en que ya no parece un sueño irrealizable, sino una realidad a la mano, la manipulación y posible modificación de los genes puede tener una trascendencia enorme, no sólo científica sino también social y ética, sobre todo si se piensa en la posibilidad más o menos remota de poder influir genéticamente incluso en la personalidad humana. Ello hace que, comprensiblemente, se haya provocado una cierta alarma en el hombre de la calle, que piensa si no es ya suficiente el tener que soportar la amenaza constante de una catástrofe global del tipo atómico o el daño constante que se está infringiendo a la calidad de vida en aras a los avances tecnológicos, como para que, por otra parte, los científicos se pongan a manipular con la propia naturaleza interna del hombre, lo que en algunas ocasiones podría provocar una ansiedad mayor que el miedo a la muerte.

Es por tanto lógico el hecho de que, cuando se han hecho a veces pronunciamientos, quizás en exceso sensacionalistas, sobre los peligros de las investigaciones científicas a nivel genético, se haya encontrado una masa de gente dispuesta a pedir la suspensión de tales experiencias y a adoptar una postura de recelo ante la Ciencia, ignorando su contribución a nuestro bienestar. Por ello nos proponemos en esta lección, hacer un resumen de los modernos hallazgos científicos sobre la Genética molecular, realizar un balance de lo que se puede abordar hoy y de las posibilidades existentes para el mañana, deteniéndonos de un modo especial en el aspecto de la fusión de genes de diversas especies, dentro de lo que se ha venido llamando la Ingeniería Genética, lo que ha dado lugar a que, por iniciativa propia, los científicos se planteasen el problema de la licitud moral de su trabajo y convocasen discusiones y conferencias con

una amplia participación, a fin de que la sociedad estuviese informada del estado de los problemas, sus riesgos y sus posibilidades. Es de esperar que lo sucedido con este tema sirva para enfocar otros aspectos importantes relacionados con la seguridad pública y ambiental, de modo que las decisiones que se tomen en estos aspectos hayan sido ampliamente discutidas con antelación por una sociedad bien informada, lo que permitirá tomar todas las precauciones necesarias para el control de algunos tipos de investigación.

La sensibilización de la sociedad ante las nuevas fronteras que abren las ciencias biomédicas hace que aparezcan importantes problemas morales hasta ahora no previstos. Como ejemplo de ello quizás sea útil antes de desarrollar el tema que nos ocupa y para enfocar sus derivaciones sociales, señalar algunos de los casos que en el último año han tenido más resonancia en cuanto a colisiones entre Sociedad y Ciencia.

ALGUNOS PROBLEMAS MORALES EN RELACION CON LAS INVESTIGACIONES EN BIOCENCIAS

Comenzaremos con el que se podría llamar caso del cromosoma XYY (3). Hace algunos años, un estudio dió a la publicidad unos datos en el sentido de que existía un alto número de hombres con cromosomas XYY en la población de una prisión, lo que fue amplia y dramáticamente difundido por los medios de comunicación social, planteándose incluso en algún juicio el grado de responsabilidad de un individuo que fuera portador XYY, lo que haría que su comportamiento tendiese a ser más delictivo. Desafortunadamente el estudio sobre el que ya se denominaba "cromosoma criminal" fue prematuro y las conclusiones tan demasiado precipitadas que hoy los científicos responsables insisten en que el cromosoma XYY es inocente de causar cualquier crimen; sin embargo, el hecho real es que no se ha podido recuperar de la mala publicidad que recibió. Stanley Walzer, psiquiatra de la Harvard Medical School, cree que algunos varones XYY tienen problemas de lectura y otras incapacidades de aprendizaje, lo que puede ocasionar dificultades de comportamiento, por lo que pensó que si detectaba a los niños portadores de ese cromosoma, e identificaba pronto tales problemas, podría ayudar a esos niños. Como consecuencia de ello, a partir de 1968 todos

(3) B. J. CULLITON; *Science*, 188, 1284, 1975.

los niños nacidos en el Boston Hospital for Women fueron sometidos a análisis cromosómicos, en especial buscando los de características XYY o XXY. En el otoño de 1974, miembros de un grupo de la organización Science for People protestaron formalmente contra la continuación de tales estudios, apoyados en la opinión de algunos científicos del Massachusetts Institute of Technology, argumentando falta de ética así como peligrosidad para aquellos niños que fueran estigmatizados con la etiqueta XYY, lo que podría hacer que tuviesen problemas futuros de comportamiento por ese estigma recibido. El Comité de Estudios Humanos de la Facultad de Medicina, revisó el trabajo de Walzer y consideró que cumplía todos los requerimientos necesarios para que fuese deseable su continuación. Más aún, la Facultad esta primavera de 1975 realizó una votación de 200 contra 30 en favor de la continuación del proyecto. Pero la presión de los grupos opuestos continuó y, por ejemplo, abogados del Children's Defense Fund de Washington estuvieron interrogando a Walzer previamente a su pretensión de ejercer alguna acción legal contra él. Finalmente, y como desenlace del asunto, el propio Walzer no pudiendo resistir más la oposición a sus estudios decidió en abril último renunciar a su programa, que ha quedado interrumpido, siendo este un claro exponente del tipo de conflicto entre Ciencia y Sociedad que hace unos años no se hubiese podido plantear.

Otro ejemplo de problemas entre Ciencia y Sociedad podría ser el caso Edelin (4) quien, en octubre de 1973, siendo residente jefe de Obstetricia y Ginecología del Boston City Hospital, efectuó un aborto de rutina de acuerdo con las normas legales allí existentes en una mujer del 17 años que estaba embarazada de un período discutible de 4-6 meses. Durante el aborto, realizado mediante histerotomía, el feto murió y el cuerpo fue enviado al departamento de Patología donde fue descubierto algunos meses después por miembros de la oficina del fiscal del distrito. Dejando aparte el problema de la licitud moral del aborto, el problema se plantea como una acción de la sociedad contra un acto considerado científico. En efecto, un residente, Enrique Giménez Jimeno, denunció que el feto estaba vivo tras el aborto y que Edelin lo dejó morir deliberadamente dejándolo dentro del útero 3 minutos tras quitar la placenta, por lo que se trataba de un homicidio. Edelin negó tales hechos. El juicio despertó grandes controversias sociales y religiosas y en febrero de 1975 el jurado dió un veredicto de culpabilidad, aun cuando la sentencia fue sólo de un año de condena atenuada.

(4) B. J. CULLITON; Science, 187, 814, 1975.

El tercer ejemplo tuvo su origen en investigaciones que se realizaban sobre el metabolismo de ciertos antibióticos y el lugar fue también el Boston City Hospital. El antecedente fue que la Dra. Philipson, del Karolinska Hospital de Suecia, estaba en su 4.º embarazo y, aquejada de bronquitis, comenzó a tomar ciertos antibióticos que le produjeron una menor efecto del esperado, por lo que pensó en la posibilidad de que el embarazo afectase a la capacidad de metabolizar los fármacos. Comprobó que la concentración de antibiótico en la sangre circulante era mucho menor de la que cabía esperar y tras el alumbramiento volvió a tomar antibióticos a las mismas dosis, observando que las concentraciones eran lo elevadas que debían ser. Cuando la Dra. Philipson fue a Harvard discutió las observaciones con el Dr. Sabath, un especialista en antibióticos, que consideró la cuestión como sumamente importante y casi desconocida, decidiendo emprender la investigación del problema usando dos antibióticos, la eritromicina y la clindamicina, utilizados comúnmente en mujeres con alergia a la penicilina. El Comité de Estudios Humanos del Boston City Hospital aprobó el protocolo. Para no correr riesgos de dañar fetos durante los embarazos, aunque esos antibióticos también se usan para tratar algunas afecciones fetales, el grupo investigador decidió hacer los ensayos en dos grupos, uno sobre mujeres no embarazadas y otro con las embarazadas que rutinariamente eran sometidas a abortos legales en el Hospital por el Dr. Charles, contando con la aprobación escrita de todas las mujeres, quienes tomaban ciertas dosis de los antibióticos y se dejaban hacer análisis de sangre. Tras los abortos, el Dr. Bernan colaboraba suministrando tejidos fetales para el estudio de las concentraciones de antibióticos en ellos, siendo incinerados los fetos posteriormente. Como resultado de la investigación, se llegó a la conclusión de que las mujeres embarazadas metabolizan los antibióticos de un modo diferente a las no embarazadas y que la clindamicina cruza más efectivamente la placenta y se introduce en los fetos mejor que la eritromicina. Tales resultados fueron considerados de bastante interés y se publicó un trabajo en el número del 7 de junio de 1973 de *New England Journal of Medicine*. Como consecuencia de esta publicación, diversos grupos de los movimientos "Derecho a la vida", denunciaron a estos científicos basándose en una ley contra violadores y ladrones de sepulturas de 1814 en Massachusetts, en la que se prohibía manipulaciones sobre cuerpos humanos y cadáveres. Poco después fueron acusados oficialmente y están a la espera de que se celebre el juicio. Este caso, además, provocó amplias controversias y sirvió de estímulo para la aprobación de una ley sobre investigación fetal en Massachusetts en junio de 1974, en la que se establecen graves condenas para quienes intenten hacer ciertas experiencias

sobre fetos. Otros estados americanos han promulgado leyes regulando la investigación fetal e incluso el Congreso aprobó una prohibición temporal de la experimentación sobre fetos vivos, aunque fuesen no viables. El Congreso americano ha creado una Comisión Especial, la National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioral Research, que estudiará durante el plazo de dos años las recomendaciones que se deben hacer sobre experimentación humana.

Como muestra de la preocupación creciente por estos tipos de problemas, la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia, creó hace ya algunos años un Comité para tratar sobre los problemas de la libertad académica y de la responsabilidad científica, Comité que ha publicado recientemente un informe en el que, tras afirmar que "la función básica de la comunidad científica es el avance del conocimiento", y admitir que "algunos científicos pueden creer que nada debe excluirse como posible sujeto para la investigación básica", reconoce "que hay fuertes razones para declarar excluidos ciertos tipos de investigación, o al menos para imponerles severas restricciones".

Los ejemplos anteriores pueden habernos servido para adquirir conciencia de que cada vez más a menudo la sociedad querrá conocer la naturaleza y el alcance del quehacer científico y en algunas ocasiones incluso tratará de controlarlo.

Pasemos ahora a considerar cuál es la situación en el campo de la Genética bioquímica.

PRINCIPIOS BASICOS EN GENETICA BIOQUIMICA

Para aquellos de ustedes no familiarizados con las denominaciones utilizadas en Biología, quizá fuese conveniente en este punto, antes de adentrarnos en problemas concretos, hacer un resumen muy elemental de los procesos relacionados con el almacenado, transmisión y expresión de la información genética en los seres vivos.

El ácido desoxirribonucleico, ADN, es la sustancia responsable de la herencia y sus moléculas son normalmente muy largas, filamentosas, y están compuestas de un gran número de cuatro clases de desoxirribonu-

cleótidos que son moléculas con una base nitrogenada, un azúcar (la desoxirribosa), y un grupo fosfato. Los cuatro tipos de bases nitrogenadas son: adenina, guanina, timina y citosina. Las bases del ADN, o mejor aún, su secuencia de bases, son las que constituyen la información genética, y el azúcar y el fosfato poseen un papel estructural. Las cadenas de ADN tienen polaridad, existiendo al final de las cadenas uno de los extremos con un grupo —OH en 5' y otro de los extremos con un grupo —OH en 3', ninguno de los cuales se une ya a otro nucleótido, denominándose por ello extremos: 5' y 3' de la molécula del ADN. La secuencia de bases se considera siempre en el sentido 5' → 3'. Hasta hace aproximadamente 30 años no se tenía una idea clara sobre el tipo de moléculas que eran portadoras de la información genética, pero Oswald Avery, en 1943, en una carta a su hermano (5), daba ya una viva descripción de sus investigaciones, que implicaban que eran las moléculas de ADN las que poseían especificidad genética. Los genes, tanto en los organismos eucarióticos como en los procarióticos, están hechos de ADN. Los organismos eucarióticos poseen células con núcleos, mitocondrias, etc., diferenciados (células vegetales y animales, por ejemplo) mientras que en los procarióticos, mucho más simples, no hay tal diferenciación (por ejemplo, bacterias). Sin embargo, los genes de algunos virus, estructuras muy simples constituídas por la asociación de proteínas y ácidos nucleicos fundamentalmente, son del tipo de ARN, cuya diferencia con las moléculas de ADN consiste en que el azúcar es ribosa en lugar de desoxirribosa y en que en lugar de la base timina se encuentra el uracilo.

En 1953 James Watson y Francis Crick (6) en un trabajo de dos páginas publicado en *Nature*, anunciaban un descubrimiento trascendental para el desarrollo de la Biología Molecular: su interpretación de la estructura tridimensional del ADN, lo que era fundamental para la comprensión de la función de los genes en términos moleculares. El ADN está constituido usualmente por dos cadenas muy largas, situadas paralelamente en sentido contrario (5' → 3' y 3' → 5') y enrolladas helicoidalmente con secuencias de bases complementarias entre sí, de modo que hay enlaces por puente de hidrógeno entre cada pareja de bases enfrentadas, una de una cadena y otra de la otra cadena, situándose frente a una adenina una timina y frente a una guanina un citosina. Las implicaciones genéticas de la estructura del ADN fueron inmediatamente abor-

(5) R. D. HOTCHKISS; en *Phage and the Origins of Molecular Biology*, Cold Spring Harbor Lab., 1966, págs. 185-186.

(6) J. D. WATSON y F. H. C. CRICK; *Nature*, 171, 737, 1953.

dadas un mes después por Watson y Crick (Premios Nobel de Medicina en 1962) en otro artículo de cuatro páginas publicado también en Nature en 1953 (7). Era evidente que la secuencia precisa de las bases a lo largo de una de las cadenas codificaba la información genética y la propia estructura del ADN sugería cómo se podría realizar la duplicación (o *replicación*) de las moléculas en las células durante los procesos en que tal replicación genética tiene lugar: "Nosotros imaginamos que, con anterioridad a la duplicación, los enlaces por puente de hidrógeno se rompen y las dos cadenas se desenrollan y separan. Cada cadena actúa entonces como un molde para la formación, sobre ella misma, de una nueva cadena compañera, de manera que eventualmente tendremos dos parejas de cadenas donde sólo poseíamos una pareja. Más aún, la secuencia de las parejas de bases se habrán duplicado exactamente".

Los esfuerzos de numerosos investigadores y sobre todo el grupo de Kornberg en California, han permitido en estos últimos veinte años, aclarar muchos extremos de cómo tiene lugar a nivel molecular el proceso de la replicación del ADN, y cuáles son las proteínas enzimáticas que catalizan los diferentes pasos. Siguiendo el resumen que hace Stryer en su reciente y bello libro "Biochemistry" (8) podemos decir que la replicación del ADN es semiconservativa, o sea, que cada molécula hija recibe una rama o cadena de la molécula madre de ADN, siendo el proceso global muy complejo, ya que entre los enzimas o proteínas que han de intervenir, lo hacen tres clases diferentes de ADN polimerasas así como una ADN ligasa. Los precursores activados en la síntesis de ADN, tal como se señala en las Fig. 1 y 2, son los cuatro desoxirribonucleósidos 5'-trifosfatos, sintetizándose las nuevas cadenas en la dirección 5' → 3' mediante un ataque nucleofílico, del final hidroxílico 3' de la primera cadena, sobre el fosfato más interior del primer desoxirribonucleósido trifosfato que se va a fijar. Más interesante aún es que las ADN polimerasas catalizan la formación de los correspondientes enlaces fosfoéster sólo si las bases de los nucleótidos que se van fijando son complementarias de las bases situadas sobre la cadena que está sirviendo de molde. Ello significa que las ADN polimerasas son enzimas dirigidos por el molde. Las tres ADN polimerasas, I, II y III, poseen también una actividad exonucleasa 3' → 5' que ayuda a la fidelidad de la replicación porque pueden eliminar los residuos mal apareados. Más aún, la ADN

(7) J. D. WATSON y F. H. C. CRICK; Nature, 171, 964, 1953.

(8) LUBERT STRYER: "Biochemistry", W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1975, pág. 590.

polimerasa I también posee una actividad nucleasa 5' → 3' que parece ser esencial para la reparación del ADN así como para su replicación.

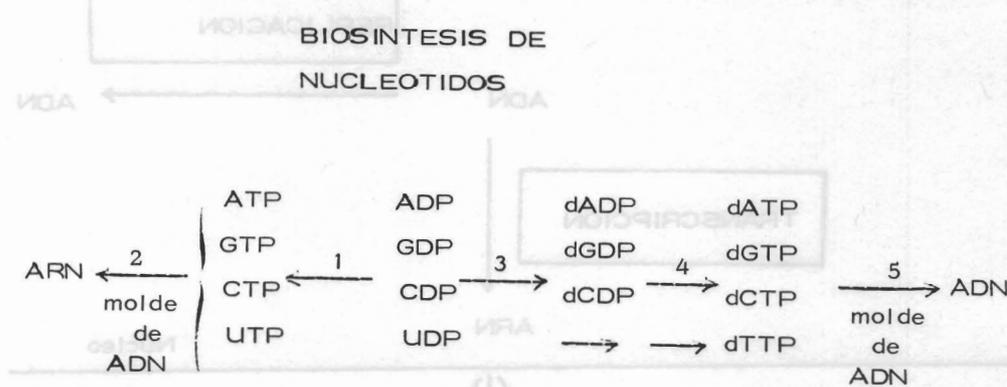


FIGURA 1. Esquema general de la síntesis de ADN y ARN. Los enzimas se indican con los números siguientes: 1-Ribonucleósido difosfato quinasa; 2-ARN polimerasa dependiente de ADN; 3-Ribonucleósido difosfato reductasa; 4-Desoxirribonucleósido difosfato quinasa; 5 ADN polimerasa dependiente de ADN.

Abreviaciones:

- ADP = adenosin-5'-difosfato; ATP = adenosin-5'-trifosfato.
- dADP = 2'-desoxiadenosin-5'-difosfato; dATP = 2'-desoxiadenosin-5'-trifosfato.
- CDP = citidin-5'-difosfato; CTP = citidin-5'-trifosfato.
- dCDP = 2'-desoxicitidin-5'-difosfato; dCTP = 2'-desoxicitidin-5'-trifosfato.
- GDP = guanosin-5'-difosfato; GTP = guanosin-5'-trifosfato.
- dGDP = 2'-desoxiguanosin-5'-difosfato; dGTP = 2'-desoxiguanosin-5'-trifosfato.
- UDP = uridin-5'-difosfato; UTP = uridin-5'-trifosfato.
- dTTP = 2'-desoxitimidin-5'-trifosfato .

El caso concreto más estudiado es el del cromosoma de la bacteria *E. coli*, con un ADN helicoidal de doble cadena y en forma circular como son la mayor parte de las moléculas de ADN, lo cual no impide la existencia de otras formas como longitudinales, circulares monocadenas, etc. La replicación del ADN de *E. coli* comienza en un lugar único determinado sobre la molécula y sigue secuencialmente en direcciones opuestas, aprovechando ambas ramas desenrolladas de ADN como moldes para la síntesis de otras dos nuevas cadenas, siendo el proceso de replicación del ADN discontinuo, ya que ambas nuevas cadenas se van sintetizando en fragmentos en la dirección 5' → 3' y después esos fragmentos se irán uniendo entre sí por la acción de la ADN ligasa. Muy interesante es que la síntesis de estos fragmentos de ADN, necesita previamente la síntesis de algo de ARN, que se fija complementariamente a la cadena que servirá de molde. El ARN posteriormente será hidrolizado, siendo sustituido por ADN.

El papel codificador del ADN consiste en que se puedan sintetizar moléculas específicas de ARN con secuencias complementarias a las del

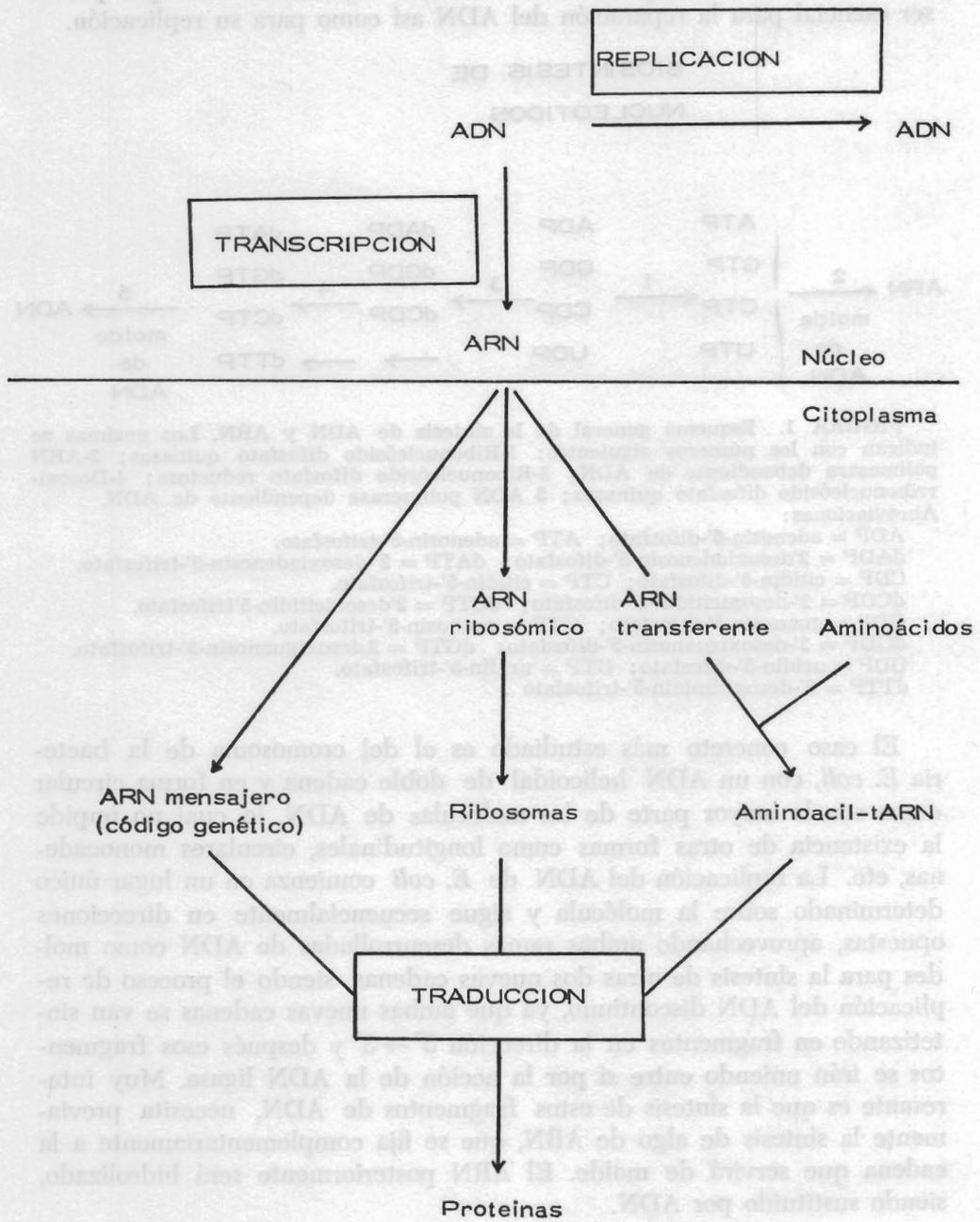


FIGURA 2.—Esquema general del flujo de la información genética.

ADN en un proceso que denominamos transcripción. Existen tres clases diferentes de ARN: el ribosómico (r-ARN), que, como su nombre indica, forma parte de los ribosomas celulares asociado a proteínas específicas; el de transferencia (t-ARN), cuyo papel es participar en la activación de las moléculas de aminoácidos para que estén en condiciones, como complejos aminoacil-t-ARN, de participar en la síntesis de proteínas, y el mensajero (m-ARN), cuyas moléculas son las que realmente llevan el código para que se sintetice tal o cual proteína o enzima. Las moléculas de ARN son con una sola rama, aunque tanto el t-ARN como el r-ARN puedan poseer regiones con doble hélice debido a apareamientos de bases intracatenarias. Los t-ARN son los más pequeños, con unos 75 nucleótidos, y las moléculas más largas son las de m-ARN que pueden llegar a tener más de 5.000 nucleótidos engarzados secuencialmente.

¿Cómo tiene lugar el delicado mecanismo de la síntesis de ARN y su codificación? Los enzimas responsables de la síntesis son las ARN polimerasas dependientes de ADN (que sirve de molde) y las unidades de síntesis son los correspondientes ribonucleótidos trifosfatos que se van fijando en la dirección de síntesis $5' \rightarrow 3'$. En la actualidad, aunque todavía existan muchos puntos oscuros respecto a los detalles del proceso, se conocen muchas propiedades sobre esta clase de enzimas. Una, situada en el nucleolo, es la que canaliza la síntesis de los r-ARN, mientras que la que produce m-ARN es nuclear. La ARN polimerasa de *E. coli* es polimérica, con varias subunidades y existen proteínas específicas que se pueden unir a ella (proteínas sigma y rho) y cuya función es hacer reconocer al enzima el lugar donde ha de comenzar o terminar su acción sobre la molécula de ADN, o sea, que regulan la longitud y características del segmento genético que se transcribe en forma de ARN.

Algunas moléculas de ARN antes de ser funcionales, sufren procesos hidrolíticos o modificaciones químicas en sus bases, mediante la acción de enzimas específicos. Conforme se investiga más sobre ello los ejemplos son más numerosos, indicando la existencia de lo que podríamos llamar pro-moléculas de ARN. En todo caso, hoy también sabemos que el proceso de transcripción se puede bloquear con inhibidores específicos y así, por ejemplo, el antibiótico rifampicina inhibe la iniciación de la síntesis de ARN mientras que la actinomicina D impide la elongación del ARN.

¿Cómo codifica la porción de ADN que denominamos un gen, el que se sintetice un polipéptido determinado? Ello depende del denomi-

nado código genético que es la relación existente entre la secuencia de bases en el ADN (o más corrientemente su transcripción en forma de ARN) y la secuencia de aminoácidos en la proteína. La unidad de codificación funcional es el "codón", que es un grupo de tres bases consecutivas, comenzando en un punto determinado. Cada codón es independiente de los codones situados previa y posteriormente a él, o lo que es igual *el código genético no está solapado*. Cada codón podría ser específico para un aminoácido diferente. Ahora bien, existen 64 codones diferentes (las variaciones con repetición de 4 elementos, las 4 bases, tomados de 3 en 3), de los que 3 codones (UAA, UAG y UGA) son señales para terminar la cadena de síntesis peptídica. Por ello quedan 61 codones para codificar los 20 aminoácidos proteínicos. El que se diga que *el código genético está degenerado*, significa precisamente que varios codones, que se llaman sinónimos y que usualmente difieren sólo en la tercera base del triplete, codifican a un mismo aminoácido. Por otra parte *el código genético es universal*, o sea, es el mismo para todos los organismos vivos, lo que indica que si pudiéramos introducir, por ejemplo, en una célula vegetal, o en una bacteria, el m-ARN que codifica la síntesis de una determinada proteína animal, esa célula vegetal o la bacteria serían capaces de producir esta proteína.

Cuando en la molécula del ADN que constituye un gen se produce una variación en su secuencia decimos que ha ocurrido una mutación. La mutación puede consistir en:

- a) sustitución de una base por otra base y se llama transición si se reemplaza una purina por otra purina o una pirimidina por otra pirimidina. Cuando se reemplaza una purina por una pirimidina, o viceversa, se denomina transversión. En los casos de sustitución es fácil deducir que sólo se produce un cambio en un aminoácido de la proteína codificada. Es lo que sucede con numerosos tipos de hemoglobinopatías conocidas.
- b) pérdida o delección de uno o más pares de bases,
- c) inserción de una o más pares de bases. En estos dos últimos casos también es fácil comprender que si las pérdidas o ganancias de parejas de bases no están próximas y no son múltiplo de 3, ello significa que la proteína codificada sufrirá una alteración en su composición a partir de los lugares de la mutación. Por ello estos tipos de mutaciones son menos corrientes pues conducirían a menudo a graves trastornos biosintéticos. Las mutaciones se pueden producir por tautomerización, acción

de mutágenos químicos (ejemplo, el ácido nitroso), actuación defectuosa de ADN polimerasa, etc. Como todos sabemos, la aparición de mutaciones que puedan producir ventajas o desventajas al ser en que se producen ha debido jugar un papel muy importante en la evolución de los seres vivos.

Una pregunta inmediata respecto a la universalidad del código genético sería el por qué ha permanecido invariable a través de miles de millones de años de evolución. Quizá la respuesta es que si en alguna ocasión se ha producido alguna mutación en ese sentido, que alterase la "lectura" de los codones de los m-ARN, ello obligaría a cambiar la secuencia de aminoácidos de prácticamente todas las proteínas sintetizadas por ese organismo particular, lo que produciría un desastre metabólico total que haría invariable la existencia de las actividades vitales, por lo que, en consecuencia, debe existir una gran selección en contra de una mutación de ese tipo.

Una vez que conocemos en qué consiste el código genético, el paso siguiente sería considerar cómo se transforma esa codificación hasta llegar a la síntesis de una proteína particular. También en la *traducción* del mensaje genético o biosíntesis de proteínas, nuestros conocimientos han aumentado estos últimos años y sabemos que es necesaria la participación coordinada de más de un centenar de macromoléculas entre las que se incluyen m-ARN, t-ARNs, ribosomas, enzimas activantes, factores proteínicos, etc.

Por una parte los aminoácidos, unidades de composición de las proteínas, se activan mediante enzimas activadores de cada uno de ellos y de t-ARN y forman complejos aminoacil-t-ARN entre cada aminoácido y su t-ARN específico, existiendo al menos un enzima activador específico y un t-ARN específico para cada aminoácido. Todos los t-ARN se parecen estructuralmente, poseyendo varios lóbulos y zonas de apareamiento de bases, con una estructura global en forma de L y mientras la unión al aminoácido está situado en el extremo 3' de la terminación CCA de un lado de la L, a 80 Å de distancia del otro lado de la L se encuentra el llamado anticodón o secuencia de 3 bases, característica para cada t-ARN y por tanto para su aminoácido específico.

El m-ARN reconoce pues, no al aminoácido, sino al anticodón (Fig. 3), que posee 3 bases complementarias a las del codón, pudiendo un anticodón reconocer a más de un codón (degeneración del código genético

antes apuntada) porque la tercera base de un codón es menos discriminatoria que las otras dos.

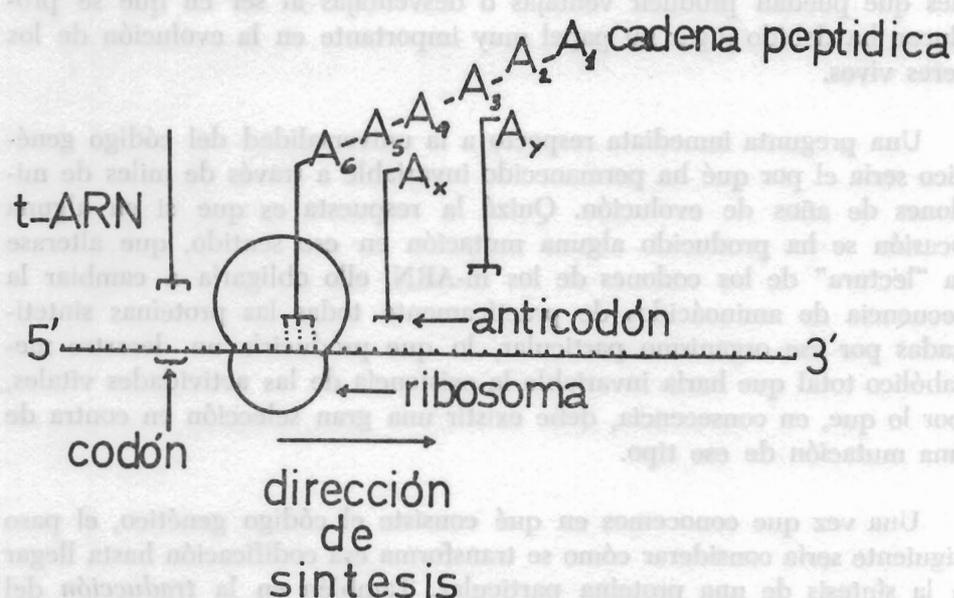


FIGURA 3.—Esquema simplificado de la síntesis de proteínas donde juega un papel importante el apareamiento entre las bases de los codones y los anticodones.

La síntesis de proteínas tiene lugar sobre los ribosomas a los que se van fijando los correspondientes aminoacil-t-ARN, en 3 fases: iniciación, elongación y terminación.

En la fase de iniciación, se forma un complejo de iniciación entre la porción 30S (en procarióticos) del ribosoma, el m-ARN y el N-formilmetionil-t-ARN y el anticodón de este último reconoce un codón especial de iniciación sobre el m-ARN, uniéndose entonces la porción 50S para completar el ribosoma. En el proceso participan diversos factores proteínicos de iniciación así como GTP.

La fase de elongación comprende el enlace de complejos aminoacil-t-ARN sobre los codones de reconocimiento, la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos y el movimiento selectivo del ribosoma, la longitud de un codón, sobre el m-ARN en la dirección 5' → 3'. De este modo se va sintetizando la proteína desde el grupo aminoterminal hasta el carboxilo terminal. También en esta fase se necesita el concurso de diversos factores proteínicos y de GTP.

La última fase de terminación tiene lugar gracias a los factores proteínicos de terminación, que reconocen a los codones de terminación anteriormente mencionados, y a los factores de liberación que favorecen la hidrólisis entre el polipéptido y el t-ARN. Algunos inhibidores como estreptomicina, tetraciclinas, cloramfenicol, eritromicina, etc., afectan en un lugar u otro la síntesis de proteínas, produciendo su inhibición que, en algunos casos de antibióticos usados terapéuticamente, es específica para los sistemas procarióticos.

Una vez repasados someramente los mecanismos de expresión genética convendría señalar la existencia de otros mecanismos de control de esta expresión genética, siendo uno de los más conocidos el descubierto

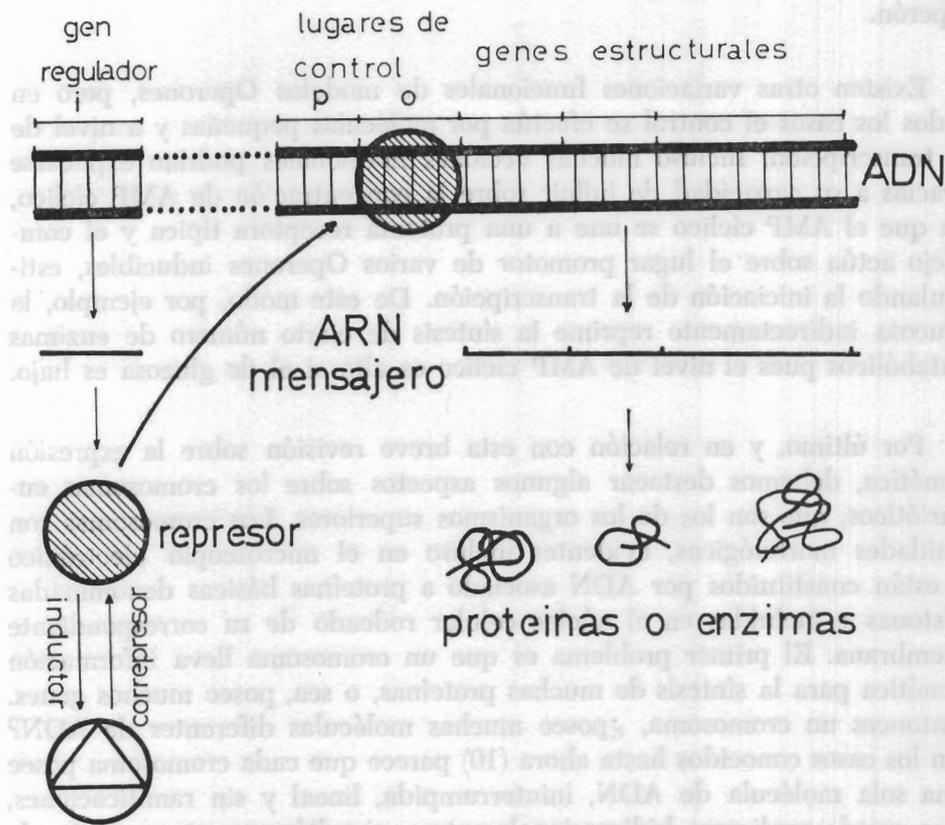


FIGURA 4.—Modelo Operón para el control genético de la síntesis de proteínas. En este caso concreto, la síntesis enzimática estaría reprimida normalmente debido a la acción del represor sobre la región del operador o. Por la presencia de un inductor, éste se uniría o modificaría al represor, el cual ya no se uniría al operador con lo que podría realizarse el proceso de transcripción.

por Jacob y Monod (9), (premios Nobel de Medicina en 1965), y que se conoce con el nombre de modelo Operon, actuando a nivel de control de la transcripción. Un Operon es una unidad coordinada de expresión genética, y consiste, dentro de la molécula de ADN de un cromosoma, en unos lugares de control (el operador y el promotor) y de un conjunto de genes estructurales que codifican normalmente a proteínas o enzimas muy ligadas funcionalmente entre sí. Además de esta zona del ADN, existe también un gen regulador (Fig. 4) que codifica una proteína, el represor, que interactúa con el lugar operador. El papel de los inductores de una determinada serie de enzimas, que en condiciones normales no se sintetizan, sería el de enlazarse con el represor y evitar su unión con el operador con lo que la ARN polimerasa se puede trasladar a lo largo de él y comenzar la transcripción del sistema de genes estructurales del Operón.

Existen otras variaciones funcionales de modelos Operones, pero en todos los casos el control se efectúa por moléculas pequeñas y a nivel de la transcripción. Incluso muchas acciones hormonales podrían explicarse gracias a su capacidad de influir sobre la concentración de AMP cíclico, ya que el AMP cíclico se une a una proteína receptora típica y el complejo actúa sobre el lugar promotor de varios Operones inducibles, estimulando la iniciación de la transcripción. De este modo, por ejemplo, la glucosa indirectamente reprime la síntesis de cierto número de enzimas catabólicos pues el nivel de AMP cíclico es alto si el de glucosa es bajo.

Por último, y en relación con esta breve revisión sobre la expresión genética, debemos destacar algunos aspectos sobre los cromosomas eucarióticos, que son los de los organismos superiores. Los cromosomas son unidades morfológicas, evidentes incluso en el microscopio electrónico y están constituidos por ADN asociado a proteínas básicas denominadas histonas e incluidas en el núcleo celular rodeado de su correspondiente membrana. El primer problema es que un cromosoma lleva información genética para la síntesis de muchas proteínas, o sea, posee muchos genes. Entonces un cromosoma, ¿posee muchas moléculas diferentes de ADN? En los casos conocidos hasta ahora (10) parece que cada cromosoma posee una sola molécula de ADN, ininterrumpida, lineal y sin ramificaciones, que puede replicarse bidireccionalmente y simultáneamente a partir de

(9) F. JACOB y J. MONOD; *J. Mol. Biol.*, 3, 318, 1961.

(10) *Chromosome Structure and Function*; Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology; Cold Spring Harbor Laboratory, 1974.

muchos puntos diferentes entre sí (11), unos 6.000 por cada molécula de ADN, al menos en el caso de un cromosoma de *Drosophila*.

Hechos sin aclarar o al menos con problemas pendientes de solucionar son:

a) el que el ADN eucariótico parece contener muchas secuencias de bases repetidas, en concreto, un ADN satélite muy repetitivo localizado cerca de los centrómeros, existiendo algunos ADN satélites con un heptanucleótido repetido más de 10.000 veces. Otro ADN, esta vez moderadamente repetitivo, es el del gen precursor de ciertos ARN ribosómicos. El gen se repite unos centenares de veces separada cada unidad de otra por regiones, que no se transcriben, de unas 5.000 parejas de bases. De todos modos, también se sabe que existen genes con una sola copia en el cromosoma,

b) el papel de las histonas en el empaquetamiento del ADN y quizá en el control de la expresión genética. Si se llama una unidad de período evolutivo al tiempo necesario para que a lo largo de la evolución la secuencia de aminoácidos de una proteína cambie en un 1% a partir de dos líneas evolutivas divergentes, el período de unidad evolutiva para el cit. c es de 20 millones de años, de 6 millones de años para la hemoglobina y de un millón de años para los fibrinopéptidos, mientras que para la histona IV es del orden de 1.200 millones de años y algo semejante sucede con la histona III. Así, la histona IV de semilla de guisante y la del timo de vaca difieren sólo en dos pequeños cambios de todos sus 102 aminoácidos. Ello tiende a señalar que las histonas tienen funciones críticas y que la mayor parte de su estructura es esencial para ejercer tales funciones.

Una vez que hemos hecho una breve reconsideración sobre nuestros conocimientos genéticos bioquímicos nos podemos plantear la pregunta de que si tales conocimientos nos sirven sólo para saciar nuestra curiosidad científica de intentar conocer el por qué de las cosas, o si también puede existir una aplicación práctica para ellos. Posiblemente con un ejemplo podamos darnos cuenta de la magnitud de algunos de los problemas planteados y cómo el conocimiento a nivel bioquímico de la genética puede darnos la clave futura de su solución. Consideremos, pues, el problema de las Enzimopatías.

(11) H. J. KRIEGSTEIN y D. S. HOGNESS; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 135, 1974.

ENZIMOPATIAS

En la sección precedente hemos comprobado que la composición del ADN constituyente de los cromosomas es responsable de la secuencia de aminoácidos de las proteínas, de los enzimas. Por otra parte insistíamos al comienzo de esta exposición, que la vida, los procesos metabólicos, podemos considerarlos como una serie de reacciones químicas catalizadas por los enzimas. Actualmente poseemos una visión general sobre los grandes procesos metabólicos comunes a todos los seres vivos e incluso sobre su control y regulación, así como sobre el metabolismo específico y propio que diferencia a unos seres de otros.

Sabemos que existen miles de enzimas diferentes, con estructuras espaciales tan exactas responsables de la especificidad de su acción, que cualquier cambio estructural tal como la pérdida, ganancia o sustitución de un aminoácido o más simplemente, una variación conformacional en la estructura espacial puede conducir a una modificación o pérdida de la actividad catalítica del enzima y dificultar o impedir la reacción catalizada por ese enzima. Por otra parte, el grado de conexión e influencia mutua entre todo el delicado entramado que constituye el metabolismo es tan grande que las repercusiones del hecho de que determinada reacción no transcurra normalmente puede ser dramáticas. Por ello cabe esperar que los cambios o mutaciones que pudieran tener lugar en el ADN cromosómico puedan alterar drásticamente la normalidad de los procesos metabólicos dando lugar a procesos patológicos más o menos graves.

Efectivamente ello es así, y como los avances médicos han hecho retroceder a las enfermedades de tipo infeccioso, ello ha dado lugar a que en la actualidad se estime que más del 25% de las hospitalizaciones de los niños en los países desarrollados, lo son como consecuencia de enfermedades que poseen un componente hereditario mayoritario que, hoy día, podemos reconocer gracias a las nuevas técnicas de la Bioquímica y de la Biología Celular. De este modo se conocen ahora más de 1.600 enfermedades humanas que están causadas por defectos en el contenido o en la expresión de la información genética del ADN. Algunas de las enfermedades son muy raras, pero otras ocasionan un gran número de muertes. La incidencia de malformaciones congénitas importantes en la población general es el orden de 1 a 50 y la de anomalías congénitas menos importante es de 1 : 20.

Las aberraciones enzimáticas pueden tener lugar por caminos diferentes. Una mutación en los genes regulador u operador de un modelo Operón (Fig. 5) puede producir cambios cuantitativos en los niveles enzimáticos, aumentándolos, disminuyéndolos, o incluso provocando la ausencia total del enzima, debido a que queda desregulado el sistema de control del Operón. Las mutaciones en los genes estructurales pueden producir resultados muy diversos, dependiendo del lugar y de la natu-

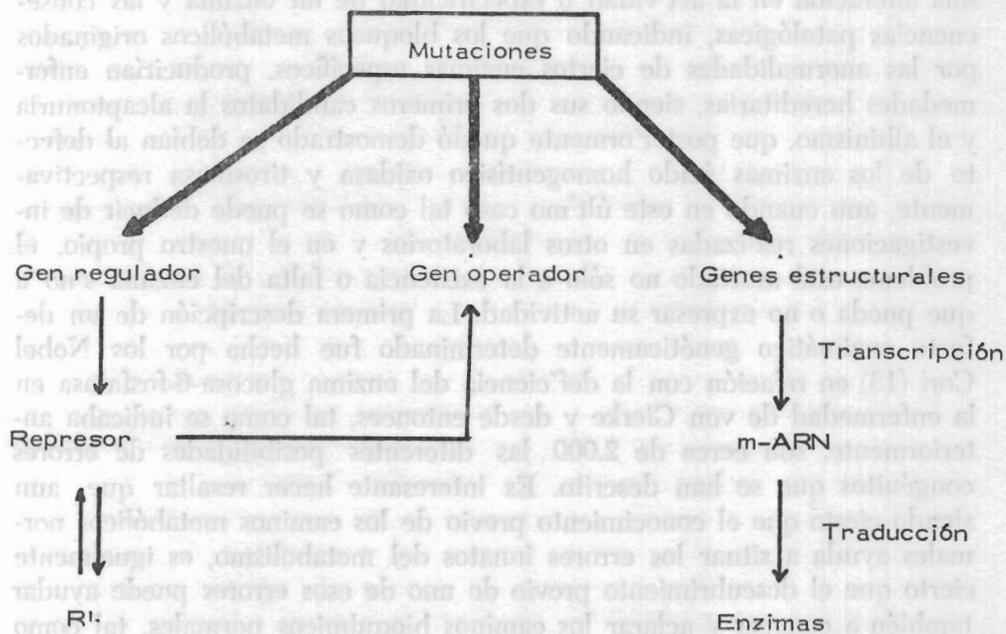


FIGURA 5.—Esquema mostrando la posibilidad de que ciertas mutaciones puedan producir aberraciones enzimáticas. Las mutaciones pueden afectar a los genes reguladores, de control, o a los estructurales.

raleza de la mutación y de si afecta o no a la composición de aminoácidos del enzima. Incluso si afecta a la composición, el efecto puede ser muy variable, dependiendo a su vez de si la variación ocurre o no en un lugar importante para la actividad catalítica (tal como el centro activo del enzima) o para su conformación espacial. Por ello puede existir desde pérdida total de actividad del enzima a una disminución parcial que podría deberse a causas tan diferentes como:

- a) reducción de la afinidad hacia el sustrato cuya transformación es catalizada por el enzima.
- b) enlace anormal con sus cofactores, coenzimas y grupos prostéticos.

- c) incremento en la velocidad de destrucción del enzima,
- d) modificación en el modo de ensamblarse las subunidades del enzima,
- e) modificación de las proporciones de isoenzimas que se encuentran normalmente en un tejido.

Garrod (12) fue quien hace más de 50 años pensó en la relación entre una alteración en la actividad o especificidad de un enzima y las consecuencias patológicas, indicando que los bloqueos metabólicos originados por las anomalías de ciertos enzimas específicos, producirían enfermedades hereditarias, siendo sus dos primeros candidatos la alcaptonuria y el albinismo, que posteriormente quedó demostrado se debían al defecto de los enzimas ácido homogentísico oxidasa y tirosinasa respectivamente, aun cuando en este último caso tal como se puede deducir de investigaciones realizadas en otros laboratorios y en el nuestro propio, el problema está asociado no sólo a la existencia o falta del enzima sino a que pueda o no expresar su actividad. La primera descripción de un defecto enzimático genéticamente determinado fue hecha por los Nobel Cori (13) en relación con la deficiencia del enzima glucosa-6-fosfatasa en la enfermedad de von Gierke y desde entonces, tal como se indicaba anteriormente, son cerca de 2.000 las diferentes posibilidades de errores congénitos que se han descrito. Es interesante hacer resaltar que, aun siendo cierto que el conocimiento previo de los caminos metabólicos normales ayuda a situar los errores innatos del metabolismo, es igualmente cierto que el descubrimiento previo de uno de esos errores puede ayudar también a conocer y aclarar los caminos bioquímicos normales, tal como ha sucedido con el estudio de las mutantes de hemoglobinas en relación con la estructura y función de la hemoglobina o con fenilcetonuria, albinismo y alcaptonuria respecto al metabolismo de los aminoácidos aromáticos, así como otros muchos ejemplos que se podrían citar.

Para simplificar la situación supongamos (Fig. 6) que el enzima E_1 cataliza la transformación de la sustancia A en B, la cual mediante el enzima E_2 se convierte en C, la C con E_3 en D y así sucesivamente, aun con la posibilidad simultánea de que otros sistemas enzimáticos transformen B en X, Y, Z, etc. sucesivamente. ¿Qué pasará si el enzima E_1 está bloqueado total o parcialmente? Como los caminos metabólicos se sitúan en secuencias ordenadas, un problema en una etapa determinada signifi-

(12) A. E. GARROD; en *Inborn errors of metabolism*, Oxford University Press, Londres, 1909.

(13) G. T. CORI y C. F. CORI; *J. Biol. Chem.* 199, 661, 1952.

ca inevitablemente una alteración de las concentraciones o composiciones de los metabolitos, posiblemente esenciales, que participan en la cadena metabólica y en los que estén relacionadas con ella. Así, se acumulará la sustancia A (por ejemplo, la ausencia de galactoquinasa hace que se acumule galactosa), pero también se privará a la célula de los metabolitos B, C, D, X, Y, Z, etc. y no funcionará la vía metabólica

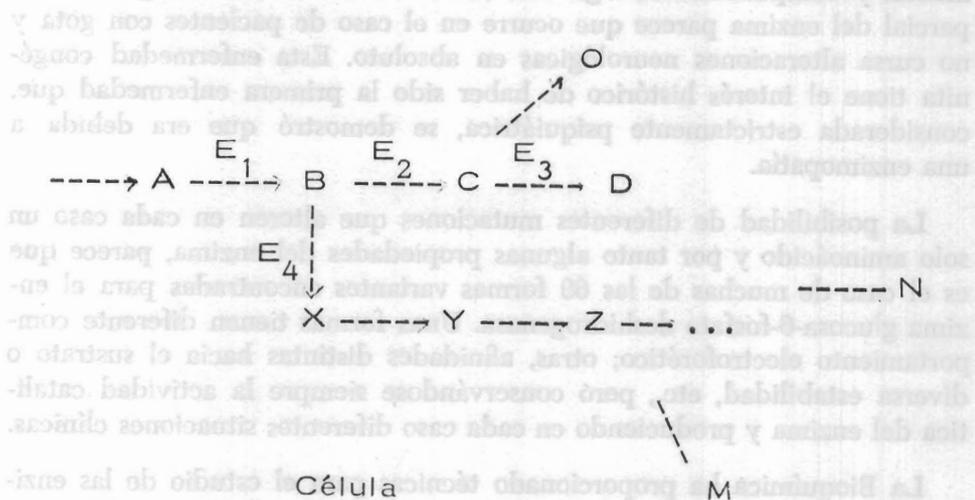


FIGURA 6.—Relaciones entre las vías metabólicas y los defectos enzimáticos.

$B \rightarrow X \rightarrow Y \rightarrow Z \dots$ Si el enzima defectuoso fuera E₂ también se privaría a la célula de C y D, pero en este caso se acumularía B, lo cual obligaría a que la vía metabólica $B \rightarrow X \rightarrow Y \rightarrow Z \dots$, que en condiciones normales trabaja a una cierta velocidad, vea incrementada grandemente su actividad con lo que puede acumularse en sangre u orina un determinado metabolito M que en condiciones normales no es tóxico, pero sí lo es a concentraciones altas. Así ocurre por ejemplo en la fenilcetonuria, cuando la falta del enzima fenilalanina hidroxilasa hace que los niveles de fenilalanina, ácido fenilacético y ácido fenil láctico sean muy altos en sangre y orina. Otra posibilidad de desajuste metabólico podría ser que la sustancia D ejerciese un efecto de retroinhibición sobre el enzima E₁ y que este perdiere, no la actividad, sino la capacidad de ser regulado por E₁, por lo cual habría una superproducción en toda esa vía metabólica ya que al acumularse D en la situación patológica, no se inhibe E₁, al contrario de lo que sucede en la situación normal, lo que significa mayor y mayor producción de D. Este hecho es el que ocurre en porfiria intermitente aguda, al no sufrir retroinhibición el enzima deltaaminolevulinato sintetasa.

El defecto de un enzima puede conducir, desde el punto de vista clínico, a diversos desórdenes, dependiendo del tipo de transformación del enzima así como de la localización tisular de la deficiencia. Así, la deficiencia total del enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa, es la causa del síndrome de Lesch-Nyhan, muy grave, acompañado de retardo mental y comportamiento agresivo auto-mutilante. Sin embargo la falta parcial del enzima parece que ocurre en el caso de pacientes con gota y no cursa alteraciones neurológicas en absoluto. Esta enfermedad congénita tiene el interés histórico de haber sido la primera enfermedad que, considerada estrictamente psiquiátrica, se demostró que era debida a una enzimopatía.

La posibilidad de diferentes mutaciones que alteren en cada caso un solo aminoácido y por tanto algunas propiedades del enzima, parece que es el caso de muchas de las 60 formas variantes encontradas para el enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Unas formas tienen diferente comportamiento electroforético; otras, afinidades distintas hacia el sustrato o diversa estabilidad, etc., pero conservándose siempre la actividad catalítica del enzima y produciendo en cada caso diferentes situaciones clínicas.

La Bioquímica ha proporcionado técnicas para el estudio de las enzimopatías, lo cual significa la determinación correcta de los niveles enzimáticos, o de los sustratos o productos de sus reacciones en diferentes tejidos. Las posibilidades que hoy se ofrecen son varias.

Ensayo directo en tejidos. Es quizás el método más claro y directo y consiste en medir las concentraciones del enzima sospechoso en sangre, orina o biopsias de tejidos adecuados. El procedimiento se aplica en numerosos casos particulares y los problemas mayores son las dificultades en la obtención de algunos tipos de tejidos y la falta de sensibilidad de algunos ensayos, aun cuando en este último caso las pruebas de sobrecarga con metabolitos adecuados o el uso de técnicas radiométricas pueden ayudar a resolver la cuestión.

De todos modos, cada vez es mayor el uso de pruebas basadas en cultivos de tejidos de células, tales como los realizados con biopsias de piel o la realización de amniocentesis.

Biopsia de piel. Los fibroblastos que se derivan de la piel proporcionan potencialmente una gran cantidad de tejido humano sin los peligros o inconvenientes de tener que utilizar procedimientos quirúrgicos importantes. Las técnicas son muy alambicadas, pero las aplicaciones actuales son muy interesantes.

Amniocentesis. El saco que rodea al feto durante el embarazo está lleno del denominado líquido amniótico, que se deriva principalmente de la orina fetal y de las secreciones respiratorias fetales. El líquido posee células viables en suspensión que proceden de la piel fetal o del tracto respiratorio. Por amniocentesis se conoce la técnica de obtención del fluido amniótico transabdominalmente mediante una punción con una aguja unida a una jeringuilla. A partir de los años 60 la amniocentesis ha sido una técnica de rutina para la detección de riesgos de incompatibilidad Rh en niños recién nacidos, midiendo la concentración de los productos catabólicos de la hemoglobina presentes en el líquido amniótico.

Los datos disponibles parecen indicar que como las células presentes en el líquido amniótico son de origen fetal, reflejan el estado metabólico del feto, por lo que se pueden separar por centrifugación y se cultivan durante 18-25 días en medios de cultivo adecuados y tras otras manipulaciones se pueden examinar sus niveles enzimáticos, lo que permite la detección de las enfermedades congénitas aun antes del nacimiento. En la actualidad se llegan a detectar prenatalmente por medio de la amniocentesis unas 50 enfermedades congénitas, algunas de las cuales se señalan en la tabla 1. Por otra parte, fácilmente se pueden hacer también estudios cromosómicos prenatales para la detección del mongolismo, o síndrome de Down, que no consiste en la existencia de un gen mutante o defectuoso sino en la presencia de un cromosoma 21 extra, la mayoría de las veces como consecuencia de un defecto en la separación de cromosomas en el huevo en desarrollo.

Antes de continuar, sería conveniente hacer una referencia a los denominados programas de despistaje o "screening" de enfermedades metabólicas congénitas, sobre todo en recién nacidos. Un cierto número de estas enzimopatías pueden detectarse con cierta facilidad con unas determinaciones, generalmente cromatográficas, de metabolitos del tipo aminoácidos, glúcidos o derivados, realizados sobre unas muestras de sangre y de orina de recién nacidos recogidas sobre papeles especiales de filtro. El conocimiento precoz de algunos de estos problemas congénitos, tales como la oligofrenia fenilpirúvica permite el dar a los niños dietas especiales con poco contenido en el sustrato que tiende a acumularse por la falta del enzima que cataliza su transformación. De este modo se evita el rápido deterioro del sistema nervioso del niño, que conduce de un modo irreversible hacia la subnormalidad y en bastantes ocasiones a la muerte precoz del individuo. Por el contrario, con esas dietas adecuadas es posible conseguir a menudo que el desarrollo de los niños afectados

sea mucho más normal. Ello ha hecho que en numerosos países sean obligatorios estos programas de despistaje sobre todos en recién nacidos a fin de poder descubrir el pequeño porcentaje de ellos que presentan las enfermedades congénitas más usuales. En España se realizan programas de "screening" en algunas regiones, siendo uno de los pioneros en este campo el profesor Federico Mayor Zaragoza quien en Granada, hace unos años creó el CIAMYC (Centro de Investigación de Alteraciones Metabólicas y Congénitas) que posteriormente se ha seguido desarrollando en Madrid. En Murcia, la Excm. Diputación Provincial, a iniciativa de su Ilmo. Presidente D. Ginés Huertas Celdrán, ha creado a comienzos de este año el Centro de Bioquímica Clínica, que me honro en dirigir, con el propósito principal de llevar a cabo algunos de estos programas de despistaje entre los recién nacidos de nuestra región. Rutinariamente se realizan los ensayos correspondientes para la detección de una decena de enzimopatías relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, hidratos de carbono y mucopolisacáridos, esperando en el futuro poder abordar las enfermedades hereditarias de lípidos así como el estudio de cromosomopatías. Por otra parte como además de la colaboración del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, también colabora de una manera destacada el Departamento de Pediatría de la misma Facultad, ello permite llevar a cabo estudios especiales sobre grupos subnormales así como, cuando se solicita, dar las pautas clínicas de tratamiento en los casos de existencia de anomalías metabólicas congénitas. El problema principal y general de estos Centros es la mentalización de médicos y padres a fin de cubrir el mayor porcentaje posible de recién nacidos, a cuyo fin la colaboración de la Jefatura Provincial de Sanidad puede ser muy valiosa. En todo caso, a pesar del poco tiempo transcurrido desde su creación, el Centro de Bioquímica Clínica ha sido ya muy útil en el diagnóstico de algunos casos de enzimopatías en niños de corta edad que estaban sin diagnosticar y en algunos otros casos de los que se vienen cubriendo rutinariamente.

¿Qué consecuencias prácticas tiene el desarrollo de procedimientos adecuados para la detección de las enzimopatías? Aparte de su valor científico y de la profundización en las investigaciones que nos permitan conocer más sobre ellas, podemos citar otras razones a favor de este tipo de estudios:

- a) ante una condición clínica dada, poder establecer la causa última a nivel molecular, descartando así posibles tratamientos inadecuados.
- b) en algunos casos poder aliviar la enfermedad mediante tratamientos específicos.

c) permitir el consejo genético en el caso de posible matrimonio, sobre todo en heterocigotos.

d) en el caso de detección prenatal de la enfermedad en el feto poder preparar una terapia muy temprana o, en aquellos países en que es práctica legal y moralmente sea aceptado por las personas implicadas, la posibilidad de elegir el aborto terapéutico.

En el aspecto del consejo genético, cuando hay una persona con un defecto genético, siempre tendrá familiares que probablemente serán portadores del rasgo bioquímico anormal sin que presenten signos claros de la enfermedad. Si uno de estos individuos es heterocigótico para ese carácter, poseerá un gen normal y otro defectuoso y posiblemente las moléculas del enzima codificadas por el gen defectuoso serán diferentes de las codificadas por el normal y el individuo puede ser asintomático porque con la mitad del enzima usualmente presente en una persona normal puede realizar sus funciones metabólicas. Pero si un portador heterocigótico se casa con otro portador heterocigótico, se puede esperar que el 25 % de la descendencia sea homocigótica, con dosis doble del gen anormal, y por tanto con el defecto enzimático presente.

¿Qué posibilidades de manipulaciones metabólicas poseemos o esperamos contar con ellas en el futuro para corregir las enzimopatías? Si volvemos a considerar el ejemplo que exponíamos anteriormente (Figura 6) debido a la falta del enzima E_1 , en principio se nos podría ocurrir: a) proporcionar el producto B que no se obtiene como consecuencia de que no tiene lugar la reacción defectuosa; b) intentar eliminar el exceso acumulado de sustrato A; c) suministrar el enzima E_1 ; d) introducir el gen o genes necesarios para que se produzca la síntesis del enzima E_1 . Es inmediato pensar que la posibilidad d) sería la definitiva, que la c) le seguiría en orden de eficacia, mientras que las a) y b) serían sólo soluciones temporales.

La situación real es que, a pesar de nuestros deseos, de las cuatro posibilidades teóricas sólo las dos primeras se usan en casos limitados con éxito satisfactorio y que el reemplazamiento enzimático se está comenzando a intentar en algunas ocasiones, mientras que la cuarta solución permanece en el terreno de una muy atractiva esperanza para el futuro.

Respecto a la aproximación de adicionar algún metabolito en defecto, es lo que se hace, por ejemplo, en la diabetes mellitus con la adición de insulina, aun cuando en este caso no esté establecida la falta de ningún

enzima. En el caso de la falta de cistationina sintetasa, cuyo cofactor es la vitamina B₅, ha tenido éxito la administración de grandes cantidades en exceso del cofactor, con lo cual mejora la actividad del enzima.

En relación con la restricción de compuestos presentes en excesiva concentración, ya hemos hecho referencia anteriormente que este era el caso de las enzimopatías que se cubren usualmente en los programas de despistajes. Así, por ejemplo, se restringen en la alimentación: la fenilalanina en el caso de fenilcetonuria, con falta de fenilalanina hidroxilasa; la tirosina y fenilalanina en la tirosinosis en que falta el enzima p-hidroxifenilpiruvato oxidasa; lactosa en la galactosemia, en que falta la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa, etc.

Respecto a la terapia con enzimas, el sistema podría funcionar en el caso de enzimas circulando normalmente en la sangre, pero en la mayoría de los casos el enzima defectuoso pertenece a algún orgánulo intracelular, lo cual hace aparecer el problema de que el enzima exógeno pueda o no alcanzar ese espacio intracelular, aunque parece que en muchos casos los enzimas suministrados externamente son tomados por el sistema reticuloendotelial lo cual es precisamente lo que se necesita en el caso de pacientes con enfermedades de almacenado. Otro factor importante a tener en cuenta es el inmunológico. El enzima que se administra no debe provocar respuestas inmunológicas. Los intentos iniciales realizados con enzimas no purificados, en el caso de glucogenosis II, glucogenosis III y leucodistrofia metacromática, no fueron muy satisfactorios (14). En el primer caso se suministraron extractos intravenosos de *Aspergillus niger* con actividad 1,4 glucosidasa, pero hubo poca mejora clínica. En el segundo caso se utilizó α -glucosidasa de hongos. En el tercer caso se suministró arilsulfatasa A de cerebro bovino, pero el enzima, que llegó hasta el hígado del paciente, no podía entrar hasta el cerebro, por lo cual la mejora clínica fue muy pequeña. El grupo de Brady viene desarrollando una intensa labor investigadora en las enfermedades del metabolismo de lípidos, purificando los enzimas de origen humano y en algunos casos han obtenido resultados esperanzadores (15) sobre pacientes que no tengan daño cerebral importante, tales como niños con enfermedades de Gaucher muy progresiva pero que posean suficiente actividad glucocerebrosidasa para protegerles del daño en el sistema nervioso, aunque las dificultades en bazo, hígado y huesos progresen rápidamente. En estos casos parece que va bien la administración de glucocerebrosidasa pura de ori-

(14) J. SRI RAM; J. Scient. & Ind. Res., 30, 493, 1971.

(15) R. O. BRADY; Chem. & Physics of Lipids, 13, 271, 1974.

gen placentario. Algo semejante sucede con enfermos varones aquejados con la enfermedad de Fabry al suministrarles ceramidotrihexosidasa de origen placentario.

Otra tentativa de gran interés y con algún éxito parcial, dentro de este apartado de la terapia con enzimas, es la utilización de enzimas insolubilizados, o de enzimas encapsulados en microcápsulas semipermeables lo que permitiría al sustrato y a los productos difundirse a través de las paredes de las cápsulas y se evitarían las reacciones inmunológicas (16).

Queda por considerar la última posibilidad de la intervención genética. Aunque para ser realistas hemos de colocarla dentro de las hipótesis, sin embargo, un poco más adelante comprobaremos como en algunos sistemas biológicos la ingeniería genética ya es una realidad aunque no al nivel que se necesitaría para abordar la curación de una enfermedad congénita. De todas maneras, es necesario insistir que desde el punto de vista teórico el problema se presenta como abordable en el futuro si pensamos en que a partir del supuesto de haber resuelto los aspectos del aislamiento, identificación o síntesis del ADN que codifica al enzima defectuoso, quedaría por solucionar la inserción del material genético en el aparato genético de la célula, lo cual podría lograrse introduciendo el gen dentro de la información genética de un virus natural no patogénico o de un pseudovirus fabricado especialmente.

En algunos casos se ha intentado infectar a pacientes deficientes en arginasa con el virus no patogénico del papiloma de Shoppe que se sabe que reduce los niveles de arginina en humanos puestos en contacto con el citado virus, porque se supone que aumenta las concentraciones de arginasa en las células huéspedes. Otra aproximación parecida para intentar solucionar el problema podría ser conseguir la producción del enzima por las células, por exposición de algunas de estas células del paciente al ADN adecuado en cultivos de tejidos, y tras conseguir esa finalidad reimplantar las células tratadas al huésped original. Sin embargo, todo ello es especulativo y podría presentar graves dificultades, como las que se derivan de que en los procedimientos de cultivo de tejido se sabe que a veces se sufren transformaciones malignas. Por ello, hemos de pensar que las aplicaciones clínicas de estas perspectivas genéticas aun están lejos de estar en nuestras manos.

(16) K. MOSBACH; Scientific Amer., 224, 26, 1971.

Algo semejante podemos decir respecto al uso de células híbridas para resolver el problema. Consideraremos posteriormente el hecho de que es factible la obtención de células híbridas a través de la fusión de las células somáticas procedentes de especies iguales o diferentes. Estas células híbridas se multiplican en medios adecuados y al principio poseen dos o más núcleos que al final se funden en una sola masa nuclear. Se han realizado fusiones entre fibroblastos diploides de varones humanos, unos de ellos con deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (anemia congénita no esferocítica) y otros con deficiencia en hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (síndrome de Lesch-Nyhan). Las células híbridas resultantes fueron normales en ambas actividades. Existen otras muchas experiencias de tipo semejante a nivel de células individuales pero no podemos predecir cuándo y cómo podrían tener significado clínico, ya que por ahora sólo se podría pensar en reimplantaciones de células individuales una vez corregidas de su defecto congénito.

En resumen: las enfermedades congénitas y en concreto las enzimo-patías, conforme los cuidados médicos generales mejoran, representan un porcentaje mayor dentro de los problemas de la salud. Debido a las secuelas con que van acompañadas, tales como retraso mental y a las dificultades de no poder contar con terapias eficaces, hace tanto más interesante las investigaciones y estudios que sobre ellas se realicen. Los métodos analíticos permiten la detección de la mayor parte de ellas e incluso su diagnóstico prenatal y se está comenzando a intentar su cura usando nuevos métodos que pueden ser más eficaces y permanentes que los que hasta ahora se venían utilizando. Ello no sólo no minimiza, sino que por el contrario realza el interés de las campañas de despistaje de estas enfermedades congénitas en grupos grandes y especiales de población.

AVANCES RECIENTES DE LA GENÉTICA MOLECULAR

Acabamos de tomar conciencia de que la solución definitiva de los problemas congénitos ha de radicar en una terapia genética. Esta conclusión nos obliga a que intentemos conocer cuáles son las perspectivas al respecto, para lo cual debe ser útil el repasar, siquiera someramente, algunos de los hallazgos más llamativos o con más posibilidades futuras entre los que han venido acaeciendo estos últimos años en el campo de la Genética y en particular de la Genética bioquímica.

Totipotencia de las células diferenciadas y papel de las histonas

Si pensamos en el desarrollo de un embrión, nos llama la atención que un huevo fertilizado simple conteniendo todos los genes del organismo, prolifera dando lugar a la formación de una gran variedad de células diferenciadas que se especializan para funciones diferentes: En los eritrocitos lo importante es la síntesis de hemoglobina; en células musculares, la síntesis de mioglobina; en fibroblastos, la fabricación de colágeno. Ello significa que en las células diferenciadas hay unos genes operativos mientras otros no se expresan ya que desde hace algunos años se sabe que el ADN presente en cada una de las células diferenciadas es siempre el mismo, de donde se deduce que el problema es de regulación, de que unos genes puedan transcribirse y otros no (Fig. 7).

Los experimentos de J. B. Gurdon de la Universidad de Oxford, realizados hacia 1968, confirmaron elegantemente la totipotencia de las células diferenciadas. Realizó, con micropipetas especiales, la eliminación de los núcleos de huevos de ranas y la obtención de núcleos de células intestinales diferenciadas. Cuando el núcleo procedente de las células intestinales se introdujo en la célula enucleada del huevo, y por tanto sin propia información genética, los huevos se desarrollaron normalmente demostrando que los núcleos de las células intestinales o de cualquier célula diferenciada contienen toda la información genética del ser vivo de que se trate, aunque en cada tejido especializado sólo se expresa una porción limitada de esa información y además en un tiempo determinado, habiéndose calculado que una célula normalmente sólo tiene operando menos del 10 % de su información genética total. Los genes que se transcriben pueden variar a lo largo del tiempo cuando la célula sufra la acción de ciertos estímulos, que le obliguen a dividirse, o de ciertas hormonas, que le hagan alterar su metabolismo.

En el control de la actividad genética de las células de los organismos eucarióticos hay evidencias de que un fuerte protagonismo lo ejercen las proteínas cromosómicas de tipo básico que conocemos con el nombre de histonas, así como otras proteínas de tipo no histona, y también asociadas con la cromatina. Los datos actuales tienden a darnos un cuadro general de la situación, que se expresa gráficamente en la Figura 8, en el que la situación normal es la de que las histonas a pH fisiológico poseen gran número de cargas eléctricas positivas en sus grupos ionizables, por lo que ejercen fuertes acciones de tipo electrostático sobre las moléculas de ADN, cargadas negativamente. Esta asociación ADN-histona evita que pueda

actuar la ARN polimerasa y que se pueda realizar la transcripción genética. Una proteína no-histona específica, entre las muchas existentes, puede fosforilarse mediante una proteína-quinasa y al cargarse negativa-

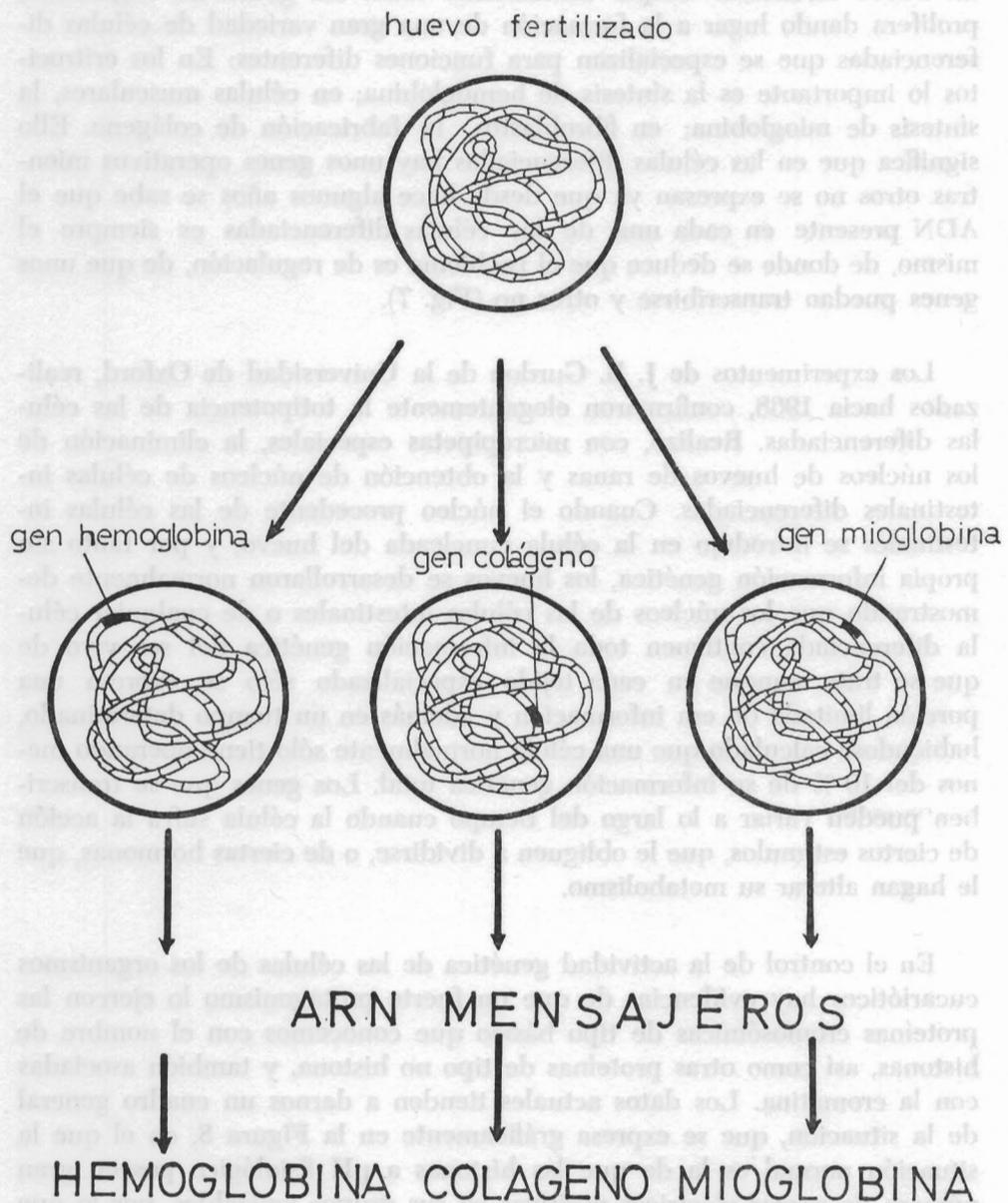


FIGURA 7.—Expresión genética de algunos genes durante el curso del desarrollo. Todas las células diferenciadas poseen todos los genes del organismo, pero los procesos de regulación hacen que sólo se transcriban los más apropiados.

mente con los grupos fosfatos, sufre simultáneamente un efecto de atracción hacia una porción de las histonas y un efecto repulsivo en relación con el ADN. Como consecuencia de ello, se produce una asociación entre las dos proteínas y el complejo se separa de la zona de ADN que estaba protegida, con lo que al quedar libre esta región de ADN puede realizarse la transcripción en forma de ARN (17). No podemos olvidar en este punto el papel de las hormonas y del AMP cíclico en la regulación de

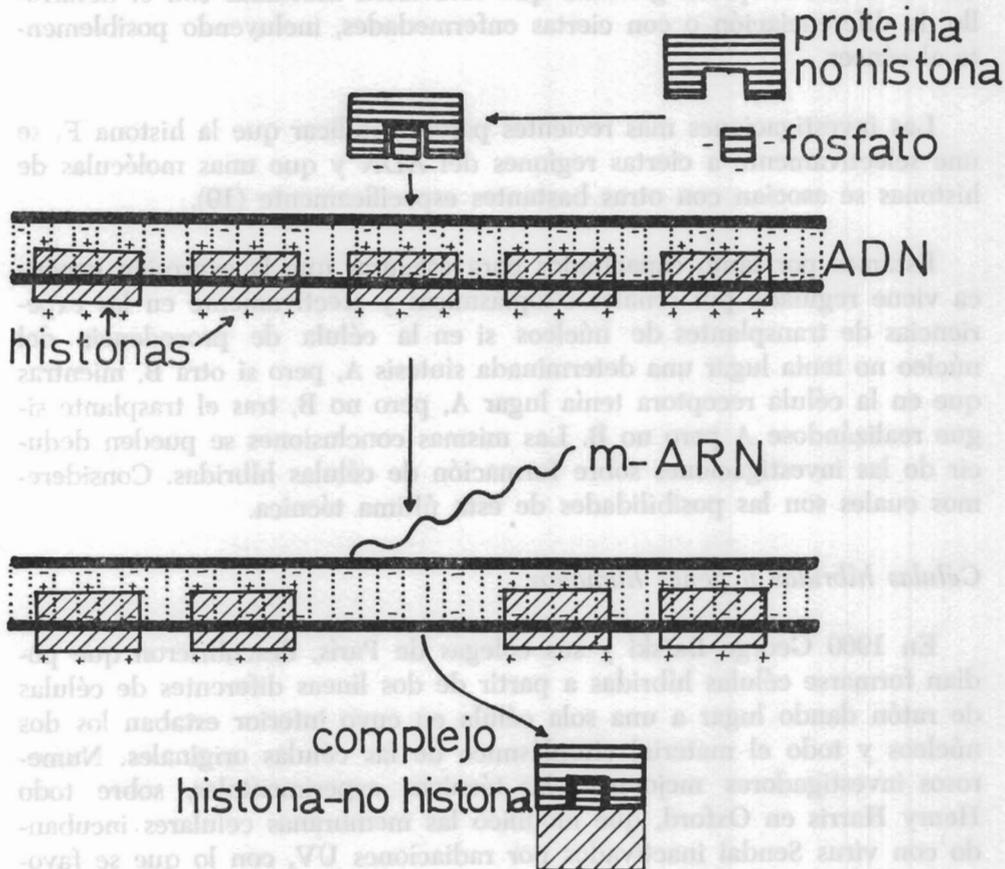


FIGURA 8.—Hipótesis sobre el mecanismo de regulación de la expresión genética en los seres eucarióticos por medio de la acción de las histonas y otras proteínas no-histonas. Las histonas cargadas positivamente se asocian con las moléculas de ADN cargadas negativamente, impidiendo la actuación de la ARN polimerasa. Cuando una proteína no-histona específica se fosforila, se carga negativamente y se asocia con ciertas histonas, separándose el complejo así formado del ADN, dejando libre una zona de ADN donde puede actuar la ARN polimerasa realizando la transcripción. .

(17) *Chromosomal proteins and their role in the regulation of gene expression.* Eds. G. Stein, J. S. Stein y L. K. Kleinsmith, Academic Press, 1975.

muchos procesos de fosforilación celular, lo que por extrapolación podría aplicarse a la regulación de la transcripción genética.

Si este modelo de regulación se confirma en el futuro, podría llevarnos al aislamiento de proteínas específicas que regulen la expresión de genes determinados (18), lo cual tendría como consecuencia la posibilidad de insertar esas proteínas dentro de las células para modificar las anomalías de la transcripción genética que estuviesen asociadas con el desarrollo, la diferenciación o con ciertas enfermedades, incluyendo posiblemente al cáncer.

Las investigaciones más recientes parecen indicar que la histona F₁ se une selectivamente a ciertas regiones del ADN y que unas moléculas de histonas se asocian con otras bastantes específicamente (19).

Estamos por tanto capacitados para asegurar que la expresión genética viene regulada por señales citoplásmicas y efectivamente en las experiencias de transplantes de núcleos si en la célula de procedencia del núcleo no tenía lugar una determinada síntesis A, pero sí otra B, mientras que en la célula receptora tenía lugar A, pero no B, tras el trasplante sigue realizándose A pero no B. Las mismas conclusiones se pueden deducir de las investigaciones sobre formación de células híbridas. Consideremos cuales son las posibilidades de esta última técnica.

Células híbridas y genes humanos

En 1960 George Barski y sus colegas de París, descubrieron que podían formarse células híbridas a partir de dos líneas diferentes de células de ratón dando lugar a una sola célula en cuyo interior estaban los dos núcleos y todo el material citoplásmico de las células originales. Numerosos investigadores mejoraron las técnicas experimentales, sobre todo Henry Harris en Oxford, que modificó las membranas celulares incubando con virus Sendai inactivados por radiaciones UV, con lo que se favorecía la fusión de células procedentes de individuos diferentes, obteniendo células polinucleadas capaces de dividirse.

Si por ejemplo se funden células Hela cancerosas humanas, que realizan síntesis rápida de ADN y ARN, con células eritrocitarias de gallina que no se dividen ni sintetizan ADN ni ARN, en ambos núcleos de la cé-

(18) G. STEIN, J. S. STEIN y L. K. KLEINSMITH; *Scient. Amer.*, 232, 47, 1975.

(19) S. B. KOLATA; *Science*, 188, 1097, 1975.

lula híbrida resultante hay síntesis de ADN y ARN, demostrando una vez más la naturaleza citoplásmica de los factores reguladores de la transcripción e incluso de la replicación genética.

Pero el aspecto más interesante y moderno de las células híbridas es su aplicación para el estudio de los genes humanos y su regulación, tal y como ya adelantaban en 1967 Mary C. Weiss y Howard Green, en la New York University School of Medicine, cuando demostraron la potencialidad de las células híbridas ratón-humano para la realización de análisis genéticos humanos, usando fibroblastos humanos y células del roedor, estas últimas con ciertas características especiales que las hacen inviables por sí solas en el medio de cultivo, salvo si logran la hibridación con las humanas.

En las células híbridas son funcionales tanto el genoma humano como el de ratón, expresándose simultáneamente sus genes respectivos, que codifican sus propias proteínas cada uno. Los cromosomas de ambas especies se pueden distinguir en el interior de la célula híbrida así como también se pueden diferenciar bioquímicamente los enzimas u otras proteínas que se originen bien por la información de genes humanos así como por la de los genes del roedor.

Un hecho muy importante es que tras la fusión, el material genético o genoma del ratón se conserva esencialmente intacto. Sin embargo, el humano se pierde parcialmente y al azar. Las células normales de ratón poseen 40 cromosomas. Las humanas poseen 44 cromosomas autosómicos, sin sexo (22 pares) y dos cromosomas sexuales más que son del tipo X en las células femeninas, o 1 X y 1 Y en las células masculinas, o sea un total de 46 cromosomas. Sin embargo las células híbridas no poseen los cromosomas totales, sino cantidades variables entre 41 y 55 cromosomas y como todos los de ratón están presentes, ello significa que se pierden entre 31 y 45 cromosomas humanos en la fusión, ocurriendo esa pérdida al azar.

Conociendo los cromosomas que se pierden y los que permanecen, y estudiando con técnicas adecuadas los productos resultantes de la transcripción de los genes de los cromosomas que quedan, fue posible entre 1973 y 1974 asignar más de 50 genes a 18 cromosomas humanos particulares (20) y aunque la tarea de localizar quizás más de 40.000 genes como parecen existir en mamíferos sea por ahora de una magnitud tremenda,

(20) F. H. RUDDLE y R. S. KUCHERLAPATI; *Scient. Amer.*, 231, 36, 1974.

sin embargo el camino ya está abierto, e incluso con técnicas de translocaciones o deleciones se conocen las posiciones aproximadas de algunos de estos genes dentro de sus cromosomas, entre ellos, algunos relacionados con problemas metabólicos congénitos.

Por otra parte, la existencia de células híbridas también está permitiendo escudriñar más profundamente en el funcionamiento de los genes que se expresan tan sólo en células especializadas, así como cabe esperar que la técnica sirva para mejorar los métodos de diagnóstico prenatal de enfermedades congénitas, pues en la actualidad sólo se pueden detectar aquellas anomalías congénitas que se expresan normalmente en los fibroblastos, que son las únicas células fácilmente recuperables del líquido amniótico, pero quizás los fibroblastos tras su fusión con otras células apropiadas puedan expresar toda su información genética, no tan sólo la que normalmente está sin reprimir, lo cual permitirá diagnosticar prenatalmente un gran número de enfermedades que hoy no pueden ser conocidas con tal anticipación.

Las perspectivas futuras de las técnicas de hibridación también son muy amplias. Pasamos a considerar algunas posibilidades.

Croce y colaboradores (21), están usando células híbridas somáticas ratón-hombre para infectarlas con ciertos virus, algunos de ellos tumorales, permitiéndoles conocer que los genes responsables para la transformación y la integración del genoma del virus SV40 está localizado en el cromosoma humano C7, en lugar de integrarse al azar en cualquier cromosoma como antes se creía. Ello puede ser un punto de partida interesante para el estudio de los procesos malignos.

El desarrollo de diferentes líneas de células híbridas está siendo útil para la localización de los genes de la síntesis de las moléculas de globina de la hemoglobina, pero también para proporcionar información sobre los factores genéticos que regulan su transcripción (22). Alguno de los genes parece estar localizado en un "locus" regulador sobre el cromosoma, lo cual daría lugar a posibilidades semejantes a las existentes en el modelo Operon de células procarióticas.

Dentro de lo que casi se puede considerar ciencia-ficción, podemos incluir la sugerencia hecha recientemente (23) de que se intensifiquen las

(21) CROCE, ADEN y KOPROWSKI; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1397, 1975

(22) DEISSEROTH y col.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 1102, 1975.

(23) N. NASHED, Science, 186, 1159, 1974.

investigaciones dirigidas a obtener células híbridas entre *Chlorella* (un alga simple que contiene clorofila y realiza fotosíntesis) y células animales tales como hepáticas para que sean sometidas a cultivo y selección a fin de obtener líneas capaces de ser industrializadas en el futuro por sus buenas calidades de velocidad de crecimiento, retención de clorofila, valor nutritivo, estabilidad genética, gusto aceptable, etc. Con ello se conseguiría aprovechar directamente la energía solar (porción vegetal del híbrido) y producir proteínas del tipo presente en la carne (porción animal del híbrido).

Operones eucarióticos

El control de los genes en organismos procarióticos está bien establecido desde que en 1961 François Jacob y Jacques Monod, premios Nobel en 1965, presentaron su análisis del que se denominó modelo Operon con sus genes reguladores y estructurales y la existencia de represores, corepresores e inductores. El aislamiento y purificación de las dos primeras moléculas proteínicas represoras de dos sistemas operones diferentes, supuso un hito en la comprensión del mecanismo molecular del control genético (24-25). El operon lac (lactosa) de *E. coli* ha sido el más estudiado y se sabe que no solamente la ARN polimerasa o la molécula de represor son los que pueden ejercer una acción sobre la región de ADN en que está localizada la zona del promotor y del operador, sino que existe una proteína activadora catabólica (PAC) que activa la transcripción del operon "lac" mediante la ARN polimerasa, gracias a su acción sobre la región promotor-operador. El AMP cíclico activa a esta proteína. A principios del año actual (26), se ha publicado la determinación de la secuencia de los 122 pares de nucleótidos que constituyen la región promotor-operador del operon lac, y hasta ha sido posible distinguir dentro de esa secuencia los lugares de reconocimiento para la ARN polimerasa, la proteína activadora catabólica (PAC) y la proteína reguladora negativa (el represor) e incluso se ha podido establecer un modelo a nivel molecular de como tiene lugar la iniciación de la transcripción.

En organismos eucarióticos, ¿cuál es la situación? La asociación de enzimas de un mismo camino metabólico, cuyos genes estructurales estén sujetos a un control genético común, es un hecho frecuente en procarióticos pero no parece serlo en eucarióticos, que por añadidura poseen una

(24) W. GILBERT y B. MULLER-HILL; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56, 1891, 1966.

(25) M. PTASHNE; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57, 306, 1967.

(26) R. C. DICKSON, J. ABELSON, W. M. BARNES y W. S. REZNIKOFF; Science, 187, 27, 1975.

mayor complejidad genómica junto con la existencia de cantidades grandes de ADN repetitivo y complicados esquemas de desarrollo y diferenciación, todo lo cual hace esperar que los procesos de control genético en eucarióticos sean más complicados en número o funcionamiento que los existentes en procarióticos (27).

De todos modos el análisis genético del control de los genes en eucarióticos parece haber comenzado y recientemente se han descrito tres sistemas sobre el hongo ascomiceto *Aspergillus nidulans* en los que se identifican lugares reguladores: del control del catabolismo de la prolina en el primer caso (28); una zona tipo promotor en relación con la permeasa del ácido úrico en el segundo caso (29) y en conexión con el gen estructural de la acetamidasa en el tercer caso (30). Ahora sólo resta esperar que este tipo de operones eucarióticos sean descubiertos en otros organismos eucarióticos, con lo cual tendríamos el punto de partida para nuevas investigaciones sobre el control de la expresión genética en una célula dada y en un tiempo determinado.

Aislamiento y síntesis artificial de genes

La purificación de genes se hizo posible cuando hace una docena de años se desarrollaron sistemas, denominados de hibridación molecular, que permitían detectar la presencia de un gen en una mezcla compleja de moléculas de ADN. Para ello era necesario primeramente contar con la molécula de ARN codificado por ese gen y además que estuviese marcada radioactivamente, lo cual se conseguía por la incorporación de uracilo marcado. Las investigaciones más fructíferas se realizaron utilizando ARN ribosómicos (existen de tres tamaños de 5, 18 y 28S unidades Sverdberg, respectivamente) procedentes de un sapo anfibio, el *Xenopus laevis*. Tras la desnaturalización parcial del ADN cromosómico para que se desdoblén sus dos ramas, se fija ese ADN a papel de filtro, que se incuba con la disolución de un ARN radioactivo, el cual selectivamente se fija al gen que lo codifica por la complementaridad de bases, formando un híbrido ADN-ARN. A continuación se elimina el ARN no enlazado y la medida de radioactividad indica lo que representa el gen específico así aislado dentro del ADN global.

(27) P. J. FORD; Nature, 254, 14, 1975.

(28) H. N. ARTS y D. W. McDONALD; Nature, 254, 26, 1975.

(29) H. N. ARTS y C. SCAZZOCHIO; Nature, 254, 31, 1975.

(30) M. J. HYNES; Nature, 253, 211, 1975.

El desarrollo del método de aislamiento ha permitido purificar a Brown y col. (31) la porción 5S del *Xenopus laevis* y del *Xenopus mulleri* llegando a la conclusión de que el gen que codifica el r-ARN 5S está repetido en su cromosoma, separando una porción de ADN espaciador a cada dos genes iguales consecutivos, de modo que sólo una pequeña fracción del ADN está realmente codificado ya que la longitud del ADN espaciador puede ser 6-20 veces superior a la del gen 5S.

Más recientemente se ha hecho uso de otro tipo de hibridación ADN-ADN. Para ello se parte también del ARN codificado por el gen que se desea aislar y mediante el enzima transcriptasa inversa se fabrica una copia radioactiva y complementaria de ADN, la cual tenderá a fijarse específicamente sobre la porción de ADN de bases complementarias a la suya, o sea en la zona del gen que interesa aislar. Ello está permitiendo la localización y el estudio de genes específicos que presentan interés.

Durante mucho tiempo una aspiración de algunos equipos bioquímicos de vanguardia ha sido poder conseguir la síntesis artificial de un gen en el laboratorio, pero existía un problema básico y es que no se conocía la secuencia de ningún gen. En 1965 Robert W. Holley de la Universidad de Cornell y premio Nobel en 1968, tras largos años de trabajo publicó la secuencia correspondiente a un ARN transferente, el t-ARN de la alanina en levadura. Al descubrirse la secuencia del ARN se podía suponer que la del gen que lo codificaba sería la complementaria, con lo cual ya se sabía qué molécula era la que se deseaba sintetizar. Efectivamente, ese mismo año el también premio Nobel de 1968, Har Gobind Khorana que entonces estaba en la Universidad de Wisconsin, en Madison, acometió la síntesis artificial del gen. El grupo de Khorana había conseguido su objetivo 5 años después, en 1970, con un gen conteniendo 77 desoxirribonucleotidos en una secuencia determinada (Fig. 9). Sin embargo la elección del gen, por otra parte obligada, no había sido afortunada ya que el gen aunque estructuralmente correcto, no era funcional a nivel de tubo de ensayo ni a nivel celular, porque aunque llevaba la información genética correspondiente al t-ARN, sin embargo no poseía las señales de iniciación y de terminación que son polidesoxirribonucleótidos de longitud indeterminada y situados en cada uno de los extremos del gen y cuyas secuencias no se conocen aún para ningún gen.

El segundo intento consistió en escoger el gen correspondiente al t-ARN de la tirosina de *Escherichia coli*, o aun mejor al precursor de ese

(31) D. D. BROWN; Scient. Amer., 229, 21, 1973.

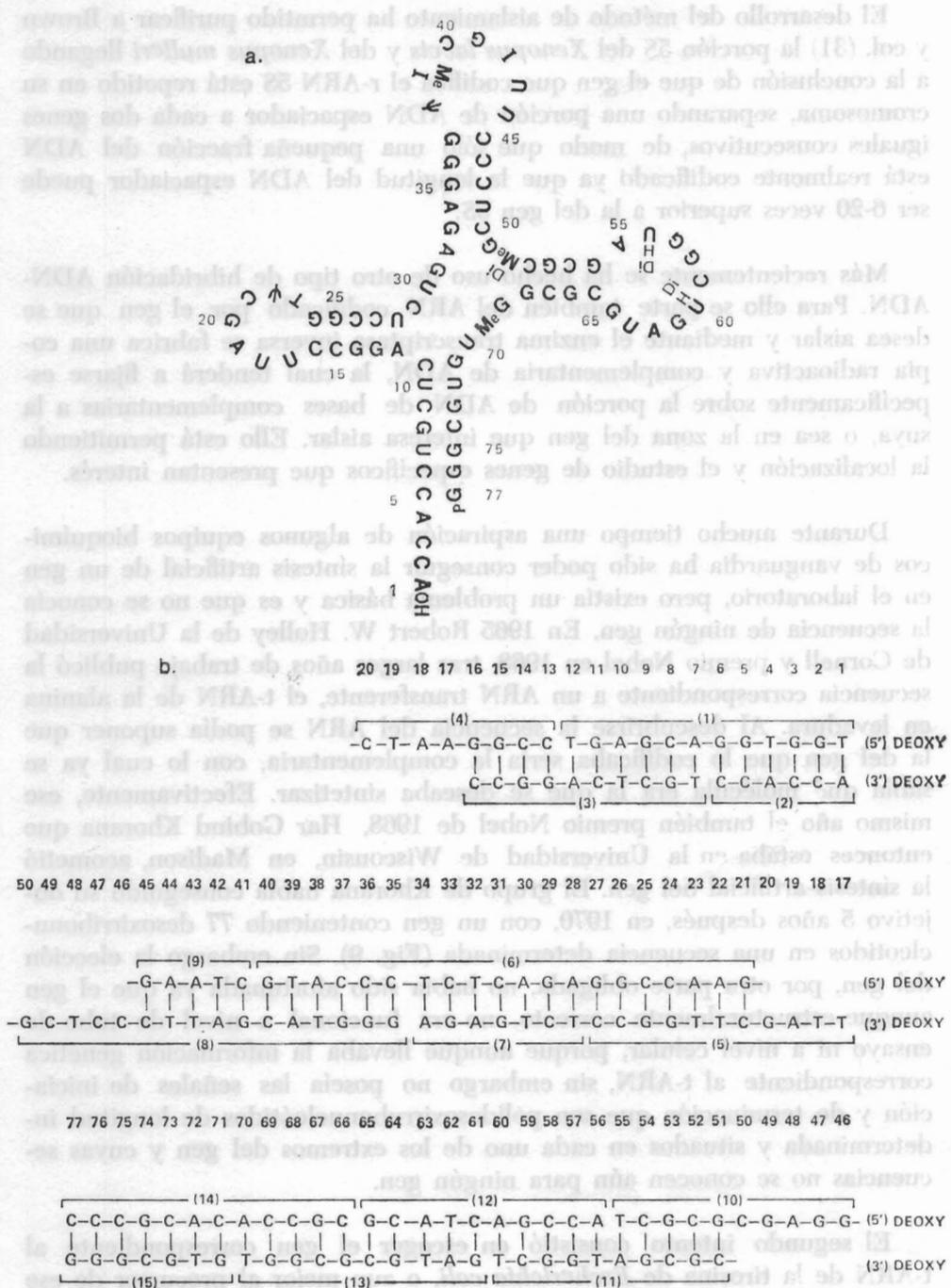


FIGURA 9.—Estructura del t-ARN de la alanina de levadura; fragmentos utilizados para su síntesis artificial.

t-ARN, ya que aunque este t-ARN transferente posee 85 nucleótidos, sin embargo biológicamente lo que se sintetiza es un precursor con 126 nucleótidos y por razones todavía no conocidas el fragmento extra de 41 nucleótidos se separa del fragmento mayor tras la síntesis. El precursor de 126 nucleótidos (Fig. 9) ha sido el sintetizado por el grupo de Khorana, actualmente en el Instituto Tecnológico de Massachussets, tal como comunicaron en agosto de 1973 en el 166th National Meeting of the American Chemical Society. La síntesis total se consiguió (Figs. 10 y 11)

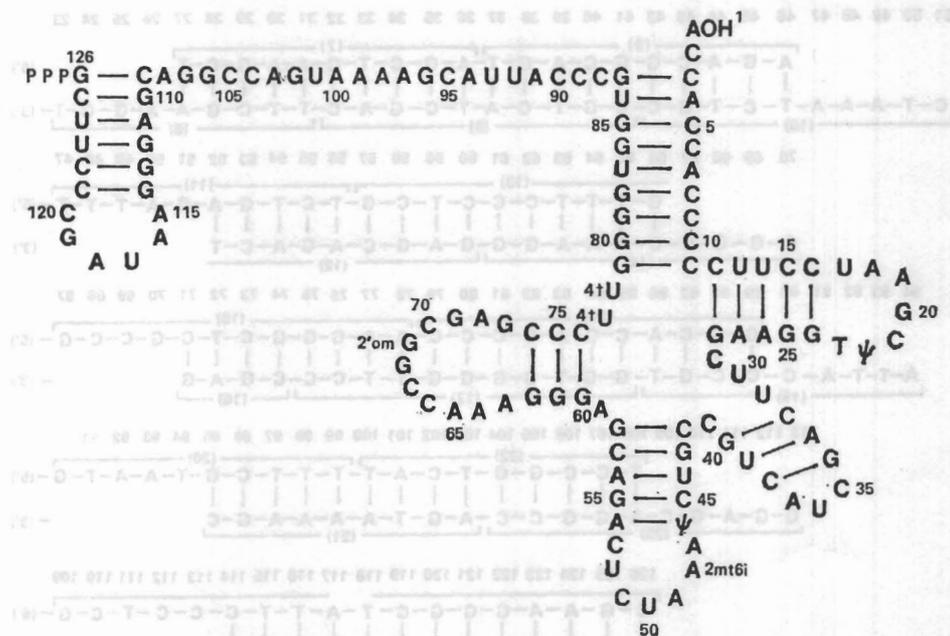


FIGURA 10.—Estructura del precursor del t-ARN de la tirosina de *E. coli*.

obteniendo primeramente segmentos cortos (10 a 14 nucleótidos) de cada una de las dos ramas complementarias que constituyen el gen. Al colocar en disolución segmentos complementarios de longitudes desiguales formaban un complejo bicatenario en el que la rama mayor queda sobresaliendo de la otra cadena complementaria, que puede ligarse al primer segmento mediante el enzima ADN ligasa y así sucesivamente.

El problema global aun no está resuelto pues para que el gen sea funcional necesitará probablemente la adición de las extremidades que contienen las señales de iniciación y terminación. Para dilucidar la composición de estas extremidades en el gen natural, el grupo de Khorana está realizando experiencias que exigen gran cuidado y paciencia basándose

en aislar una de las cadenas del gen natural y ponerla en presencia de uno u otro de los extremos del gen artificial, que forma un híbrido de doble hélice con aquella, dejando libre la zona del gen natural en que se encuentra la señal de iniciación o terminación. En presencia del enzima

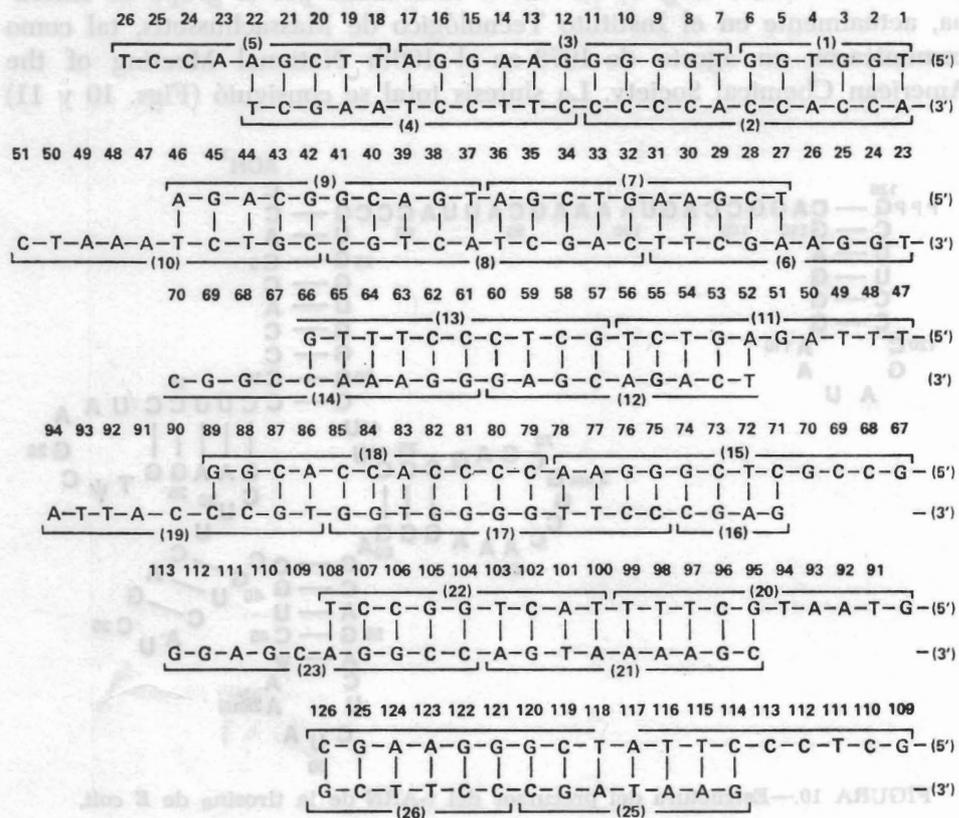


FIGURA 11.—Plan general de la síntesis del gen del precursor del t-ARN de la tirosina de *E. coli*.

ADN polimerasa y de desoxirribonucleótidos, tan sólo uno de los 4 desoxirribonucleótidos posibles se fijará en la extremidad vacante del gen artificial: el que sea complementario del primer desoxirribonucleótido no apareado situado en el gen natural. Repitiendo el proceso una y otra vez el equipo de Khorana espera tener éxito en su empeño de obtener un gen biológicamente activo, teniendo en cuenta que ya se tiene el medio biológico adecuado para probar si funcionará.

En efecto, gracias a los trabajos de John Smith y Sydney Altman en Cambridge, Inglaterra, se puede contar con un mutante de *E. coli* que

no realiza adecuadamente la síntesis de proteínas, precisamente debido a una anomalía en su t-ARN de la tirosina. Esta especie de "enfermedad congénita" puede ser resuelta cuando a la cepa mutante se le introduce el gen natural del t-ARN de la tirosina, previamente incorporado a un bacteriófago cuya misión es infectar las bacterias e introducir ese gen natural. Por ello, en el momento que se cuente con el gen artificial completo se podrá comprobar si funciona biológicamente, como cabe esperar que ocurra lógicamente, introduciéndolo dentro del citado mutante de *E. coli*.

Hasta aquí la realidad tangible. ¿Y las posibilidades futuras en este aspecto concreto de la Genética molecular? Los genes de los t-ARN son los más sencillos que existen, por lo cual aun resta un tremendo camino a recorrer hasta que se consiga un gen artificial que codifique a un enzima deficiente de una enfermedad congénita, más aún teniendo en cuenta de que a cada aminoácido de la proteína corresponden tres desoxirribonucleótidos en lugar de la correspondencia 1:1 entre el t-ARN y su gen, y, aun más complicado, cada aminoácido puede estar codificado por más de un codón. De todos modos, no existen obstáculos teóricos para pensar que con tiempo y trabajo sólido, en el futuro llegará un día que podrán estar disponibles genes artificiales que codifiquen a los enzimas defectuosos en el caso de errores congénitos del metabolismo. En una sección posterior consideraremos cuál es la situación actual respecto a la introducción de genes extraños en el material cromosómico de un huésped y cuáles son las perspectivas para un futuro más o menos inmediato.

Transcriptasa inversa.

Los virus tumorales conteniendo ARN tienen un alto interés biológico: producen cáncer en animales; se multiplican en las células sin interrumpir la división celular y poseen la información genética tanto para la producción del virus como para la transformación celular. La información genética del virus se integra en el cromosoma de la célula huésped en forma de un segmento de ADN copia del ARN del virus, denominándose provirus a esta información genética ya integrada.

Howard M. Temin, profesor de Oncología y de Investigación sobre el Cáncer en la Universidad de Wisconsin, había postulado hace años la necesidad de la existencia de una ADN polimerasa dependiente de ARN que podría efectuar la misión de copiar como ADN la información en forma de ARN. Sus investigaciones en búsqueda del enzima tuvieron

éxito y en el transcurso del Tenth International Cancer Congress en Houston, en 1970 expuso los resultados que demostraban que el virus del sarcoma Rous contenía una polimerasa de ese tipo (32). Simultáneamente el equipo de Baltimore, del Massachusetts Institute of Technology, obtuvo datos semejantes con el virion del virus de la leucemia en el ratón. Con ello quedaba gravemente dañado el que se denominaba Dogma Central de la Biología, que establecía que el flujo de la información genética había de tener lugar necesariamente en el sentido ADN \rightarrow ARN. También se eliminaba la dicotomía existente hasta entonces entre las teorías viral y genética del origen del cáncer y se soñó con la posibilidad de evitar la acción de los virus cancerosos por inhibición selectiva del enzima.

En estos últimos años la situación se ha complicado al haberse descubierto varias clases diferentes de ADN polimerasa dependientes del ARN, en tejidos normales, apoyando la idea expuesta ya hace años por Temin, de que el enzima puede poseer un papel fisiológico, convirtiendo mensajes de ARN hasta ADN en procesos como diferenciación, amplificación genética o respuestas inmunológicas.

Genética e interferón.

Las células de mamíferos se protegen por sí mismas contra el ataque por virus produciendo una proteína, el interferón, que de algún modo inhibe la replicación de los virus. Aunque no está totalmente claro lo que hace y como lo hace, las investigaciones sobre el interferón poseen un gran interés potencial para el tratamiento de enfermedades producidas por virus. El interferón tiene especificidad de especie, o sea que el de ratón lo fabrican las células del ratón y protege solo a las células de ratón y así sucesivamente. Por otra parte dentro de su especie, una clase de interferón protege contra la infección de virus muy diversos.

Las informaciones que se poseen parecen indicar que la producción de interferón puede estar gobernada por un modelo genético Operón, de modo que el inductor sería alguna sustancia producida como consecuencia de la invasión de la célula por el virus. A su vez el interferón podría ser el inductor de otro modelo Operón responsable de la producción de las llamadas proteínas antivíricas, que serían las que realmente actuarían impidiendo el proceso de la replicación del virus.

(32) H. M. TEMIN; *Scient Amer.*, 226, 25, 1972.

Actualmente se progresa en varios aspectos tales como: descubrimiento de inductores apropiados de la síntesis del interferón, producción del interferón en cultivos de células o conocimiento de los mecanismos de formación y de actuación.

Usando células híbridas de ratón-humano y varios agentes inductores de su síntesis, el equipo de Ruddle de la Universidad de Yale (20) ha encontrado que para que se induzca la síntesis de interferón es necesaria la colaboración de los cromosomas 2 y 5 y que para que exista respuesta antivírica también se necesita el cromosoma 21, de modo que con solo el cromosoma 21 las células no fabrican interferón, pero si se les suministra, sí poseen respuesta antivírica. Por tanto parece que son necesarios dos genes uno en el cromosoma 2 y otro en el 5 para codificar la síntesis del interferón, mientras que un gen en el cromosoma 21 puede codificar la síntesis de una proteína que interfiera por sí sola la replicación de los genes virales o que tenga algún papel sobre el lugar receptor para el interferón en la membrana celular.

En la actualidad el interferón ya ha tenido usos clínicos limitados, con éxitos notables en algunos casos. Conforme se conozca más sobre su síntesis o cuando se descubran los mecanismos genéticos que regulan su formación, será posible influir sobre el proceso y proteger preventivamente o curativamente a los seres humanos de las infecciones víricas con lo cual se podrá tener una tremenda arma de lucha para procesos tan dispares, en cuanto a gravedad, como son los que distan desde una simple gripe a un tumor canceroso, ambos producibles por virus.

Genética molecular de las inmunoglobulinas

Los anticuerpos o inmunoglobulinas ocupan un lugar central dentro de la Inmunología ya que son las moléculas responsables del reconocimiento de las moléculas extrañas o antígenos. De ahí que del estudio de su estructura y biogénesis se esperen resultados que sean aplicables en el futuro para resolver los problemas inmunológicos que pueden variar desde una reacción alérgica sin importancia hasta el problema del rechazo de órganos trasplantados pasando por la adquisición de inmunidades específicas mediante la aplicación de las vacunas correspondientes.

En 1972 les fue concedido el premio Nobel de Medicina a Rodney R. Porter y Gerald M. Edelman por sus investigaciones sobre la estructura de las inmunoglobulinas. Ciertamente hoy poseemos un conocimien-

to básico, e incluso, a veces, detallado sobre la arquitectura de estas macromoléculas lo que está permitiendo grandes avances en la comprensión de las interacciones antígeno-anticuerpo.

Indudablemente si la situación fuese similar en relación con la Genética de las Inmunoglobulinas, ello podría permitir extraordinarias aplicaciones de tipo clínico, pues se intentarían respuestas selectivas inmunológicas así como controlar el grado de tales respuestas. Sin embargo, la heterogeneidad representada por miles de moléculas diferentes, pero muy parecidas entre sí, ha venido planteando diversos problemas que han sido responsables de que nuestro conocimiento en este campo sea muy hipotético. De todos modos, también en este aspecto concreto de la Genética a nivel molecular, el propio Edelman, profesor de Bioquímica en la Universidad Rockefeller de Nueva York, ha expuesto como resultado de los datos existentes un cuerpo de doctrina (33), la teoría de los translocos, que abre nuevas posibilidades para que en el futuro se consiga por un lado el conocimiento científico que hoy nos falta y por otra parte el poder controlar las respuestas inmunológicas.

TRANSFERENCIA Y FUSION DE GENES

Los genes, o sea las moléculas de ADN propias, son los que caracterizan y definen a las diversas especies vivientes, conservando sus características propias. De este modo, en los organismos que se reproducen asexualmente, para que se conserve el concepto de especie, la Naturaleza ha de evitar que exista un intercambio de material genético, ADN, que sea biológicamente significativo entre grupos no relacionados. Por ello los organismos tan simples como las bacterias, incluso aquéllas que poseen bastante similitud entre sí, normalmente no intercambian su material genético cromosómico cuando se esté cultivando en un mismo medio de cultivo. El único ADN que a veces tienden a intercambiar son los plasmidios, unos pequeños trozos de ADN que existen aparte del ADN cromosómico. Puede ocurrir que un plasmidio tome un pequeño segmento de ADN cromosómico de su propia célula y lo transmita a otra célula bacteriana integrándose en el cromosoma de la célula receptora donde quedará expresado para sucesivas generaciones. Aunque es

(33) S. M. EDELMAN; Science, 180, 830, 1973.

tentador suponer que esta transferencia de genes extracromosómicos entre especies ha podido jugar un cierto papel en la evolución bacteriana, sin embargo el hecho no parece muy común en la Naturaleza, pues al menos durante el tiempo transcurrido en la época que podemos denominar de la Bacteriología moderna, es un hecho comprobado el que las características de las especies bacterianas comunes tienden a permanecer intactas.

En relación con la transferencia de genes y la evolución, existe la hipótesis de que los virus hayan podido jugar un papel importante ya que el ADN de ciertos virus se integrarían en el ADN de bacterias o de células de organismos más complejos y también podrían arrebatar de la célula huésped porciones de su ADN, así como integrarse en líneas germinales de la célula huésped, con lo cual, a través de tales vicisitudes, se podría introducir y trasladar informaciones genéticas entre especies, con sus correspondientes implicaciones evolutivas. Trabajos de Benveniste y Todaro (34, 35) publicados en 1974, tienden a apoyar esta visión, tras su estudio de un virus del tipo C, el RD 114, cuya secuencia de bases también se ha encontrado en los cromosomas de ciertas especies animales. Tras comprobar la homología existente entre el ADN viral y el ADN celular, la interpretación de sus resultados indica que hace 30-40 millones de años, el "virógeno" entró en las células germinales de un ancestro de los primates actuales y se fue transmitiendo a su descendencia como un gen celular (Fig. 12), posiblemente porque ello llevaba asociado una cierta ventaja selectiva, por lo que se ha conservado hasta la actualidad, aunque sufriendo a lo largo de la evolución algunas modificaciones en su secuencia polinucleótida tal como se deduce de los porcentajes de homología entre los ADN de los diferentes primates comparados con el ADN vírico, permitiendo así construir un árbol filogenético, que está bastante de acuerdo con los datos paleontológicos. Incidentalmente, ello es un ejemplo más de como del estudio a nivel molecular de la composición de macromoléculas actuales, se puede deducir la historia evolutiva de los seres vivos.

Por otra parte, el virus del tipo C también se ha encontrado en algunas especies de gatos domésticos, pero no en los felinos de Africa o Asia, lo cual según la interpretación que se muestra en la Fig. 13, tras el estudio de las correspondientes homologías entre las secuencias de ADN, in-

(34) R. E. BENVENISTE y G. J. TODARO; Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 4513, 1974.

(35) R. E. BENVENISTE y G. J. TODARO; Nature, 252, 456, 1974.

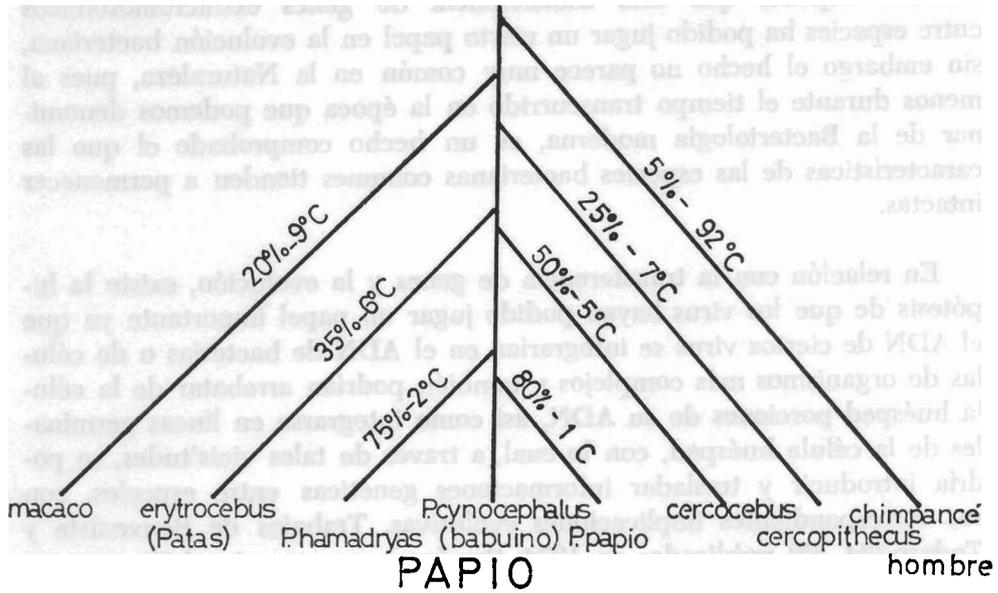


FIGURA 12.—Arbol filogenético con la evolución del virógeno en los diferentes primates deducidos de: a) porcentaje de similitud entre los ácidos nucleicos de tales primates y el del virus del babuino; b) la estabilidad técnica de los híbridos entre ácidos nucleicos (en °C)..

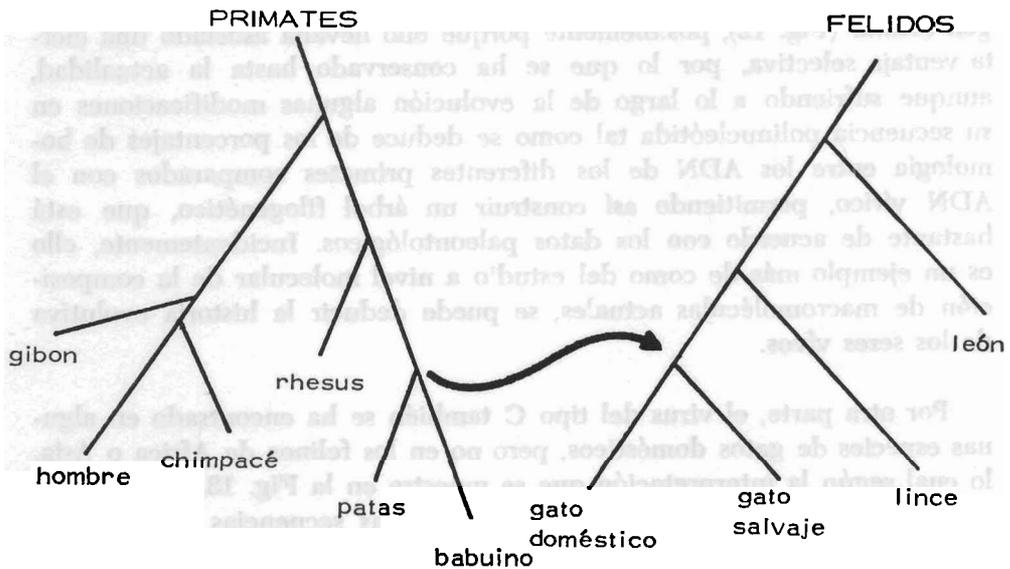


FIGURA 13.—Modelo posible que explica la transferencia del virus desde los primates a los félidos hace unos 15 millones de años.

dica que la información genética del viroide salió hace unos 15 millones de años para infectar a un antepasado del gato doméstico, integrándose en sus líneas germinales a partir de esta fecha. Si se confirman y extienden otros trabajos semejantes a los comentados aquí, se podrá probar sin duda la transferencia de información genética de una especie a otra, independientemente de la filogénesis, y, como caso particular, la perspectiva de que esa transferencia se pudiera realizar desde especies más evolucionadas a otras menos evolucionadas en un sentido contrario al que la evolución utiliza de una manera clásica. Ello serviría para poder establecer relaciones entre las ramas aisladas con que en la actualidad tendemos a representar los árboles filogenéticos evolutivos (36).

La posibilidad de poder construir a nivel de tubo de ensayo moléculas de ADN biológicamente funcional que poseyese información genética de dos dadores diferentes, ha sido un sueño de los científicos durante muchos años, pues ello abre las perspectivas de poder modelar, según sus deseos, el material genético, creando nuevos organismos modificados con las propiedades nuevas que vendrían determinadas por su nuevo material genético.

En 1973 fue posible comenzar a intentar llevar a la práctica ese sueño. Stanley N. Cohen y Annie C. Y. Yang de la School of Medicine de la Universidad de Stanford y Herbert W. Boyer y Robert B. Helling de la School of Medicine de San Francisco, de la Universidad de California, tuvieron éxito en sus intentos de tomar el ADN de dos plasmidios diferentes que se encontraban en bacterias intestinales *E. coli*, fusionarlos juntos e incluir la nueva estructura genética en otras células diferentes de *E. coli*, donde el ADN así introducido fue capaz de sufrir replicación y de expresar la información genética de los dos plasmidios originales. A partir de entonces quedó abierto el camino para intentar introducir plasmidios desde unas especies a otras diferentes; para introducir genes de animales en bacterias así como para unas muy diversas clases de manipulaciones genéticas.

En varios países hay diversos equipos científicos abordando este tipo de experimentación y quizá los grupos más avanzados en la actualidad son los de Stanford con Paul Berg, David S. Hogness, Ronald W. Davis y Stanley Cohen; el de H. Boyer en San Francisco; el de John Morrow en la Institución Carnegie de Baltimore; el de N. Murray y K. Murray en Edimburgo y el de A. Rambach, P. Tiollais y P. Kourilsky del Insti-

(36) Y. CHRISTEN; *La Recherche*, 6, 271, 1975.

tuto Pasteur de París. Las nuevas técnicas según ha dicho Brenner (37), "generarán el período más excitante de la Biología, que durará al menos unos 10 años".

Para poder llevar a cabo la construcción de nuevos genes es necesario poder resolver, en principio, estos cuatro problemas:

1. Tener un método para romper las moléculas de ADN obtenidas de orígenes diferentes, así como para poderlas unir posteriormente;
2. Disponer de un gen portador capaz de replicar por sí solo, pero que también pueda sufrir replicación cuando se le añade el ADN mixto y se le una;
3. Tener desarrollado un procedimiento para poder introducir la molécula mixta de ADN en células funcionales, normalmente bacterias;
4. Poder seleccionar de una gran población de células un "clon" o población de células receptoras que han adquirido el ADN mixto, separándolas del resto de las células normales.

El procedimiento de la transferasa terminal para unir moléculas diferentes de ADN es bastante laborioso y se resume en la Fig. 14. Si se parte de moléculas normales de ADN circulares de 2 ramas, que entre sí están unidas por enlaces por puente de hidrógeno entre bases complementarias, primeramente se produce una ruptura del círculo mediante un enzima, una endonucleasa, con lo cual se obtienen moléculas lineales de ADN con 2 ramas complementarias. Sobre estas últimas moléculas se hace actuar otro enzima hidrolítico producido por el virus bacteriano lambda y que recibe el nombre de exonucleasa λ , ya que va separando nucleótido del extremo 5'. (El extremo que posee un fosfato en el carbono 5 de la desoxirribosa) de cada una de las ramas del ADN, con lo cual los extremos 3' quedan libres en cuanto no poseen bases complementarias enfrente. La próxima etapa consiste en ir añadiendo, con la ayuda del enzima terminal nucleotidil transferasa (38), un segmento homopolimérico de rama sencilla, por ejemplo poli-dA, al extremo 3' de una porción de las moléculas de ADN, y otro segmento homopolimérico, por ejemplo poli-dT, al extremo 3' de otra porción de moléculas de ADN, con lo que al ser esos nucleótidos complementarios cuando se mezclan las dos especies de ADN juntas, tienden a unirse esos fragmentos com-

(37) C. NORMAN; *Nature*, 254, 6, 1975.

(38) K. KATO, J. M. GONÇALVES, G. E. HOUTS, J. J. BOLLUM; *J. Biol. Chem.*, 242, 2780, 1967.

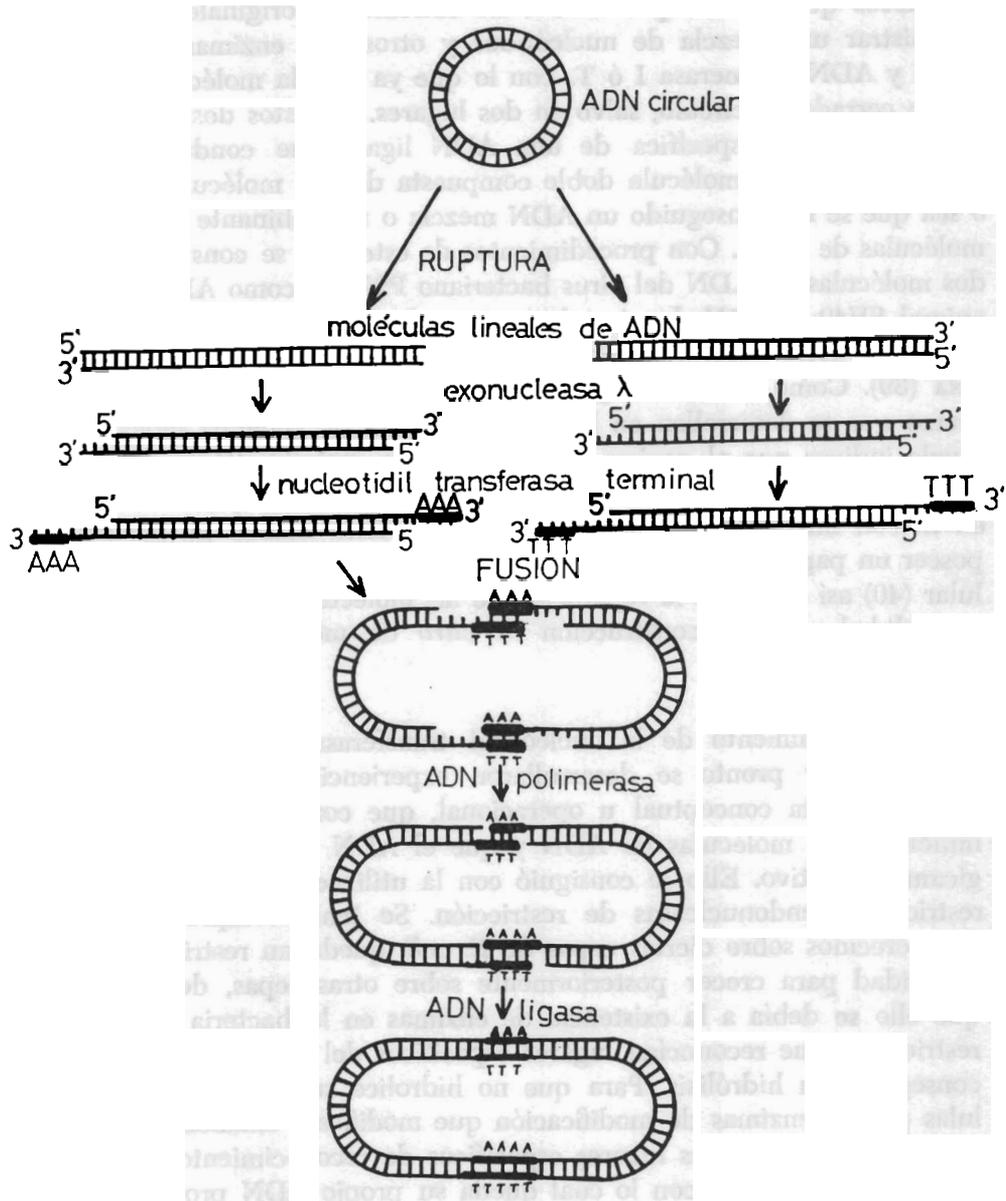


FIGURA 14.—Procedimiento de la nucleotidil transferasa terminal por la unión de 2 moléculas diferentes de ADN, formando una sola molécula compuesta de ADN. Detalles en el texto. (Adaptado de (43)).

plementarios por enlaces por puente de hidrógeno, produciéndose un anillo compuesto por dos moléculas de ADN combinadas.. Para rellenar los huecos que quedan próximos a los extremos 5' originales se pueden suministrar una mezcla de nucleótidos y otros dos enzimas, exonucleasa III y ADN polimerasa I ó T₄ con lo que ya está la molécula prácticamente cerrada en círculo, salvo en dos lugares. En estos dos sitios se necesita la acción específica de una ADN ligasa que conduce hasta la obtención de una molécula doble compuesta de dos moléculas de ADN, o sea que se ha conseguido un ADN mezcla o recombinante de otras dos moléculas de ADN. Con procedimientos de este tipo se consiguieron unir dos moléculas de ADN del virus bacteriano P22, así como ADN del virus animal SV40 a ADN de virus bacteriano P22, o ADN del SV40 a una porción de ADN cromosómico de *E. coli* que portaba el Operón galactosa (39). Como índice del grado de competencia y del rigor y del esfuerzo que se desarrollan en las investigaciones de genética molecular se puede indicar que el enzima ADN ligasa fue casi simultáneamente descubierto a finales de 1967 en no menos de cinco laboratorios diferentes en *E. coli* infectado o no con bacteriófagos. Este enzima ha demostrado poseer un papel biológico esencial en la replicación normal del ADN celular (40) así como en la reparación de las moléculas de ADN, aparte de su utilidad para la construcción *in vitro* de moléculas recombinantes de ADN.

El procedimiento de la nucleotidil transferasa terminal es bastante complicado y pronto se desarrollaron experiencias diferentes desde el punto de vista conceptual u operacional, que con mayor sencillez permitieron unir moléculas de ADN y que el ADN resultante fuese biológicamente activo. Ello se consiguió con la utilización de los enzimas de restricción o endonucleasas de restricción. Se tenía comprobado que los virus crecidos sobre ciertas cepas de *E. coli*, quedaban restringidos en su capacidad para crecer posteriormente sobre otras cepas, demostrándose que ello se debía a la existencia de enzimas en la bacteria (enzimas de restricción) que reconocían lugares específicos del ADN vírico extraño y conseguían su hidrólisis. Para que no hidrolice su propio ADN, las células poseen enzimas de modificación que modifican, añadiéndoles grupos metilos, a bases en los lugares específicos de reconocimiento por los enzimas de restricción, con lo cual queda su propio ADN protegido de la hidrólisis.

(39) D. A. JACSON, R. H. SYMONS, P. BERG; Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 69, 2904, 1972.

(40) F. R. LEHRMAN; Science, 186, 790, 1974.

Los enzimas endonucleasas de restricción están ampliamente distribuidos y hoy se conocen ya más de 50 que permiten obtener *in vitro* fragmentos de ADN conteniendo un solo o sólo unos pocos genes. El enzima más utilizado es el procedente de *E. coli* denominado Eco RI, que tal como muestra la Fig. 15, reconoce una secuencia muy específica, rom-

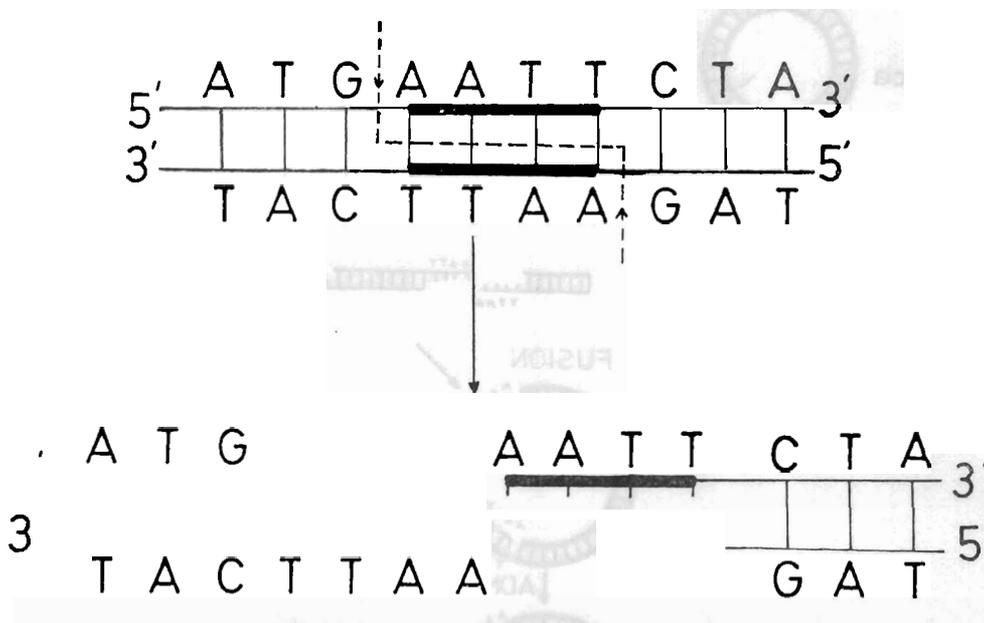


FIGURA 15.—Acción específica del enzima Eco RI actuando como endonucleasa de restricción y produciendo extremos libres de secuencias AATT susceptibles de condensarse con otros segmentos complementarios AATT unidos a otra molécula de ADN.

piendo la molécula en lugares donde los nucleótidos complementarios están dispuestos con simetría rotacional. Además, las roturas en cada rama se hacen reparadas 4 nucleótidos con lo que se obtienen fragmentos de ADN con extremidades cohesivas, es decir, susceptibles de aparearse entre ellas. Como resultado de ello cualquier molécula de ADN que se haya tratado con la Eco RI tiende a unirse por puentes de hidrógeno, apareando 4 bases, con otra molécula de ADN que haya sufrido el mismo tratamiento.

Cohen y colaboradores (41), usaron un pequeño plasmidio de *E. coli*, el pSC 101 que entre su información genética posee la propiedad de conferir resistencia al antibiótico tetraciclina. El pSC 101 fue sometido a

(41) S. N. COHEN, A. C. Y. CHANG, H. W. BOYER y R. B. HELLING; Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 70, 3240, 1973.

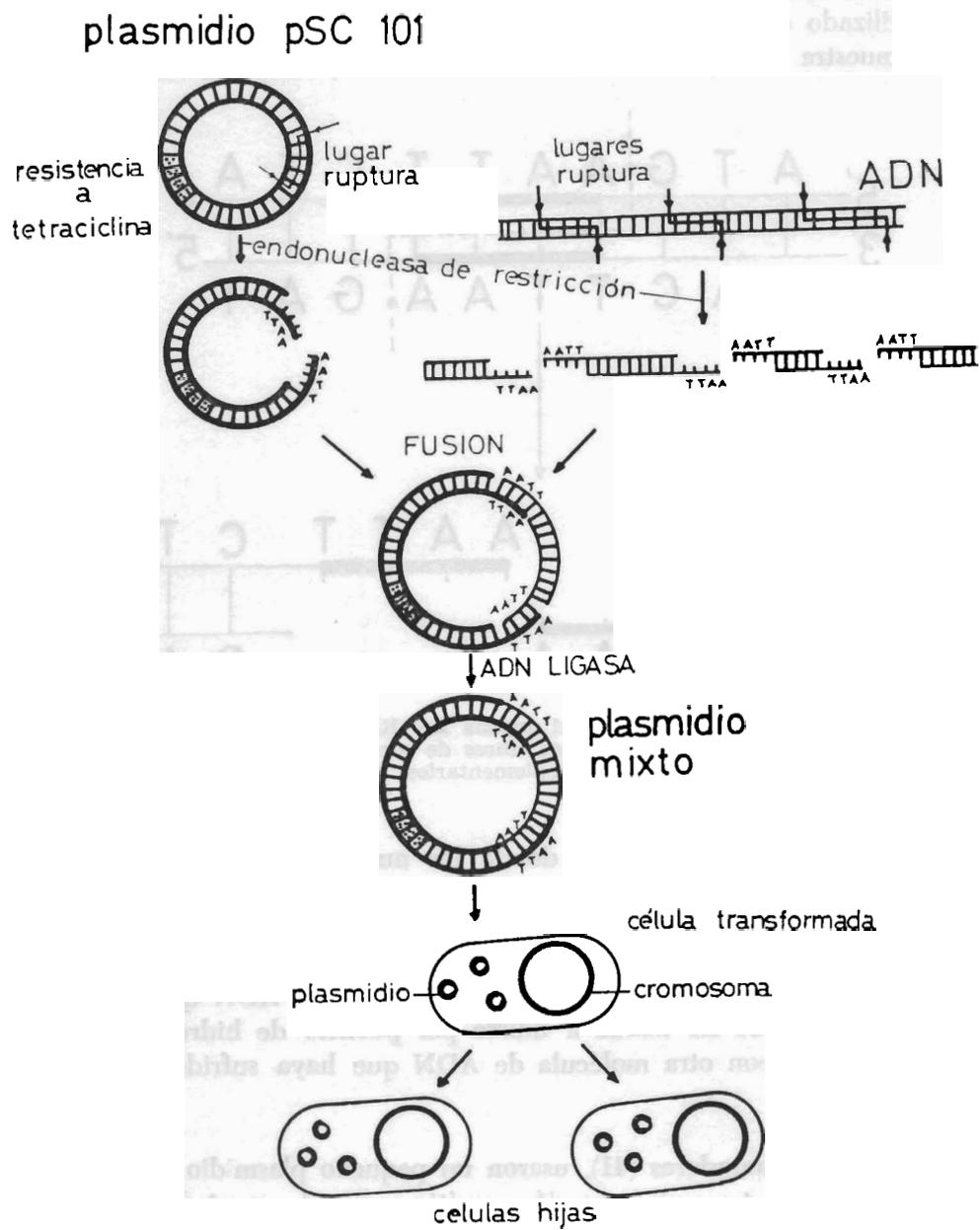


FIGURA 16.—Formación de ADN recombinante por el método de la endonucleasa de restricción. Detalles en el texto. Adaptado de (43).

la acción hidrolítica del enzima de restricción Eco RI comprobándose tal como se puede observar en la Fig. 16, que sólo se había producido ruptura en una zona de la molécula de ADN. Si esta zona de ruptura se volvía a reparar usando ADN ligasa, el plasmidio volvía a tener sus características biológicas iniciales pudiendo introducirse en *E. coli* y replicar allí, confiriendo la resistencia a la tetraciclina. Por otra parte se pudo realizar la misma reacción de ruptura con Eco RI, usando otro plasmidio de *E. coli*, que proporcionaba resistencia hacia el antibiótico kanamicina, con lo cual ya se disponía de 2 moléculas diferentes de ADN, unas procedentes de un plasmidio y otras del otro y aptas para ser ligadas entre sí. Efectivamente, la unión se produjo y el cierre circular completo del ADN se consiguió con ADN ligasa, obteniéndose así un ADN mixto recombinante que se introdujo en *E. coli*, encontrándose que algunas células de *E. coli* poseían simultáneamente resistencia hacia los antibióticos tetraciclina y kanamicina. El plasmidio mixto resultante contenía todo el segmento completo de ADN del plasmidio pSC 101 y un fragmento del ADN del otro plasmidio, el que llevaba la información para la resistencia a la kanamicina, pero que no era replicativo por sí solo, o sea que el pSC 101 había servido como vector de introducción de un trozo de ADN extraño en las células de *E. coli*.

El éxito obtenido indujo a que durante 1974 (42) se abordasen otras posibilidades, introduciendo genes de otras especies en plasmidios de *E. coli*. Así se pudo aplicar el procedimiento antes reseñado al plasmidio pl 258, perteneciente a otra bacteria, el *Staphylococcus aureus*. Con Eco RI se fragmentaba en cuatro partes el plasmidio, que presentaba resistencia a la penicilina, y tras la fusión con el pSC 101, tratamiento con la ligasa e introducción en *E. coli*, se comprobó que se había obtenido también una nueva especie de ADN que poseía simultáneamente las características de los dos plasmidios, el estafilocócico y el de *E. coli*. Tal como indicó Cohen (43): se podían extraer consecuencias importantes de este tipo de experiencias: "La replicación y expresión en *E. coli* de genes derivados de un organismo ordinariamente incapaz de intercambiar genes con *E. coli*, representó una brecha en las barreras que separan normalmente las especies biológicas. La masa de información genética expresada en la bacteria transformada, la define como *E. coli*, pero las células transformadas también poseen moléculas biológicas derivadas de una especie diferente, el *S. aureus*. El hecho de que los genes extraños se sitúen sobre un plasmidio significa que se pueden aislar y

(42) A. C. CHAG y S. N. COHEN; Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 71, 1030, 1974.

(43) S. N. COHEN; Scient. Amer., 233, 25, 1975.

purificar fácilmente en grandes cantidades para su estudio posterior. Más aún, existe una posibilidad de que se puedan introducir genes en *E. coli*, que es muy fácil de crecer, y que estos genes especifiquen una amplia variedad de funciones metabólicas o de síntesis como capacidad de realizar fotosíntesis o de producir antibióticos, características que son propias de otros seres, biológicamente muy diferentes. De un modo especial, el plasmidio pSC 101 podría introducir moléculas de ADN de organismos superiores complejos dentro de huéspedes bacterianos, haciendo posible aplicar la genética bacteriana, que es relativamente simple, y las técnicas bioquímicas para poder estudiar los genes de las células animales”.

No es extraño, por tanto, que el mismo grupo de Cohen en 1974 (44), pudiera obtener un fragmento de ADN, generado con la endonucleasa de restricción, procedente del sapo *Xenopus laevis*, y que contenía los genes de codificación que codifican los ARN ribosómicos 18S y 78S. Este fragmento de ADN se insertó en el plasmidio pSC 101 y la molécula recombinante de ADN así obtenida, mixta entre la de un animal y de un microorganismo, se introdujo en *E. coli*, donde replicó de un modo estable sintetizándose ARN complementario al ADN ribosómico propio del *Xenopus laevis*.

Otros grupos de trabajo han utilizado otros plasmidios como vectores de introducción de las moléculas de ADN, existiendo al menos dos de ellos ya usados que poseen también un solo lugar de ruptura para la acción de la Eco RI y además en una posición que no interfiere con los genes esenciales. Por otra parte, simultáneamente, los investigadores de la Universidad de Edimburgo (45), los de Stanford (46) y los del Instituto Pasteur (47), también han obtenido mutantes del fago lambda (que infecta normalmente a *E. coli*), que se puede utilizar como vector, ya que el fago normal no va bien pues la Eco RI corta su ADN en dos lugares esenciales para la multiplicación del fago, por lo que se han de utilizar mutantes que hayan perdido esos lugares de corte. El inconveniente del uso de fagos como vectores es que sólo 1 de 100.000 fagos penetra bien en la célula bacteriana huésped, mientras que las técnicas para incorporar plasmidios son mucho más efectivos. Por el contrario, la gran ventaja es que su velocidad de multiplicación es muy alta. En términos cuanti-

(44) J. F. MORROW, S. N. COHEN, A. C. Y. CHANG, H. W. BOYER, H. M. GOODMAN y R. B. HELLING; Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 71, 1743, 1974.

(45) N. E. MURRAY y K. MURRAY; Nature, 251, 476, 1974.

(46) M. THOMAS, J. R. CAMERON y R. W. DAVIS; Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 71, 4579, 1974.

(47) A. RAMBACH y P. TIOLLAIS; Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 71, 3927, 1974.

tativos de ADN, un microgramo de ADN puede dar de 10.000 a 100.000 fagos. Además, el control del crecimiento y de la transmisión de un fago es mucho más fácil que el de un plásmido y como consecuencia el riesgo de una diseminación accidental incontrolada es menor. El ADN mixto del fago y de la porción a integrar, una vez introducido en *E. coli* da lugar a la obtención de fagos viables, pero en algunos casos tras la acción del enzima Eco RI sobre el fago λ , su ADN presenta una delección tan grande que aunque el cromosoma residual lleva todos los genes esenciales al crecimiento viral, no se forma ningún fago viable.

La organización de cromosomas complejos como el de la mosca de la fruta, *Drosophila*, se está estudiando en Stanford por David Hoggen y R. Davis, fraccionando el cromosoma en porciones que corresponden a uno solo o a pocos genes, que a través de un vector se introducen en bacterias. El número de genes diferentes en un manifiesto no es conocido bien, pero en una primera aproximación se podría indicar que mientras el pequeño virus SV40 posee de 6 a 10 genes el número se incrementaría hasta 3.000 en el caso de una bacteria como *E. coli* y sería más de diez veces superior, quizá entre 30.000 y 40.000 genes en el caso de un mamífero como el ratón.

En los pasados últimos meses se han desarrollado procedimientos para poder seleccionar los genes específicos que queramos estudiar procedentes de organismos superiores. Para ello se utilizan moléculas específicas de ARN codificadas por esos genes y marcadas radioactivamente. De este modo no es necesario purificar los genes que se desean estudiar e introducir en la bacteria, sino que se pueden transformar las bacterias con una población heterogénea de segmentos de ADN de células animales y después se aísla solamente aquel grupo en que están los genes que producen una especie particular de ARN, capaz de hibridarse con su ADN del gen. Asimismo ello hace posible el aislar grupos de genes que se expresan de un modo específico, en un estado particular del desarrollo animal, lo cual abre unas perspectivas inmensas al estudio molecular de procesos tales como el desarrollo y diferenciación, en los que se acepta que el estado diferenciado de un tipo dado de célula, bien sea por ejemplo nerviosa o epidérmica, está asociado con la actividad de un grupo particular de genes, junto con la inactividad total de los genes asociados a la diferenciación de los demás tipos de células. Ello es tanto más importante si consideramos que como señalan recientemente R. Holliday y E. Pugh (48), en una revisión sobre los mecanismos de modificación

(48) R. HOLLIDAY y J. E. PUGH; Science, 187, 226, 1975.

del ADN y la actividad de los genes durante el desarrollo, hemos de reconocer nuestra casi completa ignorancia del mecanismo del desplegamiento que ha de sufrir el programa genético durante el desarrollo. Es de esperar que con las nuevas técnicas se puedan estudiar los genes que intervienen en cada fase de esos procesos, lo que proporcionará datos de un valor incalculable.

Aun cuando las posibilidades potenciales de las técnicas de introducción y fusión del material genético de diversa procedencia parecen ser amplísimas, quizá fuese interesante fijarnos en una sola de ellas, muy llamativa y que podría representar una auténtica revolución para la producción de alimentos: la manipulación de los genes responsables de la fijación del nitrógeno con la finalidad de conseguir aumentar la producción de proteínas de alta calidad.

El nitrógeno de nuestros alimentos se deriva del nitrógeno atmosférico, mediante el mecanismo que denominamos fijación de nitrógeno. Aproximadamente la mitad del total del nitrógeno fijado anualmente lo hace con el concurso de organismos fijadores del nitrógeno tales como las bacterias de los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas.

Durante este último cuarto de siglo se ha estimado que el crecimiento de la población y los cambios en los hábitos harán necesario que las cosechas actuales tengan que duplicarse y entre los factores limitantes del aumento de rendimiento, uno de los principales es el problema de la fijación del nitrógeno, ya que en ausencia de otras tecnologías alternativas se necesitarán al final de siglo unas 200×10^6 toneladas métricas de fertilizantes nitrogenados por año (49) contra unos 40×10^6 toneladas utilizadas en 1974 o las 4×10^6 toneladas necesitadas en 1950. Por otra parte la producción de fertilizantes necesita una gran energía que en la actualidad se estima equivale a unos 2×10^6 barriles de petróleo diarios. Aun cuando numerosos investigadores de diversas disciplinas se dedican a la investigación y búsqueda de nuevas tecnologías para producir mayor fijación de nitrógeno, a nosotros nos interesa revisar la posible utilización de la técnica de hibridación genética para la solución del problema.

El sistema enzimático complejo responsable de la fijación del nitrógeno se denomina nitrogenasa y su control y estructura está gobernada genéticamente por el Operón nitrógeno, que podemos denominar "fin", abreviatura de fijador de nitrógeno. Este Operón se ha conseguido transferir por

(49) R. F. HARDY y H. D. HAVELKA; *Science*, 188, 634, 1975.

transducción o conjugación a bacterias heterotróficas y algas azul-verdes y en 1974, al menos en un caso, se ha señalado ya la obtención de una nueva cepa de *E. coli* capaz de fijar nitrógeno (50). Ensayos de este tipo han estimulado a los investigadores a pensar en experimentos similares con sistemas vegetales e incluso animales, y algunos de ellos están en

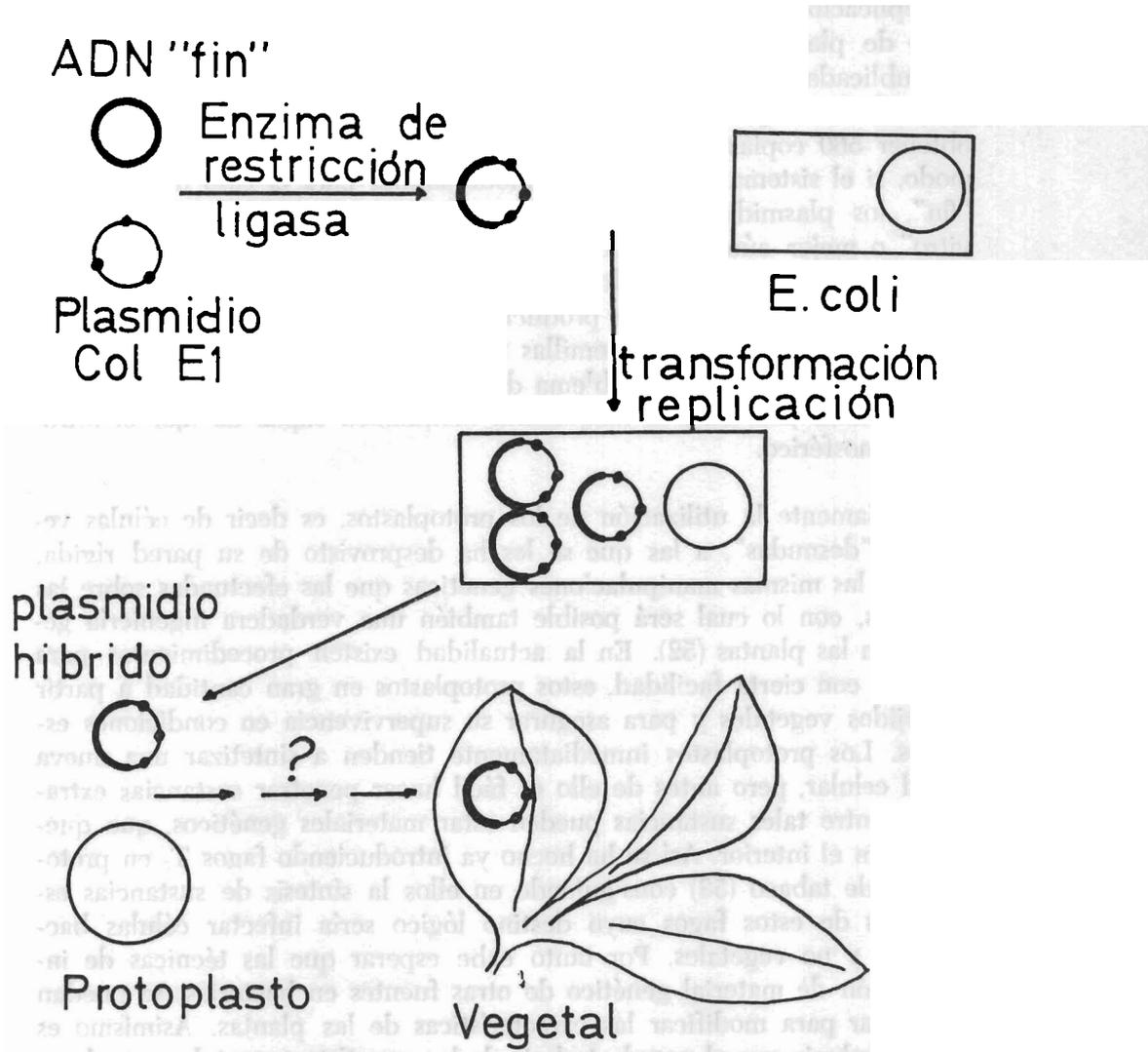


FIGURA 17.—Etapas previstas para la producción y transferencia de plasmidios conteniendo genes fijadores de nitrógeno, "fin", hasta plantas superiores, que no necesitarían fertilizantes nitrogenados.

(50) F. C. CANNON, R. A. DIXON, J. R. POSTAGE, S. B. PRIMROSE; *J. Gen. Microbiol.*, 80, 227, 1974.

marcha (51). Se pretende, tal como muestra la Fig. 17, en primer lugar poder contar con un gran número de plasmidios con genes "fin". Para ello plasmidios "fin" procedentes de ciertas bacterias seleccionadas, se insertarán en el plasmidio Col E1 de *E. coli*, mediante el enzima de restricción y la ADN ligasa. El plasmidio Col E1 posee una alta velocidad de replicación en *E. coli* lo que conducirá a un gran aumento en el número de plasmidios mixtos por célula de *E. coli*. En experiencias aún no publicadas hace poco tiempo (51 bis), Helsinki y colaboradores han insertado un Operón triptófano en el plasmidio Col E1, consiguiendo obtener 560 copias del plasmidio mixto por célula de *E. coli*. De este modo, si el sistema trabaja de un modo similar para el caso de los genes "fin", los plasmidios mixtos podrían usarse para la transcripción "in vitro" o mejor aún para poder transferir esos plasmidios a protoplastos del material vegetal deseado. Esos protoplastos serían crecidos en cultivos y rediferenciados para producir plantas maduras cuya información genética va a llevarían las semillas para futuras generaciones con lo que se tendría así resuelto el problema de la fertilización nitrogenada, ya que estas plantas poseerían la maquinaria bioquímica capaz de fijar el nitrógeno atmosférico.

Previamente la utilización de los protoplastos, es decir de células vegetales "desnudas", a las que se les ha desprovisto de su pared rígida, permite las mismas manipulaciones genéticas que las efectuadas sobre las bacterias, con lo cual será posible también una verdadera ingeniería genética en las plantas (52). En la actualidad existen procedimientos para obtener, con cierta facilidad, estos protoplastos en gran cantidad a partir de tejidos vegetales y para asegurar su supervivencia en condiciones estériles. Los protoplastos inmediatamente tienden a sintetizar una nueva pared celular, pero antes de ello es fácil hacer penetrar sustancias extrañas, y entre tales sustancias pueden estar materiales genéticos, que quedarían en el interior. Así se ha hecho ya introduciendo fagos T₃ en protoplastos de tabaco (53) consiguiendo en ellos la síntesis de sustancias específicas de estos fagos cuyo destino lógico sería infectar células bacterianas y no vegetales. Por tanto cabe esperar que las técnicas de introducción de material genético de otras fuentes en bacterias, se puedan extrapolar para modificar las características de las plantas. Asimismo es lógico deducir que el pesado trabajo de los genetistas vegetales, que hace

(51) K. T. SHANMUGAN y R. C. VALENTINE; Science, 187, 919, 1975.

(51 bis) V. HERSHFELD, H. W. BOYER, C. XANOSKY, M. A. LOVETTY y D. R. HELINSKY; Proc. Nat. Acad. Sci., USA. A publicar en 1975.

(52) L. SCHILDE-RENTSCHIER; La Recherche, 56, 430, 1975.

(53) P. S. CARLSON; Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 70, 598, 1973.

que se hayan de esperar años e incluso decenios para obtener el producto deseado, se pueda reducir drásticamente con el uso de los protoplastos para el aislamiento de mutantes: las hojas se descompondrán en protoplastos que serán tratados por un agente mutágeno (rayos γ o UV, productos químicos) y el uso de medios de cultivo adecuados permitirá escoger las células que posean los caracteres buscados. Ya se tienen datos (53) sobre obtención de mutantes de tabaco resistentes a ciertas enfermedades propias de esa planta. Asimismo se han obtenido plantas híbridas por fusión de protoplastos procedentes de dos especies diferentes. Las plantas así obtenidas son semejantes a los híbridos sexuales cuya obtención o bien es muy larga, o imposible, en razón a la esterilidad.

Para terminar con esta sección podemos hacer un repaso de algunas perspectivas que se espera, o al menos se desea, que algún día se hagan realidad como consecuencia de los avances que se consigan en la Genética bioquímica y que han sido publicados en revistas científicas competentes:

1. Usar los llamados enzimas de restricción para dividir el material genético de los cromosomas humanos en fragmentos que posean unos solos pocos genes cada uno de ellos. Estos miles de fragmentos se irían introduciendo en bacterias, seleccionando aquellas cepas que contengan el gen que interesa, tal como el que transcribe hasta la insulina o proinsulina.

2. Aislamiento o síntesis del gen humano responsable de la síntesis de la proinsulina e inserción en bacterias, que serían cultivadas en medios adecuados, funcionando como verdaderas fábricas de insulina. La situación actual ha llegado a tal grado de madurez que, en el mes de septiembre de 1975, la Imperial Chemical Industry (ICI) ha decidido construir en Cheshire (Gran Bretaña) unas instalaciones con todas las normas de seguridad acordadas en la conferencia de Asilomar, donde pretenden, entre otras cosas, la producción masiva de insulina por medio de bacterias manipuladas.

3. Fabricación de nuevas vacunas, incluyendo en bacterias a los genes que codifiquen a ciertas proteínas virales, con lo que se podría llegar a una masiva producción de estas proteínas, a partir de las cuales se producirían las vacunas.

4. Introducción de genes en bacterias y cultivo posterior de éstas para obtener sustancias interesantes desde el punto de vista industrial o alimentario.

RIESGOS Y PERSPECTIVAS DE LA GENÉTICA MOLECULAR

Al ir considerando los avances conseguidos en los últimos años de descubrimiento dentro de la Genética molecular también hemos ido apuntando las posibilidades futuras a que conducirá probablemente su desarrollo previsible. Como complemento de ello, puede ser interesante el que repasemos también algunos de los riesgos que tal desarrollo puede comportar, sobre todos aquellos a los que teme más el gran público. En cuanto a las perspectivas nos detendremos especialmente en aquellas relacionadas con la genética humana.

Guerra biológica y manejos genéticos

No podemos olvidar que los EE. UU. invirtieron muchos millones de dólares en los laboratorios de Fort Detrick, Maryland, de la U.S. Army dedicados a las investigaciones para desarrollar microorganismos adecuados para la guerra biológica, intentando sin mucho éxito mejorar la letalidad de virus y bacterias dañinos al hombre. Es de suponer que en Rusia u otros países existen instalaciones semejantes a la norteamericana.

En el estado actual de la manipulación genética, con las moléculas de ADN recombinantes, tal como hemos comprobado en la Sección anterior, no existe problema técnico en aislar los genes responsables de la producción de una toxina, por ejemplo, e insertarlos a través de un fago en cepas de *E. coli*, que podrían ser "bombardeadas" fácilmente sobre poblaciones enemigas. Este ejemplo y otros muchos tan terribles o peores son realizables hoy día y es uno más de los riesgos que los humanos tendremos que aprender a soportar, aun cuando es de esperar que las consideraciones éticas sean suficientes para que ni los gobernantes intenten llevar a cabo acciones de ese tipo, ni los científicos presten colaboración a programas de esa clase, para los cuales hoy no existen grandes dificultades técnicas ni científicas.

Peligro de la propia experimentación

En los últimos 30 años han ocurrido más de 5.000 infecciones en laboratorios, a pesar de que la mayoría de los cuales estaban especialmente controlados en cuanto a normas de seguridad. Entre los casos más cono-

cidos podemos citar que un accidente en la manipulación del virus de la viruela en la London School Hygiene and Tropical Medicine produjo en 1973 un grave brote de viruela en Londres, lo que hizo que el Gobierno inglés creara un Comité especial, el Comité Goldberg, encargado de dictar y examinar las normas de seguridad en los laboratorios que trabajan con patógenos peligrosos.

Algunas personas han señalado la posibilidad de que ocurran accidentes imprevistos en laboratorios que están dedicados a técnicas de ingeniería genética tales como la integración de unos genes en otros. Entre los riesgos que temen, figura el que al usar los enzimas de restricción para aislar los genes deseados, estos genes puedan estar acompañados de segmentos de ADN con propiedades desconocidas y, por tanto, con consecuencias que se salgan de todo control previsto. Asimismo, cabe dentro de lo imaginable que al romper los genes de un virus, sus propiedades queden modificadas de tal manera que si previamente no era infectivo se convierta posteriormente en infectivo. Sobre el control de este tipo de experimentaciones nos ocuparemos más adelante.

Evidentemente todos los riesgos anteriores y otros aun desconocidos hay que evaluarlos, pero no sobrevalorarlos y sobre todo nos tranquilizará tener en cuenta que los riesgos que nos rodean normalmente en el transcurso de nuestra vida son más reales y muchas veces más peligrosos que los hipotéticos acabados de señalar.

Más aún, el conocimiento íntimo del material genético puede servirnos también para descubrir otros riesgos que hasta ahora han pasado desapercibidos.

Hace unos dos años, los científicos del Bureau of Biologics of the Food and Drug Administration de EE. UU., señalaban que todas las vacunas con virus vivos estaban bastantes contaminadas con fagos. Algunos biólogos creen que los efectos ya conocidos de los fagos en células humanas o de mamíferos son de suficiente envergadura para hacernos obligar a que no deban aplicarse más vacunas contaminadas con fagos. Los efectos de los fagos sobre los humanos pueden ser diversos. Un efecto indirecto es que ciertas enfermedades humanas tales como la escarlatina o difteria, pueden ser ocasionadas porque hay fagos que infectan a bacterias y hacen que se produzca una toxina. En tal caso, si una persona toma, por ejemplo, una vacuna vírica contra la polio por vía oral, contaminada con fagos, sería posible que éstos actuasen infectando a bacterias intestinales adecuadas para ocasionar difteria.

Otro segundo efecto es que los fagos transmiten genes a las células humanas, al menos en cultivos de tejidos. Los genes así transmitidos, cabe la posibilidad de que sean capaces de causar cáncer o ciertas enfermedades degenerativas a los seres humanos.

El tercer y último efecto de los fagos sobre las células de mamíferos es que, al menos ciertos fagos, pueden replicar en células de hamster en cultivo. Lo mismo podría ocurrir en células humanas, al menos teóricamente.

El problema está planteado de este modo, sin poderse conocer si los peligros son tan reales que deban obligar al gasto que supondría una tecnología de obtención de vacunas sin contaminación con fagos. Pero lo que interesa destacar es que han sido las investigaciones genéticas las que han hecho descubrir y plantear el problema.

La intervención genética del hombre

Existen dos tipos de acciones en la ingeniería genética del hombre que ocasionan preocupación pública y temor: primero, la posible producción exacta de copias genéticas de un individuo determinado, y segundo, la modificación genética de la naturaleza de las personas. Ello ha hecho que organizaciones como el American Friends Service Committee se opongan a cualquier tipo de intervención genética.

Para tener una visión sobre tales aspectos problemáticos vamos a seguir la discusión que Bernad D. Davis, de la Harvard Medical School de Boston, Massachusetts ha realizado en dos interesantes trabajos (54, 55).

Respecto a la posibilidad de conseguir copias de individuos por reproducción asexual, se basa en la circunstancia reseñada previamente de que todas las células somáticas diferenciales de un animal (músculo, piel, intestino, hígado, etc) contienen en su núcleo todos los genes del individuo, o sea, poseen la capacidad potencial de hacer una copia del individuo entero. Con ranas se ha conseguido ya ese tipo de copias genéticas y desde el punto de vista teórico no existen límites en cuanto al número de ellas obtenibles. Basta con coger en cada caso un núcleo de la célula diferenciada e introducir dentro de una célula huevo enucleada para que comience normalmente el proceso de diferenciación y desarrollo. En otras

(54) B. D. DAVIS; *Science*, 170, 1279, 1970.

(55) B. D. DAVIS; *Science*, 186, 309, 1974.

palabras, una célula somática podría utilizarse como comienzo de un embrión, en circunstancias propias para que se expresen los genes adecuados. En mamíferos se espera conseguir ese tipo de copias genéticas en un futuro muy próximo, lo cual podría ser un gran incentivo para la ganadería, utilizando ejemplares muy seleccionados para usar su información genética como modelo a copiar.

En el caso de los humanos, una vez iniciado el proceso, sabemos, como producto de otro tipo de experiencias totalmente diferentes y ligadas a problemas de infertilidad, que es posible hacer que los huevos humanos maduren, se fertilicen "in vitro" y crezcan en un medio de cultivo durante las primeras etapas embrionarias. Las etapas posteriores también pueden resolverse, por implantación del embrión para su desarrollo. En este aspecto, por tanto, los peligros son graves y si el procedimiento global fuese factible de realizar en humanos, aunque se proscribiese, sería muy difícil el controlar posibles violaciones. El problema planteado es desde luego de tipo moral ya que otro inconveniente, el de la homogeneización genética, cuantitativamente no llegaría a ser importante. En efecto, el éxito de una especie depende no sólo de su adaptación a su ambiente actual sino en la posesión de suficiente variedad genética para que puedan existir individuos que pudieran sobrevivir en cualquier medio futuro. Por ello cualquier procedimiento genético que tienda a homogeneizar la población crearía un cierto peligro evolutivo, que en este caso particular sería muy pequeño.

Detengámonos ahora en estudiar la situación respecto a la modificación genética de la personalidad humana. En este aspecto concreto parecen mucho más lejanos tanto los peligros como las posibilidades beneficiosas. Ello se debe sobre todo a la diferencia crucial entre los caracteres poligénicos y monogénicos. En este último caso, por ejemplo la presencia o ausencia de un enzima determinado, todo depende de un gen simple y definible y la expresión o no del carácter seguirá las leyes de Mendel, Pensemos ahora por el contrario en los caracteres que modelan la personalidad humana tales como la forma y tamaño del individuo, su fuerza y destreza, su inteligencia, temperamento, etc. Todas estas características que son más interesantes desde el punto de vista social, muestran un rango continuo de variación debido a que responden a un comportamiento poligénico, dependiendo de la suma de pequeñas contribuciones de muchísimos genes junto con diversos factores ambientales.

La genética bioquímica ha proporcionado con sus éxitos una gran información sobre los caracteres monogénicos, pero sólo sobre éstos. Si re-

capacitamos en una cualidad de conducta, sólo sabemos que depende de muchos genes pero casi nada más. Es inabordable actualmente conocer por ejemplo cómo los productos de esos genes contribuirían a los circuitos formados por 10.000 millones de células del cerebro humano en desarrollo. Tampoco somos capaces, por ahora, de identificar un solo gen o proteína cuya variación pueda contribuir al rango normal del comportamiento. En resumen, que parece muy lejano el día que se pueda modificar controladamente una personalidad humana debido a manipulaciones específicas en el ADN. Nuestra ignorancia al respecto nos protege.

Sn embargo si nuestro conocimiento fuese mayor los probables beneficios serían enormes cuando supiésemos qué genes determinados están influyendo en aspectos concretos relacionados con la salud humana.

Otra consideración a tener en cuenta es el diferente grado de dificultad técnica existente cuando se trata con bacterias o con seres superiores. Puede llegar, quizás pronto, el momento de que seamos capaces de suministrar un gen o grupos de genes en alguna o algunas células del cuerpo humano, pero el objetivo global que sería la introducción en todas las células sería mucho más difícil. En el caso de una enfermedad congénita, quizás bastaría a veces con la introducción del gen en las células de un tejido, pero aun eso tiene un alto grado de dificultad. La introducción de genes en células germinales sí parece un camino más sencillo que permitiría a un individuo poseyendo un gen defectuoso, generar su propia proge nie sin que estuviesen condenados sus hijos a heredar el gen defectuoso.

En resumen, no se pueden excluir ciertas posibilidades técnicas en el manejo genético de los humanos, algunas de ellas con consecuencias desastrosas, como podría ser la introducción de un gen que alterase drásticamente las funciones cerebrales, mientras que otras perspectivas son más positivas, tales como las relativas al tratamiento de errores metabólicos congénitos. Podríamos pensar que un alto grado de civilización sería nuestra garantía contra el mal uso de la Ciencia, pero la experiencia próxima nos muestra una realidad más inquietante con ejemplos como los genocidios cometidos en Alemania o las tremendas desfoliaciones realizadas en Vietnam del Sur. Es quizás más realista pensar que si las técnicas genéticas se utilizan mal en el futuro, por la propia naturaleza que poseen, sólo resultarán afectados unos pocos individuos, mientras que, por otra parte, existen otros peligros más reales e inmediatos para la humanidad. Por ello y teniendo en cuenta el valor médico potencial que poseen las investigaciones genéticas, debemos concluir que tenemos la obligación moral de

no sacrificar los actuales avances en la genética bioquímica en aras a unos peligros remotos. Hasta que la transferencia de genes al hombre llegue a ser una realidad, existe tiempo para realizar una labor cultural e informativa que haga promover en su día un uso beneficioso de esta técnica en lugar de un abuso de ella.

CONTROL DE LA MANIPULACION GENETICA

Hasta el presente la propia comunidad científica ha sido la que, informalmente, ha desarrollado la política de sus propias acciones como consecuencia de las preocupaciones éticas sobre la naturaleza de sus investigaciones. Las restricciones, universalmente aceptadas, sobre algunos tipos de investigaciones han nacido como resultado de esa ética científica más bien que de la discusión abierta y pública entre científicos y no científicos sobre los posibles riesgos de una línea particular de la investigación.

Algunos científicos como Joshua Lederberg (Premio Nobel), de la Stanford University, piensan que las decisiones últimas sobre la procedencia o no de realizar un cierto tipo de experimentación no deben escaparse de las manos de los científicos (56) y existen ciertas razones que podrían apoyar este planteamiento. Por ejemplo, la mayor parte de las personas no sabrían distinguir entre un átomo y una molécula, entre un virus y una célula o entre una célula y un organismo y por ello cabe esperar que tampoco pueda ser profundo su conocimiento sobre los problemas que se derivan de la genética molecular.

Sin embargo, ha sido precisamente en el campo de la genética bioquímica donde, por primera vez, un grupo de científicos se ha impuesto una serie de restricciones sobre su libertad de investigación, tras una discusión abierta con personas no científicas especialistas en problemas relacionados con la Ética y con el Derecho, participando también representantes de los Organismos que proporcionan ayuda económica para la investigación científica. Esta nueva actitud ha sido ampliamente divulgada por las revistas científicas e incluso por los grandes medios de difusión, que han resaltado las cada día mayores implicaciones sociales, éticas e incluso religiosas de las investigaciones científicas sobre los temas fundamentales de la Biología molecular. Los propios científicos son los que in-

(56) N. WADE; *Nature*, 250, 175, 1974.

sisten, como en el informe Ashby (57), que “es necesario que los valores sociales de la comunidad se incorporen a las decisiones de la política científica”, o como Beckwith (56), que considera de un gran valor el que haya sido posible un debate acerca de la libertad académica de realizar un cierto tipo de investigación.

En apartados anteriores hemos considerado los riesgos biológicos o bio-riesgos que se podrían derivar de la falta de control en la manipulación de genes, por lo cual será de interés conocer cuales han sido las acciones que se han realizado en orden a controlar tales riesgos. Como antecedente de este tipo de preocupación se puede citar la carta que en noviembre de 1969 publicaron el grupo de Harvard, Jon Beckwith, James Shapiro y Larry Eron con ocasión de su aislamiento de un gen puro a partir de una bacteria.

El grupo de Cohen, quizás el que mayores éxitos ha cosechado en la obtención de genes mixtos, tenía desarrolladas unas normas de control cuando suministraban plasmidios pSC101 a colegas científicos para nuevas experiencias asegurándose de que: 1.º los científicos receptores del envío no remitiesen muestras a otros laboratorios, con lo cual se mantenía el control directo; 2.º las muestras suministradas no se utilizaran para ensayos de introducir virus tumorales en bacterias, ni para crear combinaciones resistentes a los antibióticos que no estuviesen ya previamente presentes en la Naturaleza. El propio Paul Berg, director del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Stanford, tomó la decisión de abandonar sus planes, desarrollados a partir de 1972, de introducir genes del virus tumoral de mono SV40 en bacterias *E. coli*, por los posibles peligros de obtener nuevos organismos cuyas propiedades infecciosas y ecológicas no se podían predecir.

Al complicarse la situación y existir más centros abordando investigaciones de recombinación de moléculas de ADN, fue decisiva la discusión que se originó tras la exposición de los trabajos de Cohen en la Gordon Research Conference on Nucleic Acids en 1973, sobre las perspectivas de las moléculas híbridas de ADN, lo que hizo que se diesen instrucciones a los moderadores de la sesión, Maxime Singer del National Institute of Health y Dieter Soll de Yale, para que escribiesen a la National Academy of Sciences (NAS) de USA, pidiendo la creación de un Comité para considerar la cuestión.

(57) LORD ASHBY; Advisory Board for the Research Councils; Cound 5880 HNSO, 1975.

La NAS urgió a considerar la posibilidad de que pudieran producirse consecuencias no deseadas debido a los biorriesgos del uso no juicioso de estas técnicas y creó un Comité presidido por Paul Berg, el Committee on Recombinant DNA, que reunió en la primavera de 1974 a cierto número de investigadores, que en julio de 1974 enviaban como resultado de sus discusiones una carta para ser publicada en las principales revistas científicas, tales como *Science* (58), *Nature* (59) y *Proceedings of the National Academy of Sciences* (60). La repercusión de esta carta-informe fue enorme en los medios científicos, pues venía avalada por 11 prestigiosos científicos tales como Berg, Cohen, o el premio Nobel Watson. Las motivaciones principales no eran los peligros de desarrollar microorganismos utilizables para fines de guerra biológica ni tampoco el impacto social de la ingeniería genética, sino su preocupación por los riesgos sanitarios que pudieran presentar las bacterias genéticamente alteradas, ya que consideraban que no se estaba en condiciones de valorar con seguridad los peligros de ciertas experiencias, de las cuales no existían directrices como las que están establecidas para otros estudios tales como isótopos radioactivos, sustancias químicas tóxicas o microorganismos patógenos.

Ante la posibilidad de que se pudiesen realizar experimentaciones peligrosas antes de estudiar e implantar las normas adecuadas de seguridad, la Comisión hacía una petición a todos los científicos para que voluntariamente aceptasen la prohibición de las llamadas experiencias de tipo I y de tipo II. Las del tipo I consistían en la creación de nuevos organismos conteniendo combinaciones no existentes en la Naturaleza, con capacidad para producir toxinas, o con genes resistentes a combinaciones de antibióticos. Las del tipo II trataban de introducir ADN desde virus tumorales, u otros virus animales, hasta bacterias, con lo que tales moléculas recombinantes podrían ser diseminadas fácilmente a poblaciones bacterianas de humanos y otras especies, lo que podría aumentar la incidencia de cáncer u otras enfermedades. Es interesante hacer notar que, de hecho, hasta la publicación del informe Berg, por un consenso informal, no se habían abordado estos dos tipos de experiencias.

Otro aspecto importante propuesto por el Comité fue la convocatoria de una Conferencia Internacional sobre el tema para que se celebrase en 1975, tratando el levantamiento o no de la prohibición temporal, así como

(58) "Committee on Recombinant DNA Molecules". P. BERG, D. BALTIMORE, H. W. BOYER, S. N. COHEN, R. W. DAVIS, D. S. HOGUES, D. N. NATHAUS, R. ROBLIN, J. D. WATSON, S. WEISSMAN; *Science*, 185, 303, 1974.

(59) *IBID.*; *Nature*, 250, 175, 1974.

(60) *IBID.*; *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 71, 2593, 1974.

otros aspectos aun menos claros tales como la posibilidad de insertar genes animales en bacterias, pues en la carta-informe sólo se indicaba que no debían abordarse con ligereza. lo que provocó la correspondiente controversia sobre si significaba una propuesta de prohibición o no. La cuestión era importante, ya que este campo de la investigación es clave por el probable descubrimiento de hechos significativos y de gran interés tales como la dilucidación de la estructura y el funcionamiento de los cromosomas animales. El bioriesgo de la utilización de bacterias *Escherichia coli* para introducir en ellas nuevos genes, consiste en que muchas colonias de *E. coli* viven normalmente en el tracto intestinal humano y son capaces de intercambiar información genética con otros tipos de bacterias, algunas de las cuales son patogénicas al hombre. Ello abre la posibilidad de que los nuevos elementos de ADN introducidos en *E. coli* pudieran diseminarse ampliamente entre humanos, bacterias, plantas o poblaciones animales con efectos que no se podrían predecir.

¿Cuál fue el resultado conseguido por el informe Berg? Por lo que se sabe, sus recomendaciones se cumplieron escrupulosamente en todo el mundo, hasta que se celebró, del 24 al 27 de febrero de 1975, la conferencia internacional prevista, en el Centro de Conferencias Asilomar, cerca de Pacific Grove, en California, participando durante los 3 ½ días de duración 86 biólogos americanos y 53 investigadores de otros 15 países, que discutieron y revisaron los progresos sobre las técnicas de recombinar ADN. Se invitó también a participar a ciertas personalidades del campo del Derecho y de la Etica así como del Gobierno, estando las reuniones totalmente abiertas a la prensa, que publicó prácticamente todas las discusiones, sobre todo los aspectos relacionados con las medidas de seguridad a tomar y los grados de peligro en las experimentaciones.

Las grandes diferencias de opinión entre los participantes no fueron obstáculo para conseguir unos acuerdos de tipo general tras fructíferas discusiones, en las que los científicos americanos fueron los más activos, con una casi nula acción por parte de los investigadores rusos, al igual que el resto de europeos salvo los ingleses, que mostraron un gran interés en defender sus puntos de vista. En concreto, se pudo deducir de la Conferencia, un documento que ha sido publicado en el mes de junio de 1975 (61), resumiendo las conclusiones adoptadas. Destacaremos en una serie de apartados los aspectos que creemos más interesantes de la Conferencia de Asilomar.

(61) "Asilomar Conference on Recombinant DNA Molecules". P. BERG, D. BALTIMORE, S. BRENNER, R. O. ROBLIN, M. F. SINGER; *Nature*, 255, 442, 1975.

1.—En primer lugar el convencimiento de los científicos de que los nuevos métodos poseen una gran importancia para poder abordar y solucionar importantes problemas médicos y científicos e incluso tener grandes repercusiones sobre otros problemas de los que preocupan a la sociedad, tal como la falta de alimentos suficientes. Existe la creencia, compartida por todos los investigadores de este campo de la Genética bioquímica, de que el uso de la metodología del ADN recombinante revolucionará la práctica de la Biología molecular y aunque todavía no hay aplicaciones prácticas de esta nueva técnica, existen muchas razones para creer que tendrá una gran utilidad práctica significativa en el futuro.

2.—La diseminación accidental de algunas de las nuevas combinaciones biológicas puede presentar un grado variable de riesgo potencial. Para realizar tales combinaciones se deberá proceder bajo una serie de precauciones graduales usando al mismo tiempo una serie de barreras físicas y biológicas para evitar el escape de cualquier organismo peligroso y para poder explorar los riesgos verdaderos de la experimentación, que posiblemente se demuestre en el futuro que son menos serios y probables de lo que se sospechaba previamente. Pero las normas de protección deben ser altas en principio e irse modificando posteriormente, conforme vaya aumentando nuestro conocimiento sobre el tema. En todo caso, es este uno de los pocos ejemplos de tomar precauciones de seguridad antes, en lugar de después, de que ocurra el riesgo contra el que se intenta luchar.

3.—Una vez se consideren las normas de seguridad que se señalan para los diversos tipos de experimentación, queda sin efecto la prohibición de realizar los ensayos de tipo I y tipo II, propuesta previamente por la carta-informe de Berg. El uso de las barreras físicas, en los laboratorios con ciertos riesgos, es un hecho normal, tal se hace de un modo rutinario en ensayos con isótopos radioactivos o sustancias químicas peligrosas. Como novedad se ha introducido el concepto de barrera biológica, buscando usar como material dador del ADN especies modificadas que sólo se pueden propagar en ciertos huéspedes especializados y en cuanto a estos huéspedes, normalmente bacterias, se deberán buscar cepas que sean incapaces de vivir salvo en las condiciones especiales del laboratorio.

4.—El establecimiento de las barreras biológicas evidentemente retrasará la investigación, pero se piensa que en poco tiempo, quizás unos pocos meses (37), se habrán podido desarrollar variedades de vectores menos peligrosos, por ejemplo con variantes de bacteriófago λ (que es el más usado para las manipulaciones genéticas) que sean incapaces de sobrevi-

vir a la temperatura del cuerpo humano, o que no pueda desarrollar algunas de las características que necesitan para hacerse infecciosos, o que sean capaces de infectar tan sólo la cepa particular de bacteria modificada usada en la experiencia. Algo semejante cabe esperar con el desarrollo de mutaciones genéticas sobre *E. coli*, que hagan que no puedan vivir en el intestino humano. Las cepas así resultantes podrían utilizarse con menos peligro potencial y las mutaciones podrían consistir, por ejemplo, en conseguir variantes incapaces de sintetizar ácido diaminopimélico, constituyente de paredes celulares, por lo cual habría que añadirlo para que sobreviviese la bacteria. También podrían obtenerse variedades sensibles a la temperatura o usar cepas modificadas de *Bacillus subtilis*, así como sus bacteriófagos y plasmidios. En el futuro inmediato se ha de poner un énfasis especial en investigaciones que nos den conocimientos adecuados de aspectos que hoy permanecen muy a oscuras tales como: a) supervivencia de cepas de laboratorio de bacterias y bacteriófagos en los ambientes ecológicos del mundo externo al laboratorio; b) influencia de las moléculas recombinantes de ADN sobre el aumento o la disminución de la supervivencia de sus vectores y huéspedes en la Naturaleza; c) grado de infectividad de los fagos o bacterias que poseen segmentos de ADN eucarióticos sobre organismos superiores o sobre la propia infectividad del ADN.

En todo caso las primeras investigaciones publicadas recientemente en junio (62, 63) son sólo relativamente tranquilizadoras en el sentido de que concentraciones mucho más altas de *E. coli* K12 que las que podrían esperarse que fuesen transmitidas al tracto intestinal de un individuo desde un laboratorio de trabajo, no mostraron evidencia de transferencia importante de plasmidios desde la cepa K12 hasta los *E. coli* propios del tracto alimentario y además los *E. coli* K12 sobreviven pocos días en el intestino humano y se multiplican muy poco. De todos modos, en otros casos, hubo algo de transferencia.

5.—Los niveles de riesgo en cuanto a las barreras físicas necesarias se establecieron en 4 categorías de riesgos: 1) mínimo; 2) bajo; 3) moderado y 4) alto. El riesgo mínimo corresponde a los procedimientos normales de un laboratorio microbiológico clínico y allí se podrán realizar experiencias del tipo de transferir genes entre organismos que de un modo normal intercambian material genético.

(62) H. W. SMITH; *Nature*, 255, 500, 1975.

(63) E. S. ANDERSON; *Nature*, 255, 504, 1975.

En los laboratorios para trabajos de bajo riesgo se deben tomar ciertas precauciones adicionales, como tener el acceso limitado en ciertas zonas, contar con cámaras biológicas adecuadas, usar vectores y huéspedes de menor peligro, etc., y se puede abordar la generación de nuevos biotipos cuando se estime que el ADN recombinante que resulta no puede alterar apreciablemente el comportamiento ecológico de la especie receptora, aumentar significativamente su patogenicidad o impedir el tratamiento específico de cualquier infección resultante. De este modo, en este apartado de bajo riesgo se podría incluir la inserción de genes de invertebrados, y de vertebrados de sangre fría, en bacterias.

Para las experiencias de riesgo moderado serán necesarios controles adicionales tales como gabinetes con vitrinas de flujo laminar, uso de ropa especial, protección con filtros de las líneas de vacío y el mantenimiento de presión negativa en ciertas áreas del laboratorio, todo lo cual podría costar unos 20.000 \$. Como la salvaguarda física por sí sola no es suficiente se tendrían que usar vectores y huéspedes debilitados en el sentido de que no se multipliquen bien fuera del laboratorio y se podrían abordar experiencias del tipo de romper y unir ADN de varios virus, unir ADN viral a plasmidios bacterianos o juntar fragmentos de ADN, de animales de sangre caliente, a ADN bacteriano.

En cuanto a las experiencias de alto riesgo sólo se realizaron en laboratorios especiales, aislados con cierres de aire, ropa especial protectora, duchas antes de entrar y salir, sistemas para eliminar las contaminaciones en el aire, o en líquidos y sólidos de desecho, etc. Se debe comprobar previamente que los vectores y huéspedes que se usen no pueden crecer fuera del laboratorio. En estas condiciones se podrían efectuar experiencias del tipo de fusión de genes a ADN bacteriano, incluso cuando el organismo resultante pueda producir un agente tóxico al huésped, y también se efectuarán en estos laboratorios los trabajos con virus de alto riesgo. En Inglaterra se ha inaugurado en mayo último, un laboratorio de este tipo, en el Microbiological Research Establishment, en Porton Down, que por ahora es único en Europa, y que se usará también en estudios sobre el virus de la fiebre de Lassa que hasta la actualidad sólo podía manejarse en los laboratorios de la Communicable Diseases Center en Atlanta, Georgia, USA.

Como consecuencia de la Conferencia Asilomar, ciertos ensayos han quedado por ahora prohibidos, tales como los que pudieran utilizar ADN derivado de organismos muy patogénicos; ADN conteniendo genes productores de toxinas y también las experiencias en gran escala, con más de 10

litros de volumen de cultivo. Gracias a las discusiones de la Conferencia, también fue posible clasificar en diferentes grados de riesgo algunas experiencias de gran interés como las que abordan el romper el ADN total de un organismo superior en fragmentos pequeños que se introducen en bacterias, las cuales se hacen crecer en "clones". El peligro radica en que uno de los "clones" contenga genes para un virus tumoral que estuviese reprimido.

¿Cuál ha sido el impacto de la Conferencia Asilomar? En general muy positivo, incluso entre científicos tales como los premios Nobel James Watson (Cold Spring Harbor) y Joshua Lederberg (Stanford University Medical Center) que se mostraban portavoces del grupo de científicos más jóvenes, opuestos a la imposición de regulaciones demasiado estrictas que impidiesen el progreso de la genética molecular. En el lado opuesto, sólo un grupo de científicos radicales, del movimiento Science for People, han resaltado el que las personas intrasadas no pueden autorrestringirse de un modo adecuado y se oponen a este tipo de investigaciones, de un modo global.

En otros países, la situación ha seguido caminos paralelos al de Norteamérica. En concreto, y referidos a Gran Bretaña, en julio de 1974 el British Medical Research Council, en una carta confidencial a los directores de sus laboratorios prohibía las experiencias cuya moratoria se pedía en el informe Berg. Presidido por lord Ashby, el Advisory Board for the Research Councils, emitió un amplio estudio en enero de 1975, adoptando una posición muy flexible tras describir los posibles beneficios y perjuicios de las investigaciones, llegando a la conclusión de que los primeros superan a los segundos, por lo cual "estas técnicas, sujetas a rigurosos controles, deben continuar utilizándose debido a los grandes beneficios a que pueden conducir". En todo caso, insisten en la necesidad de tales controles tales como: a) realización de estudios epidemiológicos a las personas que trabajan en la ingeniería bioquímica de microorganismos; b) alterar la composición genética de los microorganismos para que sean menos peligrosos de utilizar; c) realizar las experiencias más especiales en laboratorios muy adecuados; d) posibilidad de la existencia de oficiales de seguridad en los laboratorios que fuesen encargados de este tipo de controles.

De todos modos la cuestión siguió abierta a discusiones y el 12 y 13 de julio de 1975, se han reunido en Oxford unos 100 científicos, junto con representantes del Research Councils y del Department of Health and Social Security para discutir la situación, constatando la existencia de una cierta

presión pública contraria a este tipo de experimentación, que ellos consideran, por otra parte, de gran utilidad, para lo cual debe someterse a un mayor control. En cualquier caso, el sentir general fue el de apoyar el informe Ashby, aun cuando éste ha provocado algunas reticencias. Así, a través de su Unión, los "technicians" ingleses han expresado su interés por las cuestiones de seguridad, exponiendo que sus intereses no corren parejos al deseo de los científicos de avanzar lo más rápidamente posible. Otro problema no contemplado en el informe Ashby, es el deseo de la industria farmacéutica y agrícola de pasar de la fase laboratorio a operaciones en gran escala por lo cual tienen gran interés en que las normas de seguridad sean válidas también para ese tipo de operaciones a mayor escala. Un tercer aspecto a tener en cuenta para que el Gobierno inglés pueda dictar unas normas adecuadas y aceptables, es encontrar un mecanismo para que se pueda conocer cuales son las verdaderas opiniones de la comunidad sobre este problema. El Gobierno británico discutirá y aprobará próximamente un Código de Conducta respecto a este tipo de investigaciones, creando un servicio de información y consejo para que los usen los laboratorios interesados.

Respecto a Francia, el principal grupo de investigadores es el de Alain Rambach, Pierre Tiollais y Philippe Kourilsky en el Instituto Pasteur de París, que poseen un laboratorio muy bien equipado y con unas normas de seguridad muy severas (64). De todos modos han existido ya problemas de huelgas de personal auxiliar y técnicos que se niegan a que tales experiencias se realicen en los laboratorios del Instituto Pasteur y a la construcción de un laboratorio de alto riesgo. Para someter todos los proyectos de investigación a su aprobación ética se ha constituido una Comisión Nacional, presidida por el profesor Jean Bernard y formada por otros ocho científicos, entre los que se encuentran los premios Nobel J. Monod y F. Jacob. También existirá otra Comisión de carácter más técnico, que asistirá a la primera, y entre cuyos cometidos está el de precisar las condiciones de trabajo necesarias para realizar las manipulaciones genéticas permitidas en la actualidad. En agosto de 1975, el llamado "Groupe Information Biologie", mediante una carta enviada a ciertas revistas científicas criticaban las experiencias francesas sobre manipulación genética, pidiendo su suspensión, lo cual ha provocado la respuesta autorizada de algunos Organismos y de ciertos notables científicos a fin de asegurar que se está trabajando con los controles adecuados. De todos modos, hemos de constatar la existencia de una polémica bastante viva en Francia, respecto a este tema.

(64) P. LAMBERT; *La Recherche*, 6, 476, 1975.



En cuanto a la Organización Mundial de la Salud, su director general Halfdan Mahler, ha publicado en julio de 1975, las recomendaciones que le han hecho su Advisory Council on Medical Research (ACMR) que ha considerado el tema como muy importante en la agenda de este año (65). Los cuatro puntos que se pueden resaltar son los siguientes: En primer lugar una nota positiva y optimista recordando que "la continuación, bajo controles adecuados, de la investigación microbiológica, incluyendo los estudios y manipulaciones genéticas y de fusión de células, es de la máxima importancia para el progreso de la Medicina y de la Salud Pública". En segundo lugar, se establece que la OMS ha de jugar un papel principal a nivel internacional para tener informados a la comunidad científica, a los gobiernos y al público de los desarrollos obtenidos en este campo de investigaciones y de los peligros implícitos que acarrearán. En tercer lugar, la petición de que se de prioridad a las investigaciones que permitan desarrollar biomateriales más seguros y la evolución de las técnicas que hagan reducir los riesgos del trabajo. En cuarto lugar, la afirmación de que la OMS coordinará sus actividades sobre la materia, actualmente diseminadas en varios departamentos, estableciéndose la Organización como un foco internacional de información y su diseminación, para lo cual se designarán centros colaboradores y se favorecerá el entrenamiento y las relaciones entre diversos países.

CONCLUSION

Hemos considerado las posibilidades futuras y los riesgos que se pueden originar con el desarrollo previsible de la genética molecular en un futuro más o menos próximo y nos hemos detenido con más atención en la serie de discusiones, conferencias, normas, etc. que en el último año se han venido dando dentro del campo particular de las moléculas recombinantes de ADN, como consecuencia inmediata de la preocupación de los científicos por la transcendencia social y ética de sus investigaciones. ¿Podríamos exponer una perspectiva general sobre la situación actual y su futuro?

Siguiendo las consideraciones del premio Nobel Arthur Kornberg (66, 2) y otros científicos preocupados por el tema (67), se ha de

(65) *Nature*; 256, 450, 1975.

(66) A. KORNBERG; *Prism.*, 1, 12, 1973.

(67) A. HELLMAN, M. OXMAN, R. POLLACK en "Biohazards in Biological Research", CSHL, 1973.

señalar que la ciencia básica posee una responsabilidad social que pide una respuesta clara, fuerte y meditada de la comunidad científica a fin de tener bien informada al resto de la población.

Todo conocimiento posee una potencialidad para lo bueno y para lo malo y basta con considerar que los descubrimientos del fuego, de los explosivos e incluso de las más benignas medicinas han ocasionado confort, pero también tragedias. Siempre existe un componente de riesgo que se puede minimizar, pero no anular. Como ejemplos baste considerar que desde su amplia distribución por los años 50, la vacuna de la polio ha sido recibida por millones de personas y ha sido de gran utilidad. Sin embargo también ha ocasionado algunas muertes en personas inoculadas con ella y ahora también se sabe que al principio estaba contaminada con el virus de mono SV40 que ocasiona tumores en hamster. La vacuna contra la viruela se utilizó durante años en gran escala como rutina profiláctica antes de demostrarse que su uso de este modo era más perjudicial que beneficioso.

En la actualidad, dice Kornberg que podríamos denominar a la Medicina como "Ingeniería biológica" pensando que consiste en la aplicación de la biología y de la bioquímica a los problemas de las enfermedades humanas y pocas objeciones solemos hacer a las prácticas de nuestros "ingenieros biológicos", los médicos y cirujanos, a pesar de que ciertos tratamientos médicos usuales poseen riesgos bien manifiestos. Por ello, parece algo absurdo que la posibilidad de tratar enfermedades ocasionadas por genes defectuosos o inexistentes, cause en ciertos ambientes un sentimiento de repulsa pensando en efectos adversos cuya posibilidad es aun remota. No podemos negar que el científico tiene que sentir una necesidad urgente en curar el defecto genético de la diabetes con una ilusión mayor que el intentar paliarla con tratamientos sin fin a base de insulina.

Desde luego es indudable que los avances en la genética química o molecular pudiera hacer concebible el que en el futuro un tirano crease una raza de robots, pero ello no nos puede apartar de la existencia de otros problemas actuales, como la plaga de enfermedades genéticas, que podrían verse solucionadas con los avances en este campo. Por otra parte la humanidad está ya acostumbrada a vivir rodeada de otros riesgos más reales y no menos terribles: armas atómicas y biológicas; degradación del medio ambiente; superpoblación y falta de recursos, etc.

Al intentar rebatir las exageraciones de los que solo ven peligros, se puede caer en el extremo opuesto de creer tener a la vista dramáticas soluciones a problemas graves. La cura de las enfermedades genéticas por reemplazamiento de genes, hoy día no se puede predecir cuando podrá ser una realidad, si llega a serlo, mientras que otras posibilidades se ofrecen como alternativas atractivas y de aplicación más directa. Así el consejo genético y la detección prenatal pueden evitar muchas de ellas, e incluso algunos defectos genéticos se pueden aliviar por trasplantes adecuados.

Es en la Agricultura y en la Veterinaria donde quizás puedan ser de una mayor utilidad inmediata los conocimientos que se deduzcan de la genética molecular, permitiendo alterar las actuales perspectivas pesimistas de que el suministro de alimentos es cada vez más inadecuado para una humanidad que crece demasiado rápidamente. Cabe esperar que se desarrollen, como consecuencia de los avances genéticos, tipos de semillas superiores, plantas resistentes a la sequía y a la enfermedad y plantas que fijen nitrógeno sin necesidad de utilizar los fertilizantes nitrogenados más caros, así como el control genético preciso de la reproducción animal puede también, dentro del campo veterinario, ayudar a solucionar el problema de las cada día mayores necesidades de proteínas.

Todos estos son proyectos con una base realista y sobre los cuales se empiezan a dar los primeros pasos.

Por último permitánseme dos consideraciones, una económica y otra académica. Las investigaciones sobre Ciencias biomédicas poseen una gran trascendencia para el presente y para el futuro y sus frutos han sido excitantes y productivos durante los últimos años.

La consideración económica (68) consiste en resaltar que, con datos de los EE. UU. que superan al resto de los países del mundo en este aspecto, mientras que las industrias basadas en la Ciencia y la Tecnología gastan del 8 al 15% de sus ingresos en investigación y desarrollo, la "industria de la salud" gastaba antes de 1950 tan sólo el 1% de sus gastos en investigación y desarrollo e incluso ahora el porcentaje no sube del 4%. Cabe imaginar lo que sucedería en el mundo si los gobiernos de los países, a la vista de la rentabilidad, al menos social, de este tipo de investigación, decidiesen invertir cantidades suficientes para alcanzar

(68) D. R. CHALLONER, *Science*, 186, 27, 1974.

esos porcentajes. No sólo la Medicina sino en general todas las Ciencias sufrirían una auténtica revolución en cuanto a logros y metas alcanzadas.

La consideración académica consiste en señalar que, como he cuidado de resaltar, casi toda la investigación importante sobre genética bioquímica se ha realizado en Universidades, como consecuencia de programas que originariamente eran de investigación básica. Con los medios de nuestra nación no podemos esperar que **nuestras** Universidades posean los recursos de las Universidades americanas, pero sí debemos luchar incansablemente para que la llama de la investigación no se extinga como consecuencia de una interpretación de la Universidad como Centro docente y casi nada más. Evidentemente la Universidad española debe enseñar pero sin hacer Ciencia ella misma, su enseñanza, cada vez más masificada, será un engaño tanto para los alumnos como para los profesores.

Pienso, por tanto, que debemos resistir con todos nuestros **esfuerzos** a ciertas presiones de la sociedad que pide tan solo títulos a nuestros centros universitarios y debemos resistir también a las interpretaciones, incluso de la propia administración, que respecto al profesorado piensa a menudo sólo en horas docentes y se olvida del resto de la labor **universitaria**, lo que podría llegar a producir, incluso la muerte **iatrogénica** de la Universidad española.

Tabla 1.—Enfermedades congénitas que se pueden detectar prenatalmente por amniocentesis.

ASOCIADAS A RETARDO MENTAL

<i>Desorden</i>	<i>Problema metabólico</i>
Anormalidades cromosómicas (síndrome de Down, síndrome de Turner, XYY, etc.).	Exceso o deficiencia de información genética total.
Aciduria arginosuccínica.	Arginosuccinasa.
Citrulemia.	Arginosuccinasa sintetasa.
Fucosidosis.	Alfa-fucosidasa.
Galactosemia.	Galactosa: 1-fosfato uridil transferasa.
Enfermedad de Gaucher: Tipo infantil. Tipo adulto.	Ausencia de cerebrosidasa. Deficiencia de cerebrosidasa.
Gangliosidosis generalizada.	Ausencia de beta-galactosidasa.
Gangliosidosis juvenil GM ₁ .	Deficiencia de beta-galactosidasa.
Gangliosidosis juvenil GM ₂ .	Deficiencia de hexosaminidasa A.
Enfermedad almacenamiento de glucógeno tipo 2.	Alfa-1,4 glucosidasa.
Enfermedad de Hunter.	Incremento de sulfato de heparitina en líquido amniótico.
Enfermedad de Hurler.	Incremento de sulfato de heparitina en líquido amniótico.
Enfermedad celular I.	Múltiples hidrolasas lisosomales.
Acidemia isovalérica.	Isovaleril CoA dehidrogenasa.

Síndrome Lesch-Nyhan.	Hipoxantina-guanina-fosforibosa transferasa.
Mal de orina con olor a jarabe de arce.	Alfa-ceto isocaproato decarboxilasa.
Leucodistrofia metacromática: Tipo infantil retardado. Tipos juvenil y adulto.	Ausencia de arilsulfatasa A. Deficiencia de arilsulfatasa A.
Acidemia metilmalónica.	Metilmalonil CoA Carbonil mutasa.
Enfermedad de Niemann-Pick.	Esfingomielinasa.
Enfermedad de Refsum.	Acido fitánico alfa-oxidasa.
Enfermedad de Sandhoff.	Hexosaminidasa A y B.
Enfermedad de Sanfilippo.	Incremento de sulfato de heparitina en líquido amniótico.
Enfermedad de Tay-Sachs.	Hexosaminidasa A.
Enfermedad de Wolman.	Lipasa ácida.

ASOCIADAS POSIBLEMENTE A RETARDO MENTAL

Cistionuria.	Cistionasa.
Homocistinuria.	Cistionina sintetasa.

NO ASOCIADAS CON RETARDO MENTAL

Síndrome adrenogenital.	Incremento de corticoesteroides en líquido amniótico.
Cistinosis.	Incremento de cistina celular.
Enfermedad de Fabry.	Alfa-galactosidasa.
Hipervalinemia.	Valina transaminasa.
Aciduria orótica.	Forforilasa orotidílica y decarboxilasa orotidílica.