

EDITORIAL

INGENIERIA GENETICA Y MEDICINA

E. PIMENTEL

INTRODUCCION

La genética es la rama de las ciencias biológicas que se ocupa del estudio de la estructura y de las funciones del material genético, también llamado genoma. En todas las células el genoma está constituido por ácido desoxirribonucleico (DNA), mientras que en algunos virus el genoma está constituido por ácido ribonucleico (RNA). En las células procariotas, que carecen de núcleo, los cromosomas que contienen el genoma están en contacto directo con el citoplasma, mientras que en las eucariotas están contenidos en el núcleo celular y están separados del citoplasma por una envoltura nuclear. El genoma cromosómico de una célula procariota tiene una longitud del orden del milímetro, mientras que en las células humanas mide cerca de 180 centímetros y en las del ratón cerca de 2 metros. El genoma celular contiene toda la información genética correspondiente a la especie biológica y es esencialmente idéntico en todas las células de un organismo multicelular.

Las dos funciones principales del genoma son la replicación (autoduplicación) y la transcripción (Figura 1). La replicación consiste en la duplicación del material genético para formar una copia perfectamente fiel a nivel molecular y está relacionada directamente con los fenómenos de la herencia, tanto a nivel celular como a nivel de individuos de una especie y de la especie en su conjunto. En el proceso de replicación se separan los dos filamentos de la doble hélice del DNA y cada uno de ellos es

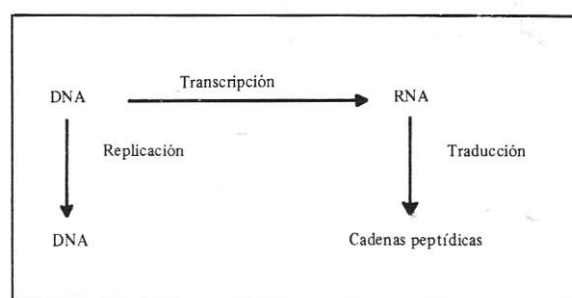


Figura 1. Funciones del genoma celular.

copiado fielmente con la ayuda de sistemas enzimáticos (DNA polimerasas) para formación de "moléculas hijas" de DNA.

La transcripción consiste en la expresión de la información genética contenida en el genoma mediante la síntesis de RNA con la ayuda de sistemas enzimáticos que incluyen RNA polimerasas. En el caso del llamado RNA mensajero la información es luego traducida en el citoplasma, principalmente a nivel de los polisomas formados por agregados de ribosomas contenidos en el sistema endoplásmico rugoso, para la síntesis de cadenas peptídicas que componen luego proteínas específicas, incluyendo las propias enzimas. Generalmente uno solo de los filamentos de la doble hélice del DNA es transcrito y luego traducido.

Aunque la información genética está contenida en las estructuras moleculares continuas del DNA, aparece funcionalmente como si fuera discontinua, en forma de genes. El gene se define a nivel molecular como la unidad funcional de transcripción, o sea, como un segmento del DNA sobre el cual se copia una molécula de RNA. El genoma de una célula humana contiene aproximadamente 3×10^9 pares de nucleótidos y alrededor de

Dr. Enrique Pimentel: Profesor y Director Centro Nacional de Genética Humana y Experimental, Instituto de Medicina Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas. Conferencia dictada en el VIII Congreso de Medicina Interna, Barranquilla, octubre 1984.

Solicitud de separatas al Dr. Pimentel.

150.000 genes. La información está contenida en un código genético compuesto por "palabras" de tres letras, llamadas codones, correspondientes a diferentes combinaciones de las cuatro bases nitrogenadas contenidas en el DNA, que son dos purinas, la adenina (A) y la guanina (G), y dos pirimidinas, la citosina (C) y la timina (T). En el RNA la timina está sustituida por uracilo (U).

Cada transcripto primario (especie molecular de RNA copiada sobre el molde de DNA correspondiente a un gene) está compuesto por unos pocos cientos de nucleótidos. En las células procariotes el transcripto primario correspondiente al RNA mensajero es simétrico a nivel molecular con el segmento del DNA del cual fue copiado. En las células eucariotas, en cambio, si bien el transcripto primario es simétrico con respecto a la estructura molecular del gene correspondiente, este transcripto sufre luego un proceso complejo mediante sistemas enzimáticos que cortan y separan algunos segmentos (intrones) que no son luego traducidos y empalman otros segmentos (exones) que, constituyendo el RNA mensajero "maduro" serán luego traducidos para la síntesis de

la cadena peptídica correspondiente (Figura 2).

La determinación de la secuencia precisa de los genes en un cromosoma permite establecer su mapa genético. Desde el punto de vista funcional, los genes de los organismos multicelulares más evolucionados, como son los mamíferos, se pueden clasificar en dos grupos: (a) los genes constitutivos, que están activos en todas o casi todas las células del organismo, y (b) los genes diferenciados, ontogénicos o específicos de tejido, que están activos diferencialmente en los distintos tejidos y células, determinando precisamente las características funcionales, bioquímicas y morfológicas del tejido en referencia. En el genoma humano es probable que haya, sobre un total de cerca de 150.000 genes, unos 25.000 genes constitutivos y 125.000 genes diferenciados u ontogénicos. Sin embargo, de estos últimos sólo unos 4.000 están activos en una célula determinada, de lo cual se deduce que el 97% del genoma diferenciado (correspondientes a genes no constitutivos) permanece inactivo en cualquier tipo de célula que se estudie.

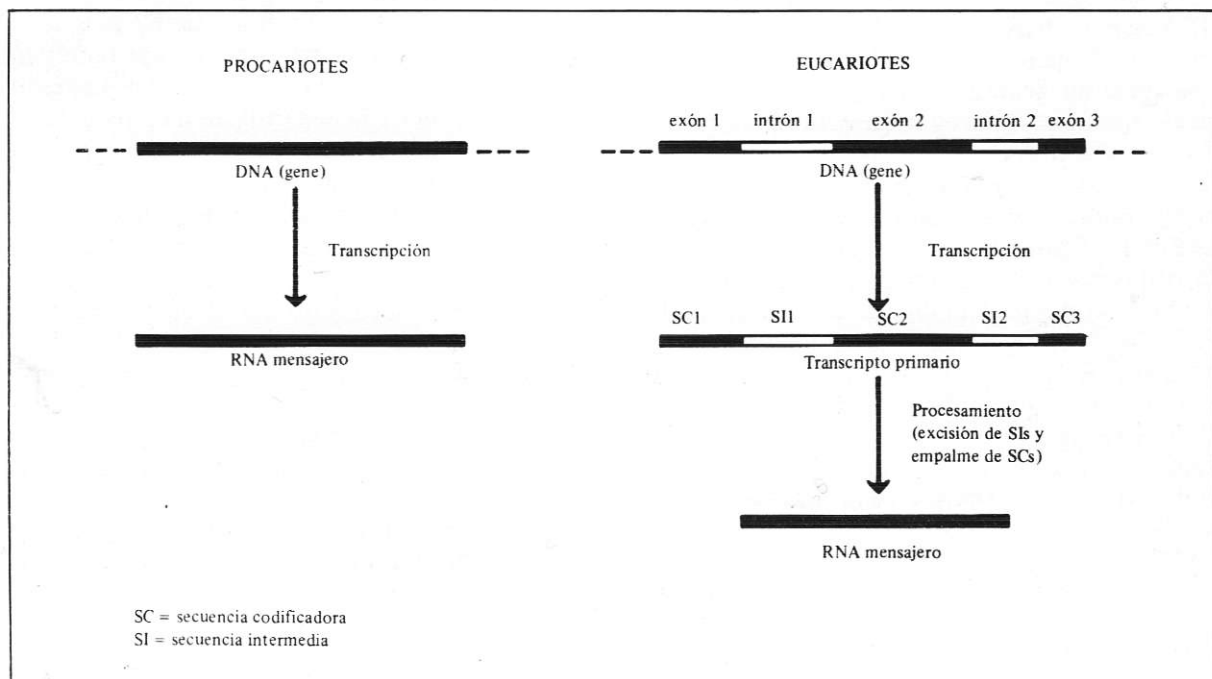


Figura 2. Relación entre el DNA y el RNA mensajero en procariotes y eucariotes.

Además de los genes, que en su gran mayoría están en copias únicas o casi únicas, el genoma de los organismos superiores contiene secuencias de nucleótidos dispersas medianamente repetidas o altamente repetidas, que en su conjunto constituyen una fracción relativamente importante del genoma (Tabla 1). Muchas de estas frecuencias no son transcritas y no tienen función conocida. Otras de estas secuencias pueden tener propiedades de elementos móviles dentro del genoma, similares a los llamados transposones que se encuentran en plantas y organismos inferiores, y pueden desempeñar un papel importante en procesos de regulación de las funciones genómicas.

Tabla 1. Tipos de secuencias de nucleótidos presentes en el genoma de los organismos superiores

| Tipos de secuencia | Número de copias | Fracción del DNA Total (%) |
|------------------------|------------------|----------------------------|
| Únicas o casi únicas | 1-5 | 65 |
| Medianamente repetidas | $10^3 - 10^5$ | 25 |
| Altamente repetidas | 10^6 | 10 |

TRANSFERENCIA DE INFORMACION GENETICA

Segmentos de DNA que contienen genes aislados o conjuntos de genes pueden ser transferidos de una célula a otra en condiciones naturales o mediante manipulaciones experimentales. Los procesos fundamentales relacionados con la transferencia intercelular de información genética son la conjugación, la transformación, la transfección y la transducción.

La conjugación genética es observada en condiciones naturales en ciertas bacterias y consiste en una transferencia de segmentos

cromosómicos o de plásmidos completos de una bacteria que actúa como donante a otra que actúa como receptora, mediante el establecimiento de un pequeño puente de conexión intercelular, en forma elementalmente similar a un acoplamiento sexual.

La transformación genética consiste en la captación natural o experimental de segmentos de DNA por células vivas, seguida por su integración al genoma celular y la expresión de la información genética en ellos contenida. La transformación es capaz de producir cambios genotípicos potencialmente heredables, los cuales pueden ser observados luego en el fenotipo de las células que descienden de la célula transformada. La transformación genética fue descubierta por Griffith, en Inglaterra, en 1928, al observar que neumococos virulentos encapsulados muertos mediante tratamiento por calor, eran capaces de transmitir a neumococos vivos, no encapsulados y no virulentos, los caracteres de encapsulamiento y virulencia de una manera hereditaria. Posteriormente se demostró que el "principio transformante" que pasaba de las bacterias virulentas muertas a las no virulentas vivas es DNA y ello constituyó una prueba capital para reconocer que el DNA es la substancia que encierra la información relacionada con las características hereditarias de las células.

En las células eucariotas se pueden introducir genes extraños mediante manipulaciones experimentales tales como co-precipitación de DNA y fosfato de calcio sobre la superficie de células cultivadas in vitro. Este procedimiento, conocido con el nombre de transfección, ha permitido demostrar, por ejemplo, la presencia de genes con propiedades transformantes malignas en el genoma de algunos tumores, incluyendo una variedad de cánceres humanos.

La transducción genética consiste en una transferencia de segmentos de DNA celular mediada por virus y puede ocurrir tanto en condiciones naturales como en condiciones experimentales. Los segmentos transducidos tienen capacidad potencial para su expresión y replicación. Pueden permanecer como elementos genéticos extracromosómicos o pueden ser integrados al genoma de la célula infectada

por el virus, mediante recombinación genética. La integración de segmentos genómicos extraños en el genoma celular es capaz de determinar cambios hereditarios estables a través de generaciones celulares sucesivas. La eficiencia de diferentes métodos experimentales que han sido utilizados para transferencia de información genética extraña es muy variable, como se puede apreciar en la Tabla 2.

Tabla 2. Métodos para la inserción de información genética

| Técnica | Eficiencia |
|---|--------------------------|
| 1. Fusión celular | $< 10^{-6}$ |
| 2. Transferencia de genes por cromosomas | $< 10^{-6}$ |
| 3. Transferencia de genes por microcélulas | $\leq 10^{-6}$ |
| 4. DNA transportado por liposomas | $\cong 2 \times 10^{-4}$ |
| 5. Fusión de esferoplastos | 0,1 - 0,3% |
| 6. Transfección mediante DNA purificado | 10^{-3} a 10^{-7} |
| 7. Inyección intracelular directa de DNA | 1 a 10% |
| 8. Infección con virus RNA recombinantes | 10 a 100% |
| 9. Transfección con virus DNA recombinantes | $\cong 100\%$ |

(Modificado de M.J. Cline, Mol Cell Biochem 59:3-10, 1984).

TECNOLOGIA DE DNA RECOMBINANTE

La tecnología de DNA recombinante consiste en la manipulación artificial de genes, o de segmentos complejos del genoma, para producir combinaciones genéticas nuevas, que no se encuentran usualmente en condiciones naturales en los objetos biológicos (virus o células). Estos genes o segmentos genéticos pueden ser sometidos a clonamiento a través de generaciones celulares sucesivas mediante su inclusión en vectores moleculares contruidos expresamente para fines establecidos. Los vectores pueden consistir en plásmidos, virus o combinaciones artificiales de ambos, llama-

das cósmidos. Los cósmidos tienen la ventaja sobre los plásmidos y virus, de poder acomodar segmentos más grandes de DNA (hasta 35.000 pares de bases), según se pueden apreciar en la Tabla 3.

Tabla 3. Vectores usados para clonamiento de DNA

| Tipo de vector | Origen | Capacidad máxima aproximada (Kbp de DNA) |
|----------------|---------------------------------------|--|
| Plásmidos | Bacterias | 10 |
| Bacteriófagos | Virus | 20 |
| Cosmidos | Híbridos de plásmidos y bacteriólogos | 35 |

Kbp = pares de kilobases = 1.000 pares de bases de DNA.

Los vectores recombinantes se construyen mediante escisión de plásmidos o virus en un sitio determinado usando endonucleasas de restricción, seguida por inserción en el sitio escindido del segmento de DNA que se desea clonar para producir transformación genética estable (Figura 3). Las células transformadas pueden ser procariontas o eucariotas, incluyendo células humanas, y su reproducción puede permitir la generación de grandes cantidades del segmento genético clonado, con lo cual se puede lograr producir cantidades considerables de la proteína correspondiente. Más del 10% de las proteínas totales que sintetiza un colibacilo transformado artificialmente mediante manipulaciones de ingeniería genética puede corresponder a la proteína específica codificada por un gene extraño contenido en un plásmido recombinante.

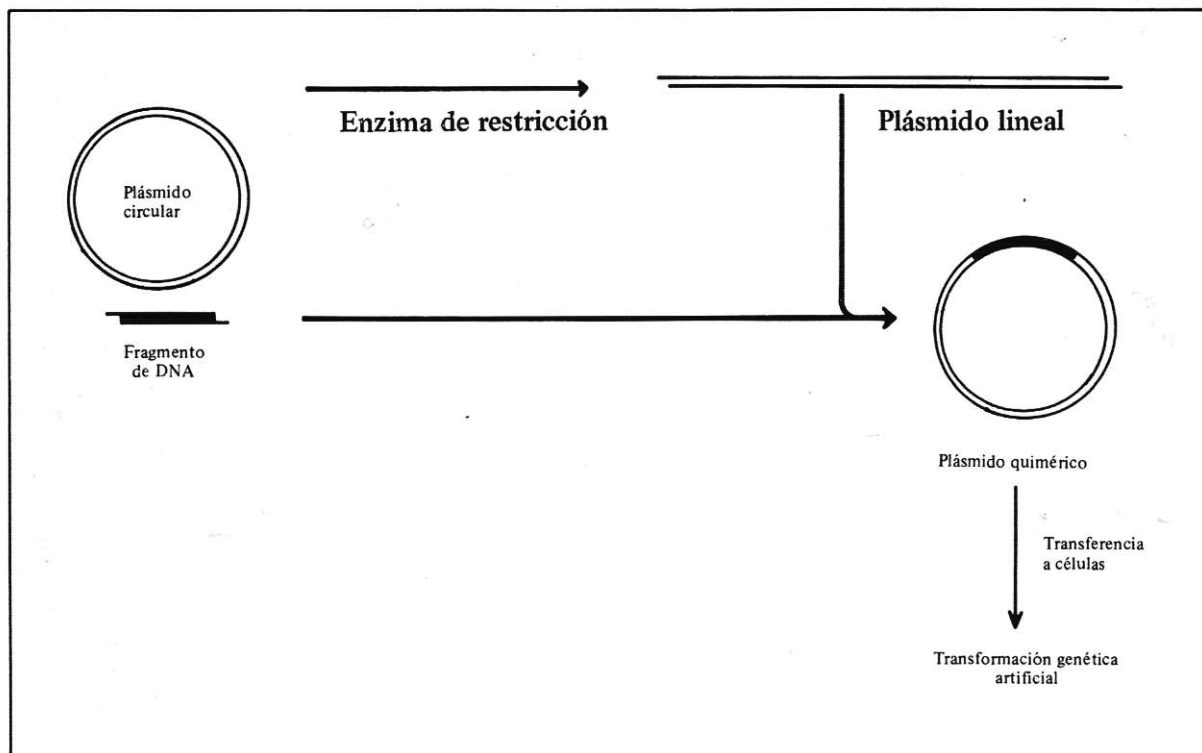


Figura 3. Experimento de clonamiento molecular.

INGENIERIA GENETICA

Es la rama de la biología dedicada a la manipulación artificial de genes incluyendo su síntesis, transferencia, replicación y expresión. Para sus fines la ingeniería genética utiliza tecnología de DNA recombinante incluyendo manipulación y empalme de genes y clonamiento de genes en vectores moleculares (plásmidos, virus o cósmidos). Los sistemas enzimáticos más usados para la aplicación de esta tecnología incluyen enzimas de restricción, transcriptasa reversa (que copia DNA sobre moldes de RNA), DNA polimerasas, nucleotidil-transferasa terminal (que permite agregar homopolímeros de nucleótidos en los extremos de moléculas de DNA), DNA ligasa, fosfatasa alcalina y nucleasa SI.

El procedimiento básico de la tecnología de DNA recombinante aplicada a la ingeniería genética comprende las siguientes etapas:

1. Generación de fragmentos (segmentos) de DNA que contienen las secuencias de nucleótidos (genes) deseadas.

2. Unión (empalme) de los segmentos de DNA seleccionados a un vehículo (vector) apropiado, capaz de reproducirse (replicar) en células vivas.
3. Introducción del vector en el huésped seleccionado (célula procarionota o eucariota) mediante modificación de las propiedades funcionales (permeabilidad) de la membrana celular.
4. Selección del clono celular que contiene la molécula de DNA recombinante y mantenimiento del clono en condiciones apropiadas de cultivo en el laboratorio.

La obtención de segmentos selectivos de DNA para clonamiento se puede lograr mediante los siguientes métodos:

- a) A partir de DNA celular, mediante el uso de endonucleasas de restricción.
- b) Por fabricación de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA mensajero celular, mediante uso de transcriptasa reversa.
- c) Por síntesis química de novo.

Endonucleasas de restricción. Las endonucleasas de restricción son enzimas obtenidas

en forma purificada a partir de diferentes especies de microorganismos, particularmente bacterias. Se conocen varias decenas de endonucleasas de restricción diferentes que pueden ser utilizadas para producir cortes en sitios específicos del DNA donde existen secuencias particulares de nucleótidos que son reconocidas por estas enzimas. De esta manera, se pueden generar fragmentos de DNA de tamaño y estructura particular, dependiendo de la enzima utilizada. Las secuencias reconocidas en el DNA por cada una de estas enzimas constan de 4 a 10 pares de bases y ellas ocurrirían por puro azar (tomando como promedio una secuencia de 6 pares de bases) una vez en aproximadamente cada 4.000 bases (Figura 4).

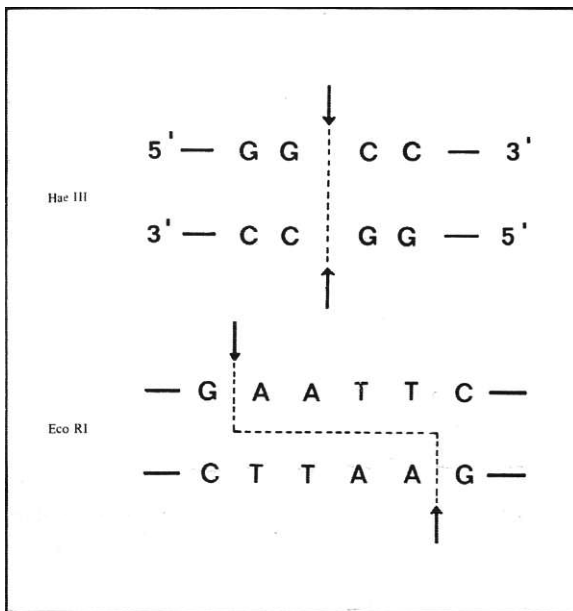


Figura 4. Secuencias de nucleótidos reconocidas por las endonucleasas Hae III y Eco RI.

Como el número de enzimas de restricción diferentes es grande y las secuencias por ellas reconocidas son variadas, su uso permite obtener fragmentos de DNA que consisten en segmentos de tamaño y composición muy diversos. Dichos fragmentos pueden ser luego separados selectivamente mediante procedimientos físico-químicos apropiados. Por estas razones, se comprende que las enzimas de restricción son instrumentos preciosos que han permitido desarrollar toda una "cirugía"

a nivel molecular, la cual ha sido invaluable para el desarrollo de la ingeniería genética.

Fabricación de cDNA. Para la fabricación de DNA complementario (cDNA) a partir de RNA mensajero se procede de acuerdo con las siguientes etapas:

1. Purificación completa o parcial del RNA mensajero (mRNA) deseado. Para lograr este fin se puede aprovechar el hecho de que los mRNAs de células eucariotas tienen en el extremo 3 una secuencia homopolimérica consistente en más de 50 residuos de ácido poliadenílico (poli-A), la cual permite su hibridación molecular con un homopolímero sintético de poli-dT. Generalmente el mRNA deseado es extraído a partir de especies celulares que lo contienen en forma particularmente abundante por su condición diferenciada.
2. Purificación del mRNA seleccionado a partir del mRNA celular total mediante procedimientos físico-químicos apropiados.
3. Transcripción del mRNA a cDNA mediante transcriptasa reversa.
4. Digestión del RNA del híbrido RNA:DNA mediante hidrólisis alcalina.
5. Conversión del cDNA de un solo filamento a cDNA de doble filamento mediante el uso de DNA polimerasa.

Síntesis química de DNA. El desiderátum de la ingeniería genética lo constituye la fabricación "de novo", mediante procedimientos puramente químicos, con independencia de células vivas, de oligo- o polinucleótidos totalmente sintéticos. En este sentido se ha progresado bastante con la aplicación de un método con fosfito-triésteres cuya eficiencia y rendimiento han sido incrementados mediante el uso de procedimientos automatizados. Se comprende que con la aplicación de estos métodos se abren horizontes hasta hace poco tiempo insospechados, no solamente para una producción en gran escala de secuencias de nucleótidos ya conocidas, sino también para la creación de genes artificiales nuevos, no existentes en la naturaleza. Eventualmente, estos genes podrán ser utilizados para mejorar o modificar selectivamente especies biológicas ya

existentes, o para crear especies biológicas desconocidas.

Bibliotecas de DNA humano. En los últimos años se han venido construyendo "bibliotecas" que almacenan en forma clasificada y catalogada segmentos particulares del genoma de la especie humana y de otras especies biológicas. Para la construcción de estas bibliotecas se procede de acuerdo con las siguientes etapas:

1. Obtención de fragmentos de DNA mediante enzimas de restricción.
2. Inserción de los fragmentos en vectores moleculares apropiados (plásmidos, virus o cósmidos).
3. Transformación de células (generalmente bacterias) por los vectores.
4. Selección de las bacterias transformadas para el segmento de DNA deseado.
5. Catalogamiento de los clones celulares transformados para el establecimiento permanente de bancos de DNA y bibliotecas de DNA.

Los bancos y bibliotecas de DNA permiten un fácil acceso a segmentos genómicos específicos que se requieren para las aplicaciones prácticas de la ingeniería genética.

APLICACIONES DE LA INGENIERIA GENETICA

Las aplicaciones ya existentes o posibles en un futuro próximo de la ingeniería genética al campo de las ciencias médicas, y de la biología en general, son de enorme variedad e importancia. A continuación se mencionan algunos ejemplos ilustrativos.

Producción de hormonas peptídicas. El primer polipéptido sintetizado por procedimientos de ingeniería genética fue la somatostatina, una hormona que contiene 14 aminoácidos. Esta síntesis, lograda en 1977 por Itakura, Riggs y sus colaboradores, tiene además el valor histórico de haber sido la primera vez que una sustancia de naturaleza polipeptídica fue obtenida mediante construcción de un gene sintetizado por métodos puramente químicos. En los años sucesivos han sido sintetizadas mediante procedimientos similares varias hormonas peptídicas de gran importancia médica tales como la insulina y la

hormona de crecimiento. La síntesis de algunas de estas hormonas se encuentra ya en su fase de producción a nivel industrial.

La insulina humana obtenida mediante tecnología de DNA recombinante no ofrece, de acuerdo con los ensayos clínicos realizados hasta ahora, ventajas importantes para el tratamiento de la gran mayoría de los pacientes diabéticos cuando se la compara con la insulina de origen porcino, de la cual difiere solamente en un aminoácido. De hecho es posible obtener insulina humana cambiando, mediante procedimientos químicos a nivel de la proteína, este aminoácido de la insulina porcina (alanina en el extremo carboxilo-terminal de la cadena B) por el que se encuentra presente en el mismo sitio de la insulina humana (treonina). La actividad biológica de la insulina humana es similar a la de la insulina porcina y solamente una pequeña proporción de pacientes diabéticos, particularmente los que tienen resistencia inmunológica adquirida a la insulina porcina o bovina, se benefician de su uso.

En el caso de la hormona de crecimiento, las ventajas de su obtención mediante tecnología de DNA recombinante son más aparentes pues los pacientes con deficiencia de esta hormona, particularmente los enanos hipofisarios, no pueden ser tratados sino con la hormona de origen humano, siendo ineficaz la obtenida de otros mamíferos (con excepción de primates superiores). Un problema práctico importante es el gran tamaño de la molécula de hormona de crecimiento humana, pues contiene 191 aminoácidos con dos puentes disulfuro. Afortunadamente, en fecha reciente se ha obtenido y purificado un factor liberador de hormona de crecimiento (GHRF), de origen humano. El factor consta de 44 aminoácidos y el gene respectivo ya ha sido clonado en bacterias. Las evidencias preliminares indican que una proporción de enanos hipofisarios podrá ser tratada con este factor, ya que responden a su administración liberando hormona de crecimiento endógena, lo cual indica que el origen de su trastorno está a nivel del hipotálamo, consistiendo en una falta de producción de GHRF.

Recientemente se han realizado experi-

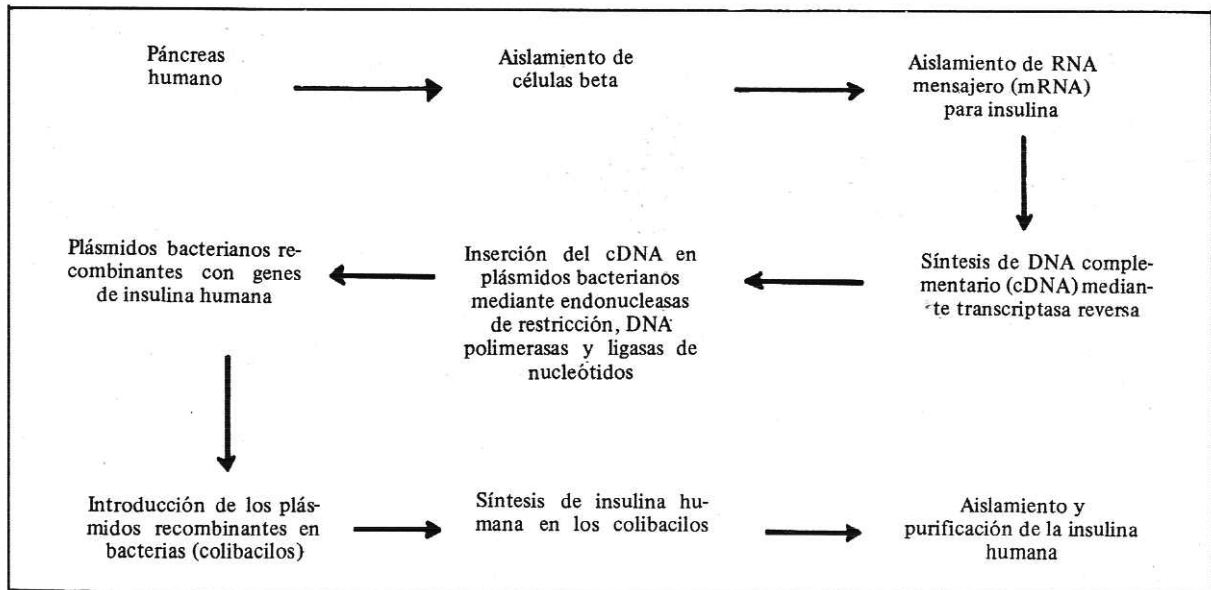


Figura 5. Producción de insulina humana mediante procedimientos de Ingeniería Genética.

mentos con resultados espectaculares para obtener animales gigantes mediante procedimientos de ingeniería genética. Segmentos de DNA conteniendo un promotor (estimulador selectivo de la transcripción) unido al gene estructural de la hormona de crecimiento de la rata fueron inyectados mediante micromanipulación en pronúcleos de óvulos de ratón fertilizados.

En estos experimentos, realizados por Palmiter y sus colaboradores en 1982, de 21 ratones que se desarrollaron en ratonas nodrizas a partir de los huevos manipulados artificialmente, 7 llevaban el gene de la hormona de crecimiento, y 6 de estos animales crecieron significativamente más que los otros miembros de la camada. Algunos de estos animales transgénicos (con genes foráneos insertados en su genoma) tenían en el hígado niveles extraordinariamente elevados de mRNA con secuencias correspondientes al de la hormona de crecimiento, y las concentraciones de hormona de crecimiento en la sangre estaban muy elevadas (hasta 800 veces por encima del valor normal). Este último fenómeno se debe tanto a una falta de operación de los mecanismos de "feedback" que regulan la síntesis y secreción de la hormona de crecimiento como a la expresi-

ón del gene en órganos grandes (hígado, riñón, intestino) que normalmente no la sintetizan.

Producción de interferón. Con el nombre de interferón se designa una familia compleja de proteínas celulares con propiedades antivirales e inmunoregulatoras producidas por animales multicelulares superiores. Se conocen al menos tres tipos de estas sustancias: interferones A, producidos por leucocitos; interferones B, de origen fibroblástico, e interferones C, también llamados inmunes. Cada tipo de interferón está compuesto por secuencias peptídicas diferentes que son producidas por diversas células en cantidades muy pequeñas, lo cual ha dificultado su aislamiento y purificación y su obtención en cantidades suficientes como para la aplicación médica. En los últimos años se han obtenido cDNAs que corresponden a diversos tipos de interferones y se ha progresado en la obtención de ellos mediante tecnología de DNA recombinante, lo cual permitirá obtener interferones puros y definir mejor sus posibles usos terapéuticos. También se espera la producción mediante procedimientos similares de numerosos tipos de vacunas para aplicación médica y veterinaria.

Sondas de DNA para diagnóstico. Mediante enzimas de restricción se pueden obtener fragmentos (sondas) de DNA humano de diversos tamaños, los cuales pueden ser hibridados luego con fragmentos particulares de DNA obtenido de células de pacientes con enfermedades en las cuales se sospecha la presencia de algún componente genético difícil de identificar por los métodos clásicos. Una sonda particular de DNA puede permitir la identificación de un locus genético o de un segmento del genoma que contenga varios genes con sus flancos correspondientes. De esta manera, las sondas pueden permitir reconocer polimorfismos en las secuencias de nucleótidos del DNA, especialmente cuando estos polimorfismos se asocian a variaciones en la longitud de los segmentos genómicos explorados por las sondas, con lo cual se pueden identificar diferencias a nivel genómico entre los pacientes y sujetos normales de control. Eventualmente, también se puede llegar a asignar a un cromosoma humano particular, y a una región específica dentro de un cromosoma, el sitio donde reside el cambio genómico que se asocia a la enfermedad.

Las ventajas que tiene este método de diagnóstico son notables. Ante todo, no es necesario conocer los defectos bioquímicos primarios de la enfermedad para poder aplicar exitosamente el método. Esta ventaja adquiere un carácter fundamental cuando se considera que para numerosas enfermedades humanas de origen genético definido, o que tienen un componente genético, no se conocen en detalle los defectos bioquímicos primarios. Este método está suministrando marcadores genéticos novedosos para enfermedades de etiología tan compleja como la arteroesclerosis y la diabetes mellitus. Una ventaja adicional del método de sondas de DNA es que permite hacer mapas de genes relacionados con una enfermedad cuando se estudian simultáneamente los polimorfismos detectados con las sondas y la segregación en familias de características fenotípicas polimórficas cuya herencia se conoce mejor (antígenos eritrocitarios, isoenzimas, antígenos HLA, polimorfismos de bandas cromosómicas). Después de la elaboración de los

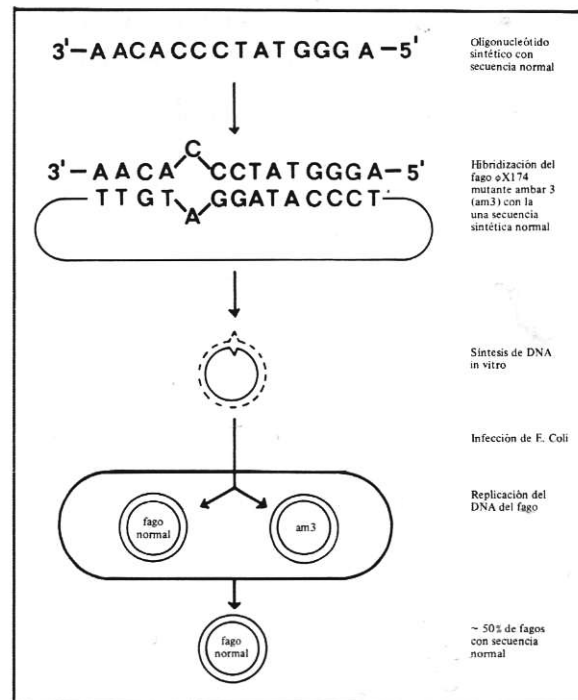


Figura 6. Corrección selectiva de una mutación en el bacteriófago $\phi X174$.

mapas, marcadores genéticos ligados en los mismos segmentos de DNA pueden ser usados con fines de asesoramiento genético.

Genoterapia. Mediante tecnología de DNA recombinante es posible lograr una reparación selectiva de mutaciones. La especificidad de sitio requerida se puede lograr mediante síntesis química de oligonucleótidos con secuencias vecinas complementarias a las del sitio de la mutación (Figura 6). Mediante este tipo de procedimiento Riggs y sus colaboradores han logrado por primera vez una "curación" de mutaciones en virus y otros investigadores la han conseguido en células procariotas y eucariotas cultivadas in vitro, lo cual abre el camino para una verdadera terapia genética (genoterapia).

Hay dos tipos de estrategia posibles para la genoterapia:

- Reparación del defecto genético in situ, como se acaba de señalar.
- Inserción de un gene funcional normal específico en cualquier otro sitio del genoma.

En fecha reciente se ha logrado por pri-

mera vez una curación de mutaciones en células humanas mediante genoterapia aplicada *in vitro* a células cultivadas de pacientes con enfermedad de Lesch-Nyhan. Esta enfermedad se hereda con carácter recesivo ligada al sexo, en forma similar a la hemofilia clásica, y se debe a deficiencia de la enzima hipoxantina-fosforribosil transferasa (HPRT), la cual determina una marcada sobreproducción de ácido úrico que se inicia ya en la infancia y produce síntomas graves; incluso retardo mental y tendencia a automutilaciones. Células cultivadas de estos pacientes han sido convertidas hereditariamente *in vitro* en células normales mediante infección con un retrovirus transductor que contiene secuencias de plásmidos recombinantes ligados a cDNA correspondiente al gene humano para la enzima normal.

Los principales problemas prácticos que se presentan actualmente para la genoterapia son los siguientes:

- a) Introducción eficiente de los genes seleccionados en células de organismos vivos.
- b) Posible peligrosidad de los vectores utilizados.
- c) Estabilidad de los genes introducidos artificialmente a través de generaciones celulares sucesivas.
- d) Modulación apropiada de la expresión de los genes introducidos, de manera que los respectivos productos proteicos tengan niveles fisiológicos cercanos a los normales.

CONCLUSIONES

Los avances impresionantes logrados en los últimos años en la ingeniería genética utilizando tecnología de DNA recombinante abren horizontes completamente nuevos para la medicina y las demás ramas de la biología. En el campo de las ciencias médicas, ya se han obtenido con estos procedimientos resultados positivos para el diseño de nuevos métodos que están siendo utilizados para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de numerosas enfermedades de diversa índole. Se comienza también a obtener resultados prácticos notables en la cría de animales y en la agricultura.

Los beneficios más importantes que se ha-

cen aparentes en el momento con la aplicación de la ingeniería genética son los siguientes: producción de alimentos más abundantes y baratos, manufactura de vacunas y medicamentos diversos, avances en el conocimiento de factores genéticos relacionados con procesos normales y patológicos y creación de nuevos métodos para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades.

Por otra parte, la aplicación de conocimientos adquiridos en el campo de la ingeniería genética no deja de suponer ciertos riesgos; cabe señalar los siguientes: aparición de procesos patológicos aún desconocidos en la especie humana y otras especies, dificultad para el diseño de medidas apropiadas para evitar tales riesgos, liberación y supervivencia irreversible de organismos nuevos fuera de los laboratorios y aplicación indebida o malintencionada de los productos de manipulaciones genéticas, que puedan terminar afectando a sus propios creadores.

Como conclusión de carácter general, cabría decir que la ciencia debe orientar sus procedimientos y sus fines de acuerdo con la responsabilidad ética, social y política que le corresponde como producto de la creatividad humana.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- CLINE M H, Gene therapy. *Mol Cell Biochem* 1984; 59:3-10.
- 2.- ITAKURA K. Chemical synthesis of genes. *Trends Biochem Sci* 1982; 7:442-445.
- 3.- ITAKURA K, RIGGS A D. Chemical DNA synthesis and recombinant DNA studies. *Science* 1980; 209: 141-1405.
- 4.- KLINGMUELLER W. Moeglichkeiten und Grenzen der genetischen Manipulation. *Naturwissenschaften* 1981; 68:120-127.
- 5.- MILLER W L. Recombinant DNA and the pediatrician. *J Pediat* 1981; 99:1-15.
- 6.- MOLUSKY A G. Impact of genetic manipulation on society and medicine. *Science* 1983;219:135-140.
- 7.- MURRAY K. Genetic engineering: possibilities and prospects for its application in industrial microbiology. *Phil Trans Roy Soc London* 1980; B290:369-386.
- 8.- RIGGS A D, ITAKURA K: Synthetic DNA and Medicine. *Amer J Hum Genet* 1979; 31:531-538.
- 9.- SCHROEDER D, SUEHLKE H. Gene technology, characterization of insulin gene and the relationship to diabetes research. *Endokrinologie* 1982; 79:197-209.
- 10.- SIDDIQUI M A Q. Recombinant DNA technology and its application to developmental biology. *J Craniofacial Genet* 1982;2:75-92.