



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**

**LA INGENIERIA GENETICA Y SU APLICACION FARMACEUTICA**

**T E S I S**

**Que para obtener el Título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a**

**ESTELA ELBA OLMOS CAMACHO**

**1985**

**CUAUTITLAN ESTADO DE MEXICO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

### I INTRODUCCION

### II GENERALIDADES

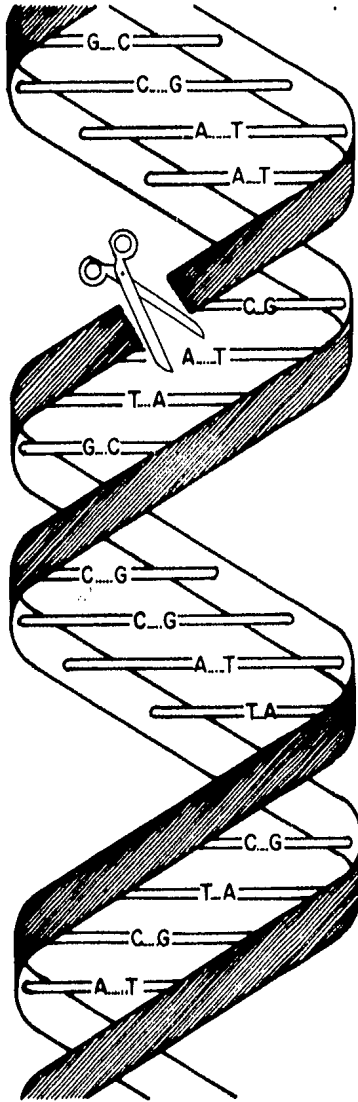
- a) Breve análisis de la estructura y función del DNA en la síntesis de proteínas.
- b) El gen y sus principales métodos de obtención de utilidad en la Ingeniería Genética.
- c) Definición de Ingeniería Genética y los pasos más importantes dentro de un proceso de preparación de DNA recombinante.

### III APLICACIONES DE LA INGENIERIA GENETICA EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA.

- a) Compuestos obtenidos por técnicas recombinantes
  - Anticuerpos
  - Hormonas
  - Interferón
  - Factor VIII
- b) Productos futuros que promete la Ingeniería Genética.
- d) Riesgos de la Ingeniería Genética.

- RESUMEN
- CONCLUSIONES
- GLOSARIO
- BIBLIOGRAFIA

L A I N G E N I E R I A G E N E T I C A



Esta tecnología permite la obtención de fragmentos de DNA para su posterior manipulación. Las tijeras representan las enzimas de restricción con las cuales se " corta " la doble hélice de DNA. (49)

## INTRODUCCION

No cabe duda que la utilización de los microorganismos para la obtención de diversos productos han acarreado grandes beneficios desde hace miles de años, ya que el hombre aún sin conocerlos ha sabido aprovecharlos. Hubo que esperar largo tiempo para que las contribuciones de la Ciencia demuestran su existencia y que dichos microorganismos son como máquinas perfectamente coordinadas y que la elaboración de estos útiles productos están determinados por los genes. <sup>(1)</sup> Este último hecho ha sido posible determinarlo gracias al vertiginoso desarrollo de una nueva rama de la Biología Molecular que es conocida con el nombre de Ingeniería Genética. Esta nueva metodología constituye un poderoso instrumento de laboratorio para revelar detalladamente la función del gen, ya que permite aislar un segmento de material genético de cualquier ser vivo o sintetizarlo químicamente e introducirlo en una bacteria, en otras palabras se programa genéticamente a un microorganismo para la producción de una sustancia en especial en esta célula receptora, debido a que se ha demostrado que los mecanismos genéticos para obtener una proteína en una célula es universal es decir funciona para todos los seres vivos. (2)

En la naturaleza existen diversos recursos para lograr una recombinación genética y son conocidos como procesos sexuales que incrementan notablemente los cambios . en el material genético original es decir se inducen modificaciones que son la base de la evolución. Sin embargo se debe recordar que los orga-

nismos existentes tanto plantas como animales, si bien son el producto de la evolución de especies, retienen su identidad básica de generación en generación, debido a la presencia de barreras ecológicas, fisiológicas y genéticas. Estas barreras resultan de la imposibilidad de intercambiar información genética entre organismos no relacionados entre sí. (3)

Esto se presta a confusión, puesto que existiendo barreras que no permiten la recombinación genética entre organismos de especies diferentes, por otro lado se pretende introducir genes de células humanas a bacterias para lograr una mezcla de especies, algo inexistente en la naturaleza, o sea un organismo quimérico, sin embargo si a esto se antepone el deseo del hombre que desde tiempos muy remotos ha soñado con este fin se entenderá que hoy en día este sueño empiece a tornarse realidad gracias al desarrollo de la manipulación genética (Ingeniería Genética), entendiéndose la manipulación en el sentido literario de trabajar con las manos, suponiéndose que se conoce y se domina el material objeto de la manipulación.

El aprovechamiento de esta metodología se da en múltiples áreas como son: la Medicina, la Industria Química, la Alimenticia, la Agricultura entre otras. (4) Una de las contribuciones más grandes de la Ingeniería Genética esta sin duda en la tecnología Farmacéutica, dado que en este campo se han logrado avances al incrementarse la producción de compuestos utilizando microorganismos y que

anteriormente solo producía el hombre y determinado tipo de animales, de los cuales se extraían de manera drástica y costosa; el logro final será obtener una disminución en el costo de producción por lo tanto no sería sorprendente que en un futuro no lejano se obtengan productos farmacéuticos sintetizados por bacterias en el mercado.



## OBJETIVO

Durante años ha sido de interés humano descifrar y llegar a comprender la estructura del material hereditario además de las alteraciones o cambios genéticos observados tanto en plantas como animales a través de la evolución, es por eso que después de los hallazgos de grandes investigadores y el descubrimiento de importantes conceptos que llevarían a la invención de una prometedora tecnología llamada Ingeniería Genética, se quiere recopilar en este trabajo la información para tratar de visualizar las nuevas rutas que nos marca el estudio de la Ingeniería Genética, además de ofrecer al lector un ahorro de tiempo y trabajo, dado que dicha recopilación en un tema tan novedoso y estudiado en gran parte del mundo ofrece un cúmulo de información en vista de que abarca muchas áreas como son la Industria Química y de transformación, Agricultura, Industria Alimenticia etc. nos limitaremos tan solo a los beneficios obtenidos hasta ahora dentro del campo de la industria Farmacéutica. Se ofrecerá un panorama real basado en estudios hechos actualmente de las perspectivas que nos marca la Ingeniería Genética para tratar de resolver problemas humanos, tales como el desarrollo de la Tecnología Farmacéutica como posible solución a problemas médicos.

## II GENERALIDADES

Mucho se podría decir acerca de los antecedentes que abrieron las puertas al nacimiento de la Ingeniería Genética, existe bastante información aún tratándose de la historia reciente de la Biología por tal motivo se mencionarán tan solo las contribuciones científicas que se consideran las más importantes y que directamente cristalizaron en el desarrollo de esta metodología. (5)

a) Breve análisis de la estructura y función del DNA en la síntesis de proteínas. ( 6-12 )

El extraordinario y atractivo reto que se le ha presentado al hombre de poder llegar a entender la estructura del material genético en especial el humano ha sido uno de los factores que han motivado a la incursión en el campo de la Genética a numerosos científicos desde la antigüedad, los estudios que se consideran de mayor relevancia para la comprensión más científica de la naturaleza del material genético y su función comenzaron en 1944 con O. Avery y sus colaboradores del Instituto Rockefeller quienes demostraron que el encargado de la transmisión de la herencia es el DNA ( ácido desoxirribonucleico ).

Este material que 75 años antes aislara el bioquímico Friedrich Miescher estimuló las investigaciones sobre la composición y forma espacial de las moléculas que lo constituyen, en 1953 J. Watson y F. Crick elucidaron estas características por medio del análisis de la estructura de esta molécula y revelaron que se halla constituida de:

- 1.- Azúcar: Glúcido con cinco átomos de carbono ( pentosa) en el DNA es desoxirribosa y en el RNA ribosa.
- 2.- Base: Entidad química que contiene nitrógeno, puede ser púrica o pirimídica.
- 3.- Fosfato.

Un azúcar una base y un fosfato se combinan para formar un nucleotido los que a su vez se combinan por medio de enlaces fosfodiéster para formar polinucleótidos dando estos finalmente una larga cadena.

Los conocimientos anteriores ayudaron a que se propusiera un modelo explicativo de la estructura de la molécula de DNA quedando establecido que dicha molécula está formada por dos cadenas de polinucleótidos que tiene la apariencia de doble hélice. ( 7 ).

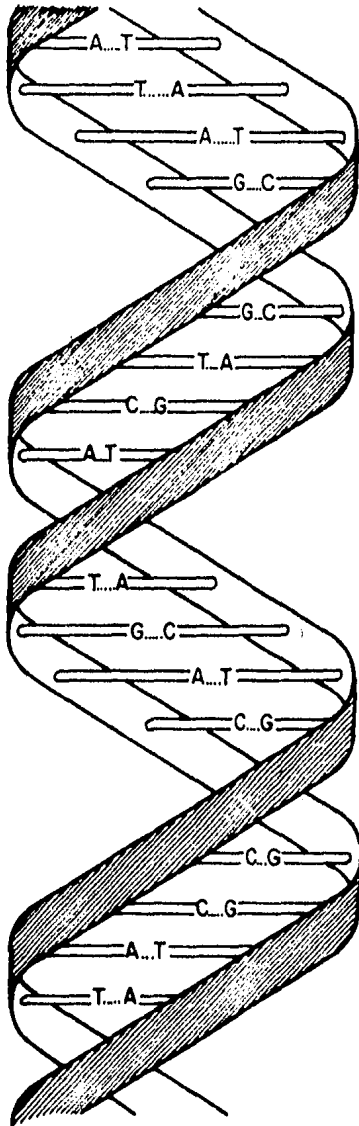


Fig. 1.- Modelo de la forma y estructura del ácido desoxiribonucleico en donde se puede apreciar la disposición de doble hélice y como peldaños de una escalera las moléculas de las bases cuya secuencia encierra la información transmisible del DNA. (4)

Esta doble cadena corre antiparalela y complementaria, es decir las cadenas corren en dirección opuesta y están unidas por puentes de hidrógeno que se establecen entre las bases de ambas cadenas. Estas bases son dos pirimídicas citosina ( C ) y timina ( T ) y dos púricas la adenina ( A ) y la guanina ( G ), tal apareamiento debe estar con la regla que dice que siempre la adenina se aparea con la timina y la citosina con la guanina, dando como consecuencia que la doble hélice tenga diámetro constante. fig.1

Se vislumbra por medio de estas características que al formarse la doble cadena al centro de esta se encuentran dispuestas como peldaños de una escalera las moléculas de las bases y que el fosfato de desoxiribosa se repite monótonamente en la doble cadena no así las cuatro bases por lo tanto, el orden de las cuatro bases encierra la información transmisible del DNA, funcionando estas como signos de un alfabeto convencional o código y sus combinaciones en grupos de tres constituyen mensajes que enviados al citoplasma por medio del RNA se da la síntesis de moléculas proteicas, hecho que es posible al llevarse a cabo la transcripción y la traducción.

El DNA contiene pues un código genético, pero la síntesis de proteínas ocurre en el citoplasma, en asociación con organelos citoplasmáticos llamados ribosomas. El RNA es el enlace entre DNA y proteínas.

La molécula de RNA está formada por una sola cadena que es muy semejante a cada una de las que constituyen el DNA, cuya composición difiere solo por su contenido de ribosa en vez de desoxiribosa y uracilo en vez de timina. Todos los tipos de RNA se sintetizan sobre un patrón de DNA por transcripción por medio de la enzima RNA polimerasa, originándose una cadena de RNA complementaria. Existen tres tipos de RNA: RNA mensajero, de transferencia

y ribosomal los tres participan en la síntesis de proteínas, el RNA mensajero llevando la información genética desde la molécula de DNA al citoplasma; el RNA de transferencia actúa como adaptador que coloca los aminoácidos ( unidades fundamentales constitutivas de las proteínas ) en el lugar adecuado de la cadena proteica en vía de crecimiento y el ribosomal el cual cumple una función en conexión con los ribosomas.

Tanto el RNA de transferencia como el mensajero actúan en el proceso de traducción en donde sucesivos tripletes ( secuencia de tres bases ) del RNA mensajero dictan el orden de los aminoácidos que transportados por el RNA de transferencia se unen al ribosoma hasta formar la proteína completa.

A la relación existente entre DNA-RNA-Proteínas se le califica como Dogma Central de la Genética Molecular.<sup>(2)</sup> Por lo tanto para la síntesis de cualquier proteína la información se halla contenida en el orden o secuencia de bases en el DNA, el cual es universal, es decir se trata de un código genético para todos los organismos lo cual hizo pensar que si de alguna manera se lograra introducir un gen en una célula el cual contenga sentido de lectura o sea que codifique para una determinada proteína es de esperarse que la célula receptora la sintetice.

b) El gen y sus principales métodos de obtención para su uso en la Ingeniería Genética.

Un gen es un segmento de DNA que forma el código para un polipéptido determinado (proteína), o bien un tramo a lo largo de un cromosoma que codifica para un producto funcional que puede ser RNA, o un producto de la traducción o sea una proteína, es por eso que se considera al gen como la unidad de información hereditaria. El querer estudiar al gen, su función, así como sus propiedades fisicoquímicas y biológicas trajo consigo su aislamiento y purificación, y ya que era conocida su naturaleza química marcó la posibilidad de quererlo sintetizar en el laboratorio. Desde hace veinte años la construcción de genes totalmente sintéticos fue un verdadero drama algo que la mayoría de los químicos y genetistas no esperaban, afortunadamente la química de los ácidos nucleicos fue considerada importante e interesante y en 1960-1970 se realizaron grandes progresos que abrieron paso a darse: El primer método para la obtención de genes sintéticos.

La producción de genes totalmente sintéticos fue lograda por H. G. Khorana (13,14), esto apoya grandemente al inesperado desarrollo de las técnicas de Ingeniería Genética, pero si bien esta síntesis es algo espectacular ofrece por lo mismo la implicación de métodos químicos bastante sofisticados y complicados por lo que solo se mencionara brevemente la técnica utilizada para obtenerlos en el laboratorio y un esquema representativo de la

reacción con los pasos más importantes de la misma.

#### Método del diester

El método del diester fué el primero en desarrollarse por Khorana y sus colaboradores en 1977. (14)

La reacción se puede resumir en tres pasos principales, consistiendo el paso inicial en la protección química de grupos reactivos en la molécula de un desoxirribonucleótido y un desoxirribonucleósido tanto en el extremo 3' como 5'. Esto se logra al agregar un grupo químico que tenga la característica de que al unirse haga que el extremo pierda su reactividad química. Por lo tanto los grupos que no han quedado protegidos siguen conservando dicha reactividad, por lo que la segunda etapa consiste en la formación de un didesoxirribonucleotido por medio de un enlace fosfodiéster. La tercera etapa consiste en seguir añadiendo nucleótidos de acuerdo con las características del polinucleótido que se pretenda obtener. La eliminación de los grupos protectores de la molécula se logra con una hidrólisis tanto ácida como básica en dos pasos para así llegar finalmente a la síntesis de un polinucleótido. En la figura 2 se muestra el esquema de los pasos más importantes de la reacción.

#### Método del triester

Este método se ha perfeccionado recientemente y presenta la ventaja de un mayor rendimiento y velocidad. La principal diferencia de los métodos de diester y triester es la presencia en este últi-



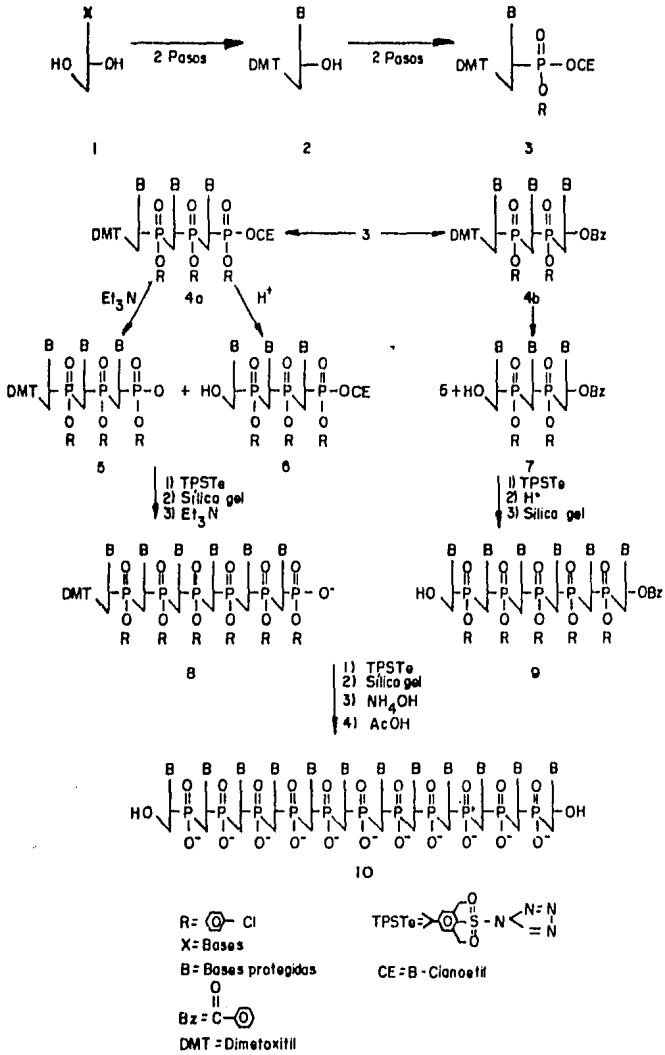
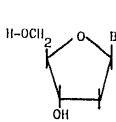
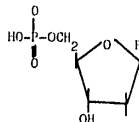


Fig 3.-Obtencion de genes sinteticos por el método del Triester (13.)

moleculas de desoxiribonucleosido a y desoxiribonucleotido b "originales"

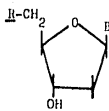


a

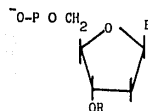


b

moleculas de desoxiribonucleosido a<sub>1</sub> y desoxiribonucleotido b<sub>1</sub> "protegidos"



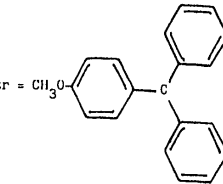
a<sub>1</sub>



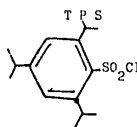
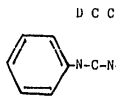
b<sub>1</sub>

B= Nucleos

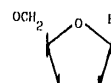
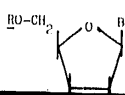
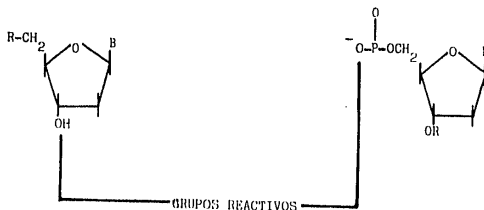
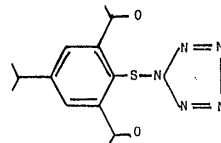
R o grupo protector = Me Otr = CH<sub>3</sub>O



B=Bases



T P S Te



DCC  
TPS  
TPS Te

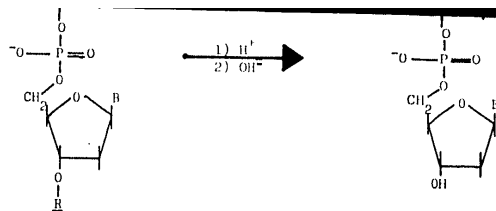


Fig 2.- Obtención de polinucleótidos por el método del diéster, se muestran los grupos tanto "protegidos" como "reactivos" así como los compuestos empleados en los diferentes pasos de la reacción. (14)

-no de un grupo protector extra sobre los átomos de fosfato de los reactivos y productos, el protector del grupo fosfato es un grupo clorofenilo el cual vuelve los nucleótidos intermedios solubles en solventes orgánicos, por lo tanto las purificaciones son hechas con cloroformo. En la figura tres se muestra el esquema del método del triéster en sus pasos más importantes. Existen además de la obtención de genes por vía sintética otros dos métodos para la obtención de genes pero esta vez de manera natural es decir de la propia célula y son: por medio del uso de las enzimas de restricción y a través de la enzima transcriptasa inversa.

El trabajo realizado por los laboratorios de todo el mundo han facilitado notablemente la ruptura de moléculas gigantes de DNA en una serie de fragmentos cortos. Esta operación se realiza con la ayuda de las enzimas especiales llamadas NUCLEASAS<sup>(78)</sup>: de estas se conocen como ENDONUCLEASAS aquellas que rompen de preferencia enlaces internos, mientras que las que cortan nucleótidos terminales se llaman EXONUCLEASAS, todas estas enzimas degradan enlaces fosfodiéster de cadenas de polinucleótidos. fig 4

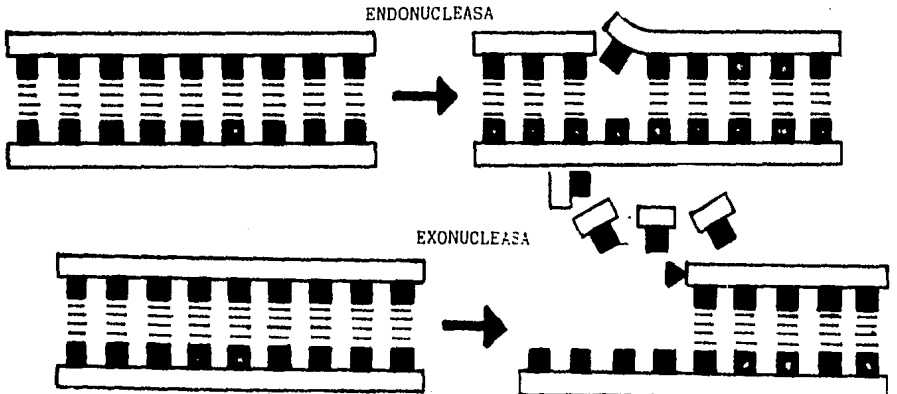


fig. 4.- Representación esquemática de la acción de las endo y exonucleasas relacionadas con la ruptura de enlaces de DNA. (78)

Hace aproximadamente nueve años Smith y Wilcox lograron el aislamiento de una enzima que corta el DNA obtenido de cualquier organismo en sitios específicos y de esta manera generar pequeños fragmentos de DNA por lo tanto de esta manera se logra aislar a los genes naturales. Estas nucleasas específicas denominadas como enzimas de restricción (15-20) solo hacen rupturas dentro de secuencias de bases específicas las cuales poseen un eje de simetría, es decir estas secuencias se leen lo mismo en una dirección que en otra, dichas secuencias se denominan PALINDROMAS por ejemplo:

AAG CTT  
TTC GAA

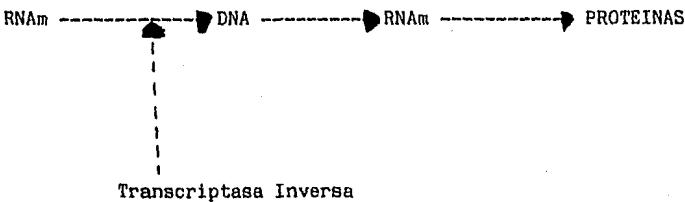
puesto que se encuentra la misma secuencia en ambas cadenas del DNA ( aunque con ordenamiento opuesto ) tales enzimas siempre crean rupturas en las dos cadenas quedando ambas con terminales autoadhesivas y presentando fuerte tendencia a la recombinación genética. Las enzimas de restricción son de origen microbiano y forman parte del sistema defensivo de la célula contra ácidos nucleicos extraños. Se han caracterizado alrededor de cien enzimas de restricción en los últimos años de especificidad diferente y para ejemplificar su acción se mencionan algunas en la tabla 1.

## ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

ENZIMA	SECUENCIA DE BASES HIDROLIZADA.	MICROORGANISMO PRODUCTOR
Eco RI	-C-T-T-A-A-G- -G-A-A-T-T-C-	E. coli RY13 E. coli Bs5
Eco RII	-N-G-G-A-C-C-N -N-C-C-T-G-G-N	E. coli R245
HindIII	-T-T-C-G-A-A- -A-A-G-C-T-T-	Haemophilus influenzae Rd
Hpa II	-N-G-G-C-C-N- -N-C-C-G-G-N-	Haemophilus parainfluenzae
Hpa I	-G-T-T-A-A-C- -C-A-A-T-T-G-	Haemophilus parainfluenzae
Alu I	-A-G-C-T- -T-C-G-A-	Arthrobacter lutes
BAM H-I	-G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G-	Bacillus amyloliquefaciens
Hha I	-G-C-G-C -C-G-C-G	Haemophilus haemolyticus
Sal I	-G-T-C-G-A-C- -C-A-G-C-T-G-	Streptomyces albus G.

Tabla 1.: Secuencias que reconocen algunas endonucleasas restrictivas y el microorganismo del cual se obtiene. (16)

Existe un procedimiento muy ingenioso para la obtención de un gen natural en el que se hace uso de la enzima TRANSCRIPTASA INVERSA, ésta es codificada por virus en los que la información hereditaria no esta contenida en el DNA sino en cadenas de RNA, por lo que se les llama-- virus RNA y que causan la transformación permanente y heredable de -- ciertas células normales en células malignas cancerosas. Al respecto de que como el RNA de estos virus que contienen genes cancerígenos-- es transcrito a la forma de DNA para incorporarse a el genoma de la célula huésped como una parte del mismo fué desconocida hasta que Baltimore (2,22) descubrió a las enzimas transcriptasas inversas que son capaces de producir cadenas complementarias de DNA a partir de un molde de RNA y luego convertir a estas cadenas de DNA a la forma de doble hélice.



De esta manera se vislumbra la posibilidad de obtener  $\text{RNA}_m$  de una célula el cual tenga la información para obtener la proteína deseada una vez lograda la obtención de el  $\text{RNA}_m$  se procede a hacer uso de la enzima transcriptasa inversa y por medio de esta se puede obtener el DNA o sea el gen de interés. (23)

Hasta ahora se ha hecho mención de que la información genética esta contenida en fragmentos o genes sin embargo algo importante que no se ha hecho notar es la manera en la que se distingue una información para la síntesis de determinada proteína de otra es decir algo que separe un gen de otro, esto se debe a que a lo largo de la molécula de DNA existe una serie de ordenes codificadas tambien en forma de secuencias de bases en la que la más simple de estas ordenes indica "comenzar aquí" y "terminar aquí" lo anterior nos dice que existen secuencias de iniciación y terminación que marcan donde se debe de empezar a sintetizar una proteína y hasta donde se encuentra la información para obtenerla, sin embargo esta proteína no se puede estar sintetizando siempre o sea en forma indefinida lo que hace pensar como es que se regula la expresión genética. Se ha observado que organismos eucarióticos tanto plantas como animales poseen miles de veces mas DNA que el contenido en las bacterias, esto es debido al aumento en el número de genes y la presencia de secuencias no codificadoras o sea sin sentido de lectura clasificados como genes funcionales y llamados intrones el motivo por el cual el DNA contiene la información hereditaria en forma discontinua no se sabe a ciencia cierta y se dice que es debido a que los intrones funcionan como reguladores de la expresión genética. (24,25)



En 1961 Jacob y Monod por medio de un modelo, explicaron como se lleva a cabo esta regulación en procariotes y postulan la interacción de tres tipos de genes que funcionan como un conjunto unitario. Este modelo es llamado del operón siendo éste, un grupo lineal de genes cuya actividad es coordinada por un gen funcional llamado OPERADOR que ejerce un control positivo sobre la síntesis de proteínas es decir dando la señal de arranque para la producción de la proteína, el gen operador es a su vez controlado por un gen REGULADOR este ejerce un control negativo sobre la síntesis de proteínas al codificar los genes REPRESORES: moléculas proteicas específicas que inhiben al operador por ligarse a el con lo que se evita la transcripción del RNA mensajero y por consecuencia la síntesis de proteínas. fig 5

Algunos represores no pueden actuar de la misma forma que son sintetizados sino que antes deben combinarse con alguna otra sustancia que confiera al represor la estructura adecuada para unirse con su operador, a esta sustancia se le denomina CORREPRESOR. Dado que un represor inhibe la síntesis de su proteína correspondiente debe ser inactivado cuando se requiera la proteína en cuestión. Diversas sustancias actúan como inductores específicamente las que se combinan con las moléculas represoras para impedir que se combinen con sus operadores específicos. En resumen estos genes actúan a nivel de transcripción y traducción como un sistema de retroalimentación para regular la producción de proteínas. (26,27,62).

En 1961 Jacob y Monod por medio de un modelo, explicaron como se lleva a cabo esta regulación en procariotes y postulan la interacción de tres tipos de genes que funcionan como un conjunto unitario. Este modelo es llamado del operón siendo éste, un grupo lineal de genes cuya actividad es coordinada por un gen funcional llamado OPERADOR que ejerce un control positivo sobre la síntesis de proteínas es decir dando la señal de arranque para la producción de la proteína, el gen operador es a su vez controlado por un gen REGULADOR este ejerce un control negativo sobre la síntesis de proteínas al codificar los genes REPRESORES: moléculas proteicas específicas que inhiben al operador por ligarse a el con lo que se evita la transcripción del RNA mensajero y por consecuencia la síntesis de proteínas. fig 5

Algunos represores no pueden actuar de la misma forma que son sintetizados sino que antes deben combinarse con alguna otra sustancia que confiera al represor la estructura adecuada para unirse con su operador, a esta sustancia se le denomina CORREPRESOR Dado que un represor inhibe la síntesis de su proteína correspondiente debe ser inactivado cuando se requiera la proteína en cuestión Diversas sustancias actúan como inductores específicamente las que se combinan con las moléculas represoras para impedir que se combinen con sus operadores específicos. En resumen estos genes actúan a nivel de transcripción y traducción como un sistema de retroalimentación para regular la producción de proteínas. (26,27,62 ),

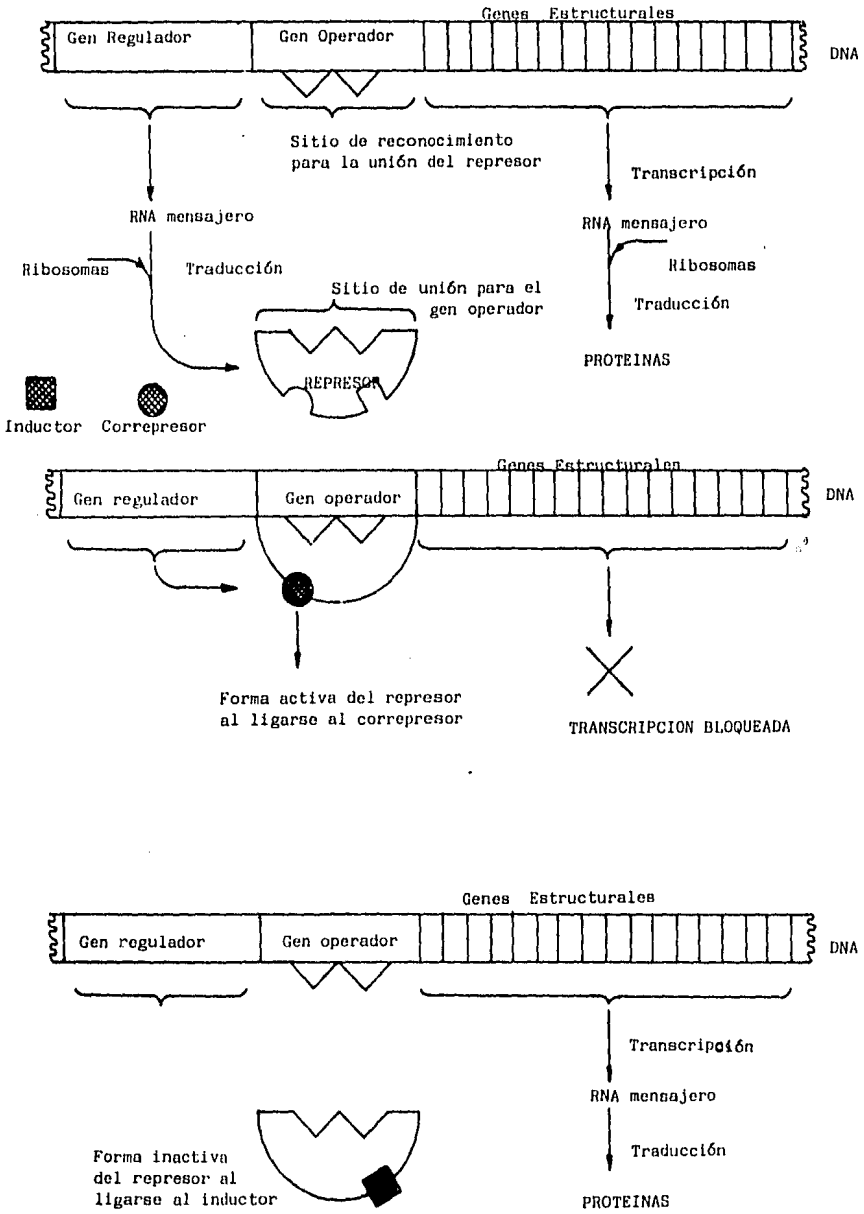


Fig 5.- Se ilustra el modelo del operón mostrándose la interacción de los tres genes (70)

c) Definición de Ingeniería Genética y los pasos mas importantes dentro de un proceso de preparación de DNA recombinante.

Ingeniería Genética es el término con el que se conoce a la metodología llamada recombinación "in vitro" de DNA, esta permite la manipulación de fragmentos específicos de material genético en un tubo de ensaye. (28)

En otras palabras gracias a esta metodología hoy es posible aislar un segmento de DNA de cualquier ser vivo e introducirlo en una bacteria para su posterior estudio detallado.

Mas aún la Ingeniería Genética ha permitido la expresión de genes sintetizados en el laboratorio y con estos genes sintéticos es posible programar una cepa bacteriana para la producción de una determinada proteína. Debido a que las enzimas de restricción generan fragmentos que pueden ser unidos por otras enzimas llamadas ligasas de DNA, es por lo tanto posible cortar y reconstruir moléculas de DNA en gran variedad de formas y todo esto in vitro. Como se vislumbra esta metodología. deriva de una elegante manipulación de la Genética microbiana.

Aunque las técnicas de manipulación genética son complejas lo principal es facil de entender, existen tres problemas principales que son: La producción del gen adecuado, La inserción del gen en un organismo efectivo que se replique y se reproduzca, y por último asegurarse de la inserción del gen y que este se exprese dandose con esto la producción de la proteína en cuestión. (29)

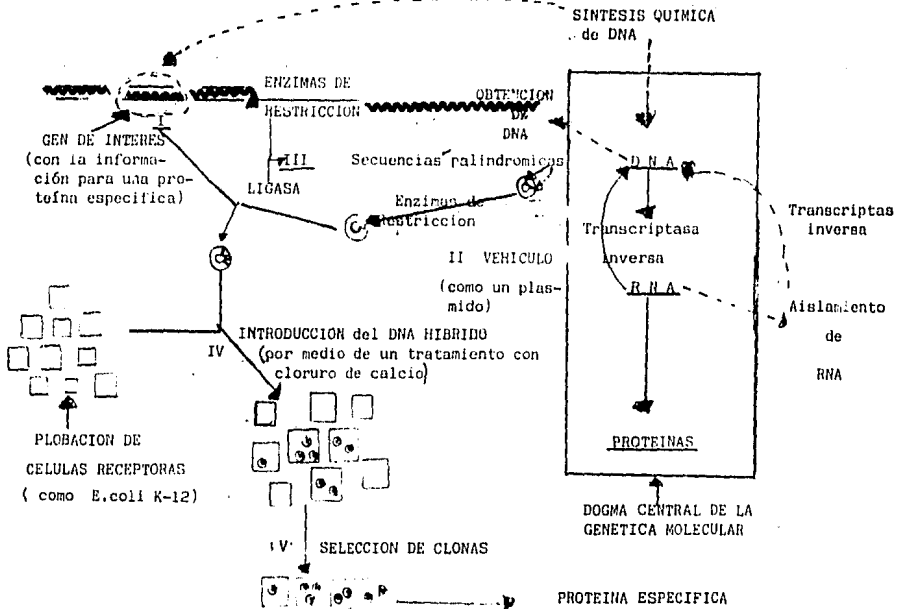


Fig. 6.- Esquema ilustrativo que nos muestra los principales pasos de que se vale la Ingeniería Genética para la obtención de una proteína específica,

I Obtención del GEN DE INTERES

II Obtención de un VEHICULO o transportador, que pueda replicarse dentro de una célula receptora.

III Con la ayuda de las ENZIMAS DE RESTRICCIÓN y las LIGASAS DE DNA es posible cortar y volver a unir moléculas de DNA obtenidas de diferentes fuentes.

IV INTRODUCCION DEL DNA HIBRIDO a la célula receptora funcional.

V SELECCION DE CLONAS a partir de una gran población de células la cual a adquirido el DNA híbrido.

Las técnicas de Ingeniería Genética requieren de varias manipulaciones de tipo bioquímico y biológico en el laboratorio, que pueden resumirse en los siguientes puntos:

- 1) La selección de un transportador molecular o vehículo que pueda replicarse dentro de una célula receptora: 2) Un método para romper y unir moléculas de DNA obtenidas de diferentes fuentes; 3) Un modo de introducir la molécula de DNA híbrido, o recombinante, dentro de una célula bacteriana funcional y 4) Un método para seleccionar a partir de una gran población de células una "clona" de células que han adquirido el DNA recombinante. (30)

#### I) Selección del transportador molecular.

Algunas bacterias contienen además de material genético circular de gran tamaño, diversas moléculas pequeñas y circulares conocidas como "plásmidos". Todos los plásmidos conocidos son unidades autónomas de replicación esto es son capaces de copiarse así mismos independientemente, algunos de ellos se les denomina factores de resistencia por que al introducirse en alguna bacteria confieren a su huésped la capacidad de resistencia a los antibióticos. (62) Por estas especiales propiedades los plásmidos se seleccionaron como los transportadores idóneos en la Ingeniería Genética. (30)

El plásmido se purifica por ultracentrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio/ bromuro de etidio, después de la extracción total del DNA bacteriano ( plásmido mas DNA cromosómico) debido a que el plásmido es una molécula circular con múltiples enlaces es capaz de unirse a los moléculas de bromuro de etidio por lo que adquiere un mayor peso específico y se deposita en el fondo.

fig.7 .

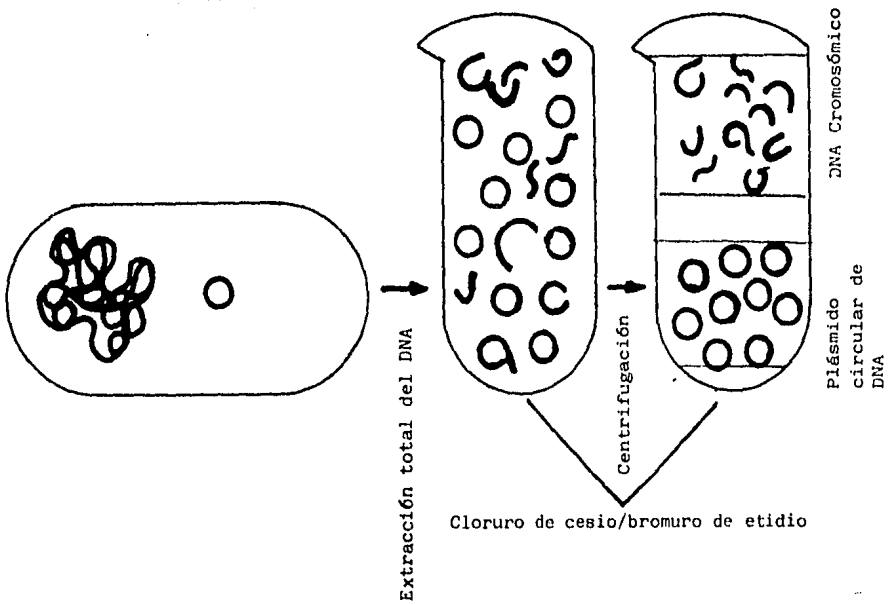


Fig. 7 - El diferente comportamiento de ambos DNAs frente al bromuro de etidio hace que el DNA plasmídico adquiera un peso superior y se separe formando un anillo en el fondo del tubo de centrifuga de donde se separa puro. (30)

2) Esbozo del método para romper y unir moléculas de DNA obtenidas de diferentes fuentes. ( 30 )

La inserción del gen con la información genética para el producto deseado con el transportador o plásmido se hace por medio del uso de las enzimas de restricción y otras enzimas llamadas ligasas de DNA. Como se sabe las enzimas de restricción hidrolizan al gen en posiciones específicas o palindromas por lo tanto el plásmido que sufre ruptura por acción enzimática se transforma en lineal y de esta manera se puede unir la nueva información genética además cuando se requiere se les proporciona tanto al plásmido como al gen a insertar extremos adherentes y debido a al principio de que los pares de bases se acomodan de acuerdo a los trabajos de Watson y Crick, purina con pirimidica ( A-T, G-C ) La unión entre estos extremos se da debido a la fuerza cohesiva de las terminales de ambas cadenas, añadiéndose también la enzima DNA ligasa que es la que cataliza dicha unión. Resulta por lo tanto un DNA híbrido o recombinante consistente en el plásmido y la nueva información genética para el producto deseado. figs. 8,9.

3) Transferencia de DNA recombinante o introducción del DNA híbrido a la célula.

La introducción del DNA recombinante a la célula huésped se lo-



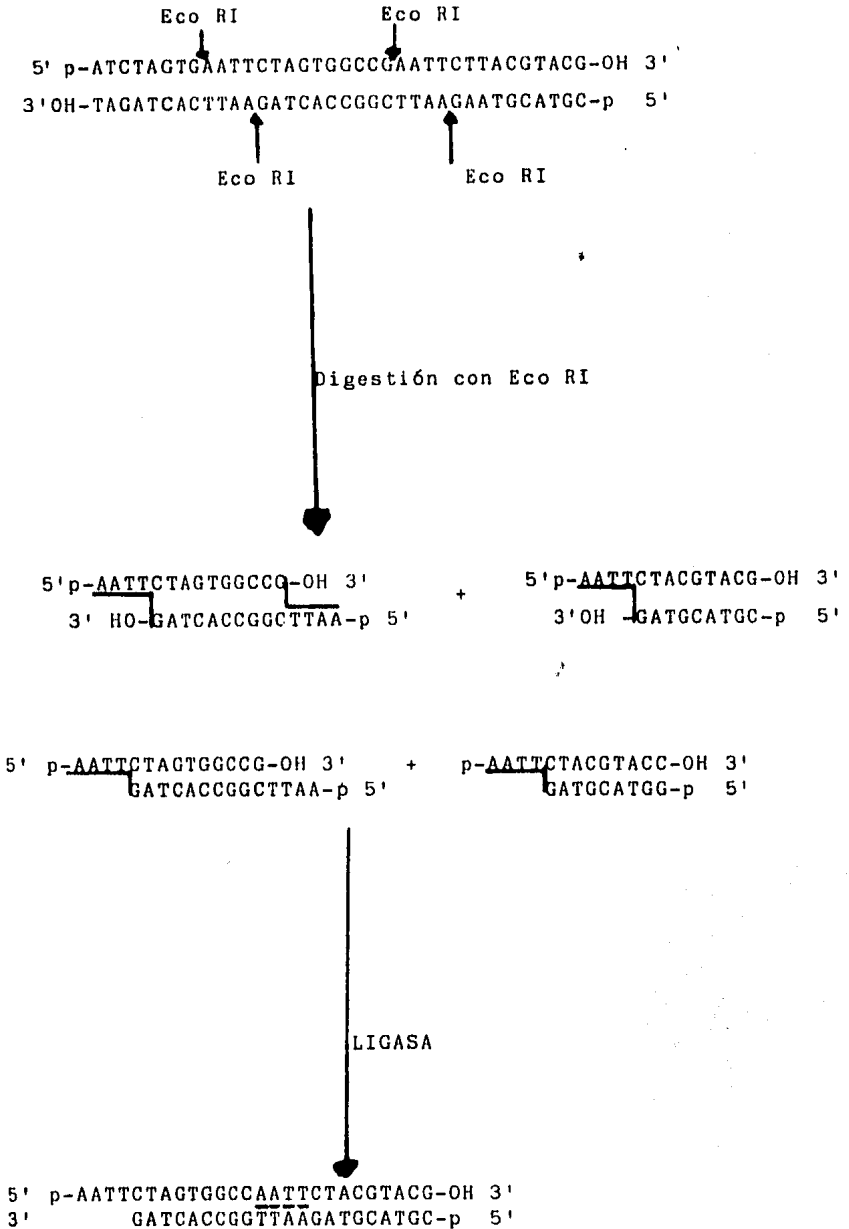
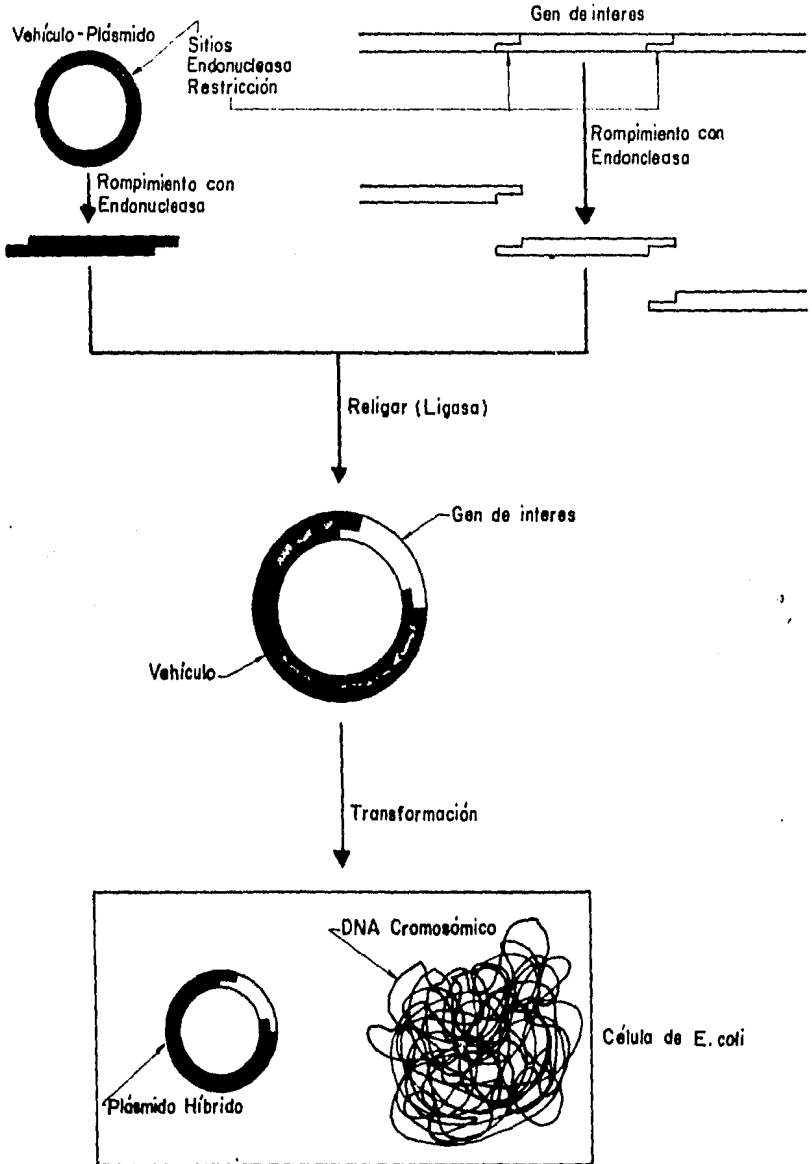


Fig 8- De manera esquemática se muestra la acción de la enzima de restricción Eco RI en un fragmento de DNA, los fragmentos generados por la enzima Eco RI son unidos por la enzima ligasa de DNA, generandose así un nuevo fragmento con diferente secuencia. (49)



fi. 9. Esquema que marca el tratamiento dado tanto al plásmido como al gen de interés por medio de enzimas de restricción para la posterior inserción en el plásmido vehículo y la introducción en *E. coli*. (44)

-gra por un tratamiento de la bacteria con una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ). Por razones aún no bien conocidas este tratamiento hace permeable la membrana celular a las moléculas de DNA. después del tratamiento con cloruro de calcio la bacteria se expone a una solución conteniendo DNA recombinante. Dado que el plásmido es una unidad autónoma de replicación, una vez introducido este podrá replicarse. (30)

#### 4) Selección de clonas

Se plantea ahora el problema de como reconocer y aislar las clonas entendiéndose por clona al conjunto de células que son idénticas a la que les dio origen y que en su material genético llevaba ya el DNA híbrido, por lo que todas las células resultantes de la división de ésta poseeran también la nueva información. Tal y como se mencionó anteriormente los plásmidos codifican para poseer resistencia a algunos antibióticos. Si durante el proceso se ha utilizado un plásmido con estas características y la manipulación de este no altera esta región genética, el DNA recombinante que resulte contendrá intacta esta función. Por lo tanto las bacterias que no son resistentes a un determinado antibiótico podrán llegar a serlo si toman DNA recombinante el cual posee esta función. La selección de clonas se hace en placas de cultivo en las cuales las células bacterianas son tratadas con antibiótico al cual se supone son resistentes, por lo tanto solo las bacterias que

contienen DNA recombinante sobreviven. Las bacterias que no lo contengan serán incapaces de crecer en estas condiciones y morirán.(?)

Debido al gran desarrollo que en los últimos años ha tenido esta tecnología se vislumbra que existen varios recursos utilizados para cada uno de los pasos mencionados anteriormente es decir no solo los plásmidos son utilizados como vehículos moleculares ni el cloruro de calcio para introducir el DNA recombinante a la célula, existen otros muchos métodos, lo que si se asegura es que en cualquier método utilizado si se llevan a cabo los cuatro pasos mencionados de manera eficiente se logrará obtener la proteína deseada.

## APLICACIONES DE LA INGENIERIA GENETICA EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

Es difícil calcular con precisión la magnitud de las ganancias obtenidas por la industria farmacéutica pero no cabe duda que es una de las más ricas del mercado, pues solo en el área de productos químicos sintéticos según la corporación Glick de Genex, existen mercados de alrededor de 12,400 millones de dólares. Ante este potencial es sencillo imaginarse las sumas que aporta esta industria a la investigación, sobre todo a aquello que va encaminado a la reducción del costo de producción de cualquier producto farmacéutico de gran demanda, puesto que implica mayores ganancias y menor inversión al optimizar la producción por lo tanto la entrada de la Ingeniería Genética en la industria farmacéutica trajo una importante transformación debido a que estas técnicas encontraron una beneficiosa aplicación en la industrialización de sustancias usadas en la terapéutica médica humana las que se obtenían anteriormente por procesos largos y con bajo rendimiento en consecuencia esta tecnología promete la obtención a escala industrial de diversos productos a un costo muy por debajo del existente en la actualidad utilizando otros procesos. Aún aunque a la fecha no ha salido al mercado un solo producto como resultado de esta metodología es sorprendente ver como muchos otros hombres de negocios aportan grandes capitales para el desarrollo de esta tecnología. Sin embargo para lograr estas óptimas condiciones en la producción aún pasará

tiempo, se pueden comprender los alcances reales de la manipulación genética y las dificultades por vencer si se analizan brevemente algunos productos obtenidos por Ingeniería Genética (mencionándose mas adelante su proceso de obtención) esto arrojará luz sobre las dos caras del problema.

Se ha observado que suministrando una determinada dosis de la hormona humana del crecimiento a personas que sufren enanismo se puede lograr que crezcan. Actualmente dicha hormona se extrae de la pituitaria de cadáveres, lo que significa que la producción que puede obtenerse por este medio solo permite tratar a uno de cada seis pacientes. Esto motivó en 1978 que los laboratorios KabiBitrum de Suecia el mayor abastecedor de la hormona del mundo hiciera un trato con la compañía estadounidense Genentech para producir la hormona por medio de la Ingeniería Genética, lo cual se logró y se espera que este producto puede usarse comercialmente si llegan a superarse tres problemas fundamentalmente, primero, aumentar la demanda en el mercado mundial para la hormona que en la actualidad es de unos quince millones de dolares al año y que podría elevarse a 90 millones si se trataran todos los casos de enanismo y al mismo tiempo se desarrollaran nuevas aplicaciones de la hormona. Segundo, pasaran varios años antes que el laboratorio productor de la hormona haya terminado las pruebas de seguridad necesarias antes de lanzar el producto al mercado. El que la hormona sea un producto natural

no significa necesariamente que sea segura. Tercero, la hormona obtenida por Ingeniería Genética podría ser en un principio un producto muy caro. Actualmente la hormona extraída de cadáveres humanos cuesta alrededor de 13,500 dolares por kilogramo y por algun tiempo la hormona elaborada por técnicas recombinantes no sera má barata, sin embargo experimentando con microorganismos más eficientes que permitan producir cantidades más elevadas de la hormona se abaratará tal costo, es decir optimizando los sistemas de expresión bacteriana y tomando como base un dato inicial que está claro y establecido de que las bacterias se multiplican hasta densidades de miles de millones ( $10^9$ ) de células por centímetro cúbico de aquí se tendrá que averiguar el número de bacterias por litro de cultivo; de esto se deduce el peso total bacteriano, sabiendo que la masa de una de ellas es de  $2 \times 10^{-12}$  g. y tomando en cuenta que la hormona producida representa entre el 0.1-1% del peso total bacteriano y aun considerando que en el proceso de purificación se perdiera un alto porcentaje de la cantidad sintetizada por las bacterias superaría cualquier otro método de obtención aun optimizando el proceso, debido a que la reproducción bacteriana es altísima y cada nueva célula generada en el cultivo seguirá sintetizando la sustancia deseada. En base a estos datos las perspectivas que ofrece esta tecnología se tornan cada vez más reales ejemplificando lo anterior y tomando en cuenta que uno de

los objetivos principales es una mayor producción se puede mencionar el éxito alcanzado con la hormona somatostatina obteniéndose una producción de 10,000 moléculas por célula bacteriana productora. Otro resultado aun más eficiente es el alcanzado con la hormona insulina liberándose por célula 100,000 moléculas lo cual es más satisfactorio si se tiene en cuenta la mayor importancia médica de la insulina y que se podría llegar a producir hasta 100 gramos de Insulina purificada en 2000 litros de caldo bacteriano. Para lograr obtener una cantidad equivalente de la hormona animal se necesitarían más de 700 kilogramos de glándulas pancreáticas que en la actualidad es de donde se extrae. No cabe duda que uno de los compuestos más prometedores es la proteína interferón usado como agente antiviral y producido por el hombre, este compuesto ha llegado a ser importante en el tratamiento contra la gripe, la hepatitis y otras enfermedades causadas por virus, además de que se experimenta en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer y hasta ha llegado a considerarse la cura mágica contra esta enfermedad aportando nuevos bríos a la Ingeniería Genética para su producción. De los interferones que se sintetizan en los leucocitos y fibroblastos el rendimiento alcanzado hasta ahora en su obtención por otros métodos es bajísimo dos litros de sangre humana producen un microgramo de interferón a un costo de dos millones de dólares. Merced a los avances registrados en las técnicas de recombinación se han llegado a obtener



600 microgramos de interferón leucocítico a partir de un litro de caldo fermentativo lo que supone un rendimiento mil veces mayor al conseguido por litro de sangre.

Como resultado de lo anterior, el interés sobre las aplicaciones industriales de la Ingeniería genética crece rápidamente. La promesa es nada menos que diseñar un atractivo futuro basado esencialmente en recursos renovables y no contaminantes ya que como se sabe diversas empresas de países desarrollados tienen fuertes presiones por la gran contaminación existente, por lo que incrementan mucho los costos de operación en los que se disponga el uso de desechos y no acarrear desequilibrio ecológico, esto da la base para que compañías como la Genentech involucrada en la producción de proteínas por métodos de Ingeniería Genética emplee ahora a un grupo de 126 personas incluyendo 40 doctores en Ciencia además de ofrecer la venta de acciones al público prometiendo ganancias sustanciales una vez que los productos invadan el mercado siendo los tres productos anunciados hasta ahora Interferón, bajo contrato de Hoffman-La-Roche: Insulina preparada por Eli Lilly, y la hormona del crecimiento elaborada por Kabi.

Hasta hoy en un lapso relativamente corto y por ello sorprendente existen grandes transacciones conocida que han realizado algunas grandes corporaciones industriales estadounidenses y del mundo con compañías que emplean la Ingeniería Genética y que son por varios

millones de dólares como es el caso de la Genex, Lubrizo Corp. entre otras muchas. Por otro lado en Estados Unidos un verdadero caudal de fondos federales han sido canalizados para desarrollar esta nueva tecnología como el NIH que patrocina 717 proyectos relacionados con el DNA recombinante los cuales implican gastos de 100 millones de dolares anuales, además de la Fundación Nacional de Ciencia que patrocina proyectos alrededor de 15 millones de dolares y el Departamento de Agricultura financia investigaciones que representan un gasto cercano a los seis millones de dolares.

La situación en Europa aunque a menor escala es igualmente interesante, muchos gobiernos promueven activamente estas investigaciones así en Francia, se han encomendado a grandes investigadores incluyendo premios nobel una evaluación sobre el potencial de la biotecnología, de este trabajo se generó un informe llamado Sociedad y Ciencia de la vida, en este documento queda clara la importancia de la Ingeniería Genética y lo que representa para el futuro de la tecnología francesa. Similarmente en Gran Bretaña un estudio sobre la necesidad de invertir a nivel nacional en las nuevas biotecnologías recomienda la inversión de 500 millones de pesos para tan solo "emparejarse" con respecto a países como E. U. y Japón.

Con respecto a México la importancia de desarrollar procesos biotecnológicos es evidente. En este sentido investigadores de varios centros nacionales trabajan en algunos proyectos que se realizan en

tres instituciones nacionales: UNAM, IPN, UAM.

En la UNAM el doctor Francisco Bolívar Zapata, jefe del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, logro sintetizar insulina humana, el doctor Bolívar asegura que la Ingeniería Genética además de Insulina permitira producir otros compuestos muy útiles.

Existen otros estudios en nuestro país en los que se hace uso de la Ingeniería Genética que aunque no esten directamente relacionados con el area farmacéutica nos hace apreciar que existe un gran espacio para el desarrollo de la biotecnología y que en México como en otros países es posible utilizarla. (31-39).

#### a) Compuestos obtenidos por técnicas recombinantes

##### - Anticuerpos

El primer gran logro de la recombinación genética artificial se considera fue la síntesis de anticuerpos monoclonales, esta no hace uso de las técnicas de Ingeniería Genética como tal, pero fué un antecedente importante ya que entre otras cosas con esto quedó demostrado que la recombinación genética en el laboratorio si es posible. La síntesis de anticuerpos monoclonales hace uso de la fusión de membranas empleando la tecnica de Kao Michayluk descubierta en 1974 y que dice que empleando polietilenglicol las células de mamífero en cultivo se fusionan e induce la formación de agregados de dos o tres células. Las características más importantes de los anticuerpos y su síntesis en resumen se describen a continuación.

## Anticuerpos (2)

El término anticuerpos hace referencia a las proteínas que se producen en respuesta a la acción de un agente o sustancia extraña agresora en un organismo y que reaccionan específicamente con él, a este agente extraño se le conoce con el término de antígeno ( Ag ).

La totalidad de anticuerpos puede encuadrarse en un grupo especial de proteínas séricas que también reciben el nombre de inmunoglobulinas ( Ig ). Las Ig presentan una organización estructural muy parecida pero forman parte de una familia extraordinariamente diversa que puede ser ordenada en grupos y subgrupos de acuerdo con las diferencias que presenten con respecto a sus propiedades físicas, químicas e inmunológicas. Los anticuerpos o inmunoglobulinas están formadas por cadenas polipeptídicas ligeras y pesadas . Cada una de estas cadenas consta de regiones variables y constantes de acuerdo con la secuencia de aminoácidos que las forma y que está genéticamente determinado. Así cada cadena de Ig parece estar codificada por dos genes; uno para la región constante y otro para la región variable. Las cadenas se mantienen unidas por puentes disulfuro . fig. 10

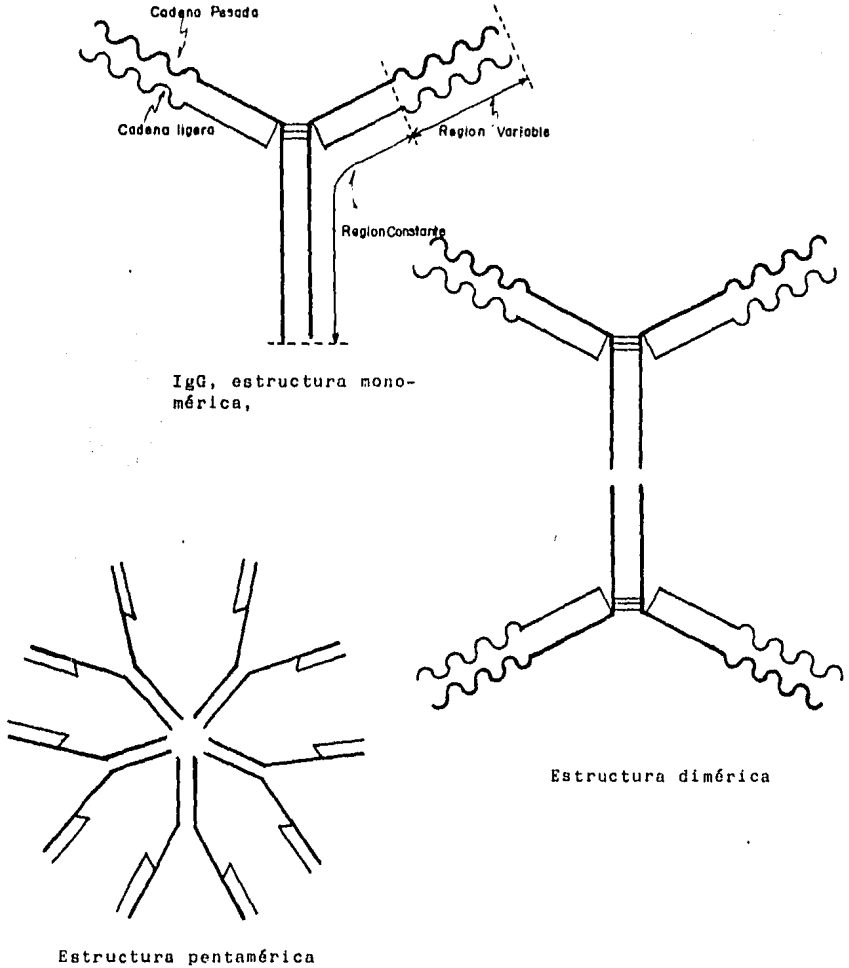


Fig no. 10 Representación esquemática de diferentes inmunoglobulinas, señalándose la localización de la región variable y constante sobre las cadenas livianas y pesadas. (77)

La actividad biológica de cada una de estas moléculas de anticuerpos se centra sobre su capacidad de enlazar específicamente los antígenos ( moléculas agresoras ) que han estimulado su producción. Este sitio de combinación está localizado sobre el extremo terminal de la molécula de anticuerpo en la región variable y está compuesto por un segmento que presenta la característica de ser hipervariable en cuanto a su contenido de aminoácidos se calcula es entre 15-30 aminoácidos los que pueden estar involucrados en cada sitio combinante. por lo tanto la región hipervariable es específica para cada antígeno.

En la actualidad se desconoce como es que se da la síntesis de anticuerpos en un organismo y basada en la forma en la que colaborar los genes que los producen se han propuesto varias teorías para explicar lo anterior una de las cuales dice que los productos polipeptídicos resultantes de cada gen se unen hasta el final de la síntesis dando así un anticuerpo específico. fig. II

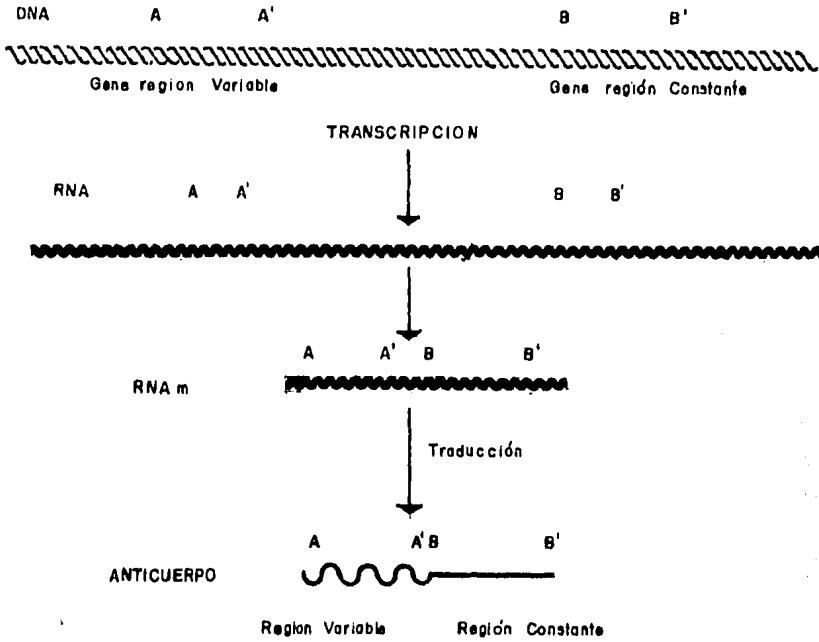


Fig- // La teoría más aceptada sobre como se lleva a cabo la síntesis de anticuerpos dice que la información genética tanto para la cadena ligera como para la pesada están contenidas en *exones* a lo largo del DNA es decir de manera discontinua, por lo tanto en la transcripción los intrones son "recortados" dando así un RNAm que posteriormente traducido darán polipeptidos que unidos finalmente dan un anticuerpo específico. (40)

El estudio de la recombinación genética en organismos superiores ha contribuido también al desarrollo de la Inmunología. En 1975, Georges Kohler y Cesar L. Milstein, del British Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology de Cambridge, lograron por primera vez la obtención de anticuerpos monoclonales esto fue posible al fusionar un mieloma o célula cancerosa de la piel de ratón con un glóbulo blanco o linfocito productor de anticuerpos. Esta célula blanca fue obtenida de un ratón al que previamente se le había inmunizado con un antígeno específico, el cual poseía varios determinantes antigénicos por lo tanto el linfocito tenía ya la información para sintetizar los anticuerpos específicos para cada determinante antigénico.

De la fusión de los linfocitos sensibilizados y las células de mieloma resultó un "hibridoma" o célula híbrida, que crecía en un tubo de ensayo y manufacturaba anticuerpos específicos los cuales son conocidos como anticuerpos monoclonales. (40)

En la fig. 1 se pueden apreciar los pasos seguidos para la obtención de inmunoglobulinas observándose que el antígeno utilizado fueron glóbulos rojos de carnero, al responder el sistema inmune induce la proliferación de linfocitos B los cuales secretan las inmunoglobulinas cuya estructura es específica para cada determinante antigénico. El segundo paso será la fusión de células, hecho que es posible al purificar los linfocitos del ratón inmunizado y la obtención de las células del mieloma.



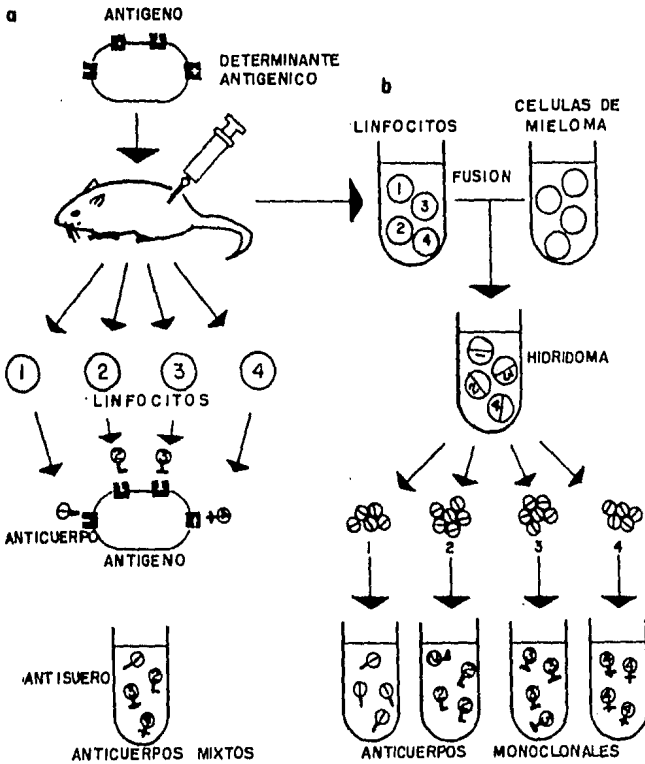


Fig no.- 12. a) Respuesta inmune del animal sencibilizado con un antígeno en el cual se aprecian 4 determinantes antigenicos diferentes, con la respectiva producción de 4 linfocitos específicos para cada determinante antigenico que están contenidos en el suero-llamado también antisuero.

b) Los linfocitos obtenidos en el entisuero se fusionan con células de mieloma, resultando células híbridas productoras de gran cantidad de anticuerpos monoclonales. (40)

Las células del mieloma como toda célula cancerosa posee la característica de reproducirse de una manera bastante acelerada hecho que se conserva en el hibridoma por lo tanto la producción de anticuerpos al igual que otras proteínas sintetizadas por la célula híbrida es alta, de esta manera hoy en día los médicos -- aportan una protección inmunológica contra las enfermedades gracias a que en el mercado se encuentran anticuerpos monoclonales para múltiples fines. ( )

De los conocimientos anteriores se han derivado otras investigaciones por medio de técnicas recombinantes como es el caso del estudio hecho por Susumu Tonegawa y col. miembros del Basel Institute for Immunology, los cuales obtuvieron un polipéptido semejante al encontrado en la región variable de una inmunoglobulina de ratón <sup>(41)</sup> Esto fue logrado al obtener de linfocitos de ratón fragmentos de DNA en los cuales se pensaba encontrar la información para sintetizar la región variable de dicha inmunoglobulina y por medio de la transcripción lograr el RNAm para después con la ayuda de la transcriptasa inversa obtener la información final que se insertaría en el vehículo para la posterior transformación de E. coli, la cual efectivamente sintetizó la secuencia de aminoácidos contenida en la región variable de la inmunoglobulina de ratón que previamente se había establecido. (42)

El proceso utilizado en Ingeniería Genética haciendo uso de la transcriptasa inversa se describe paso a paso en la obtención de hormonas que fueron las que primeramente se sintetizaron.

## Hormonas

El primer péptido sintetizado por una célula bacteriana fué la hormona hipotalámica SOMATOSTATINA. Pertenece esta al grupo de las hormonas sintetizadas por el hipotálamo, situado en la base del cerebro; un denso sistema de vasos sanguíneos la transporta a la hipófisis, donde actúa inhibiendo la secreción de insulina y de la hormona humana del crecimiento; investigadores del City of Hope--National Medical Center de Duarte California y de la Universidad de California en San Francisco escogieron como objeto de estudio a la somatostatina por varias razones, destacando la de su simplicidad, pues solo consta de 14 aminoácidos, así aunque todavía no se había aislado el gen de la somatostatina humana, se pudo deducir la secuencia de nucleótidos a partir del orden conocido de los aminoácidos en el tetradecapeptido que se descubrió en un extracto hipotalámico de bovino ( 43 ). Esto permitió la construcción del gen sintético ( 13 ) obteniéndose por el método del triéster ( 13, 14 ) y constando este de 52 pares de bases de las cuales 42 pares constituían el gen estructural para la somatostatina, los restantes nucleótidos se incorporaron para proporcionar los extremos adherentes que

permitieran unir el fragmento del DNA de doble cadena a un plasmido, así como para facilitar la correcta expresión genética y la recuperación de la hormona.

La célula que actuaría como huésped sería la de *E. coli* K-12 y para llevar a cabo la inserción del gen sintético al plasmido identificado como pBR 322, que posee la característica de actuar como sustrato en diferentes regiones a la enzima de restricción Eco RI, además se combinó con un segmento de operon Lac del genoma de *E. coli*.

El gen sintético se insertó cerca del final del gen que codifica para beta-galactosidasa, haciendo uso de la enzima ligasa denominada T4 polimerasa. El plasmido recombinante se introdujo en *E. coli* por medio de la técnica mencionada anteriormente en la introducción de DNA recombinante por  $\text{CaCl}_2$ . Por último la somatostatina sintetizada por *E. coli* transformada se obtuvo unida a la enzima beta-galactosidasa y por medio de un tratamiento con bromuro de cianógeno que rompe las proteínas en donde se encuentre el aminoácido metionina se pudo recuperar la somatostatina libre. La obtención de la somatostatina libre se previó al colocar la información para la codificación de la metionina antes de la molécula o gen informante de somatostatina, además de que sirvió de protección pues al sintetizarse la somatostatina junto con la enzima

beta-galactosidasa protege a la hormona de la degradación inmediata por proteínas bacterianas. De esta manera los investigadores Keiichi Itakura, Tadaaki Hirose, Roberto Crea Artur D. Riggs de la División de Biología del City of Hope National Medical Center de Duarte California así como Herbert L. Heyneker , Francisco Bolivar, Herbert W. del Departamento de Bioquímica y Biofísica de la universidad de California en San Francisco, lograron en 1977 la síntesis de la primera hormona humana sintetizada por bacterias por medio de la manipulación genética. fig 13

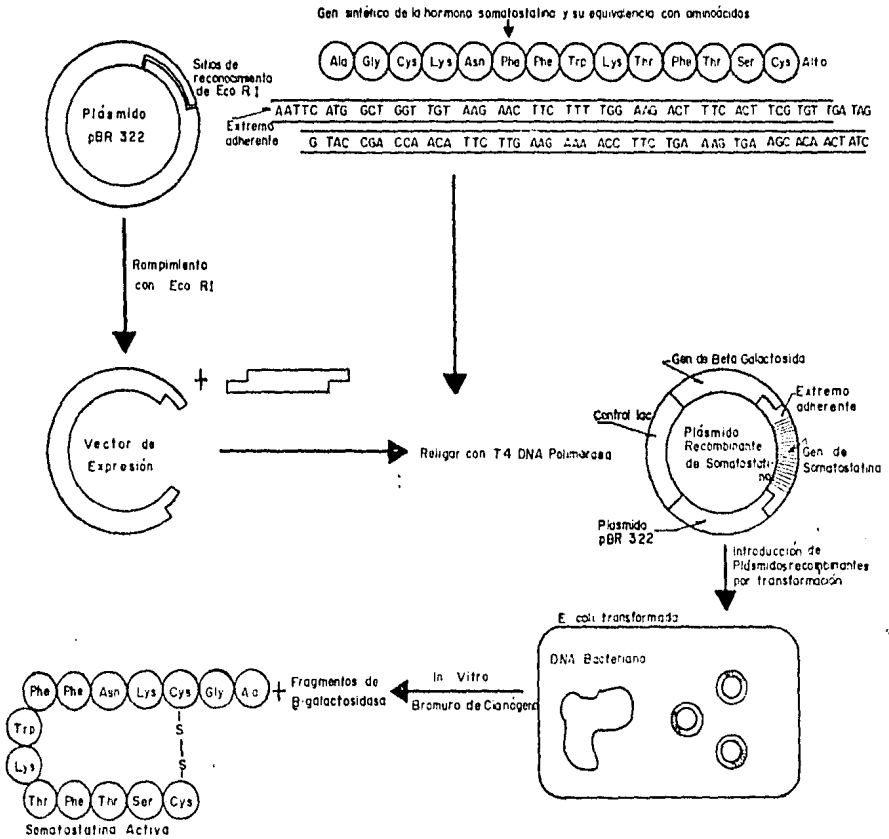


Fig.-13.- Síntesis de la somatostatina por medio de técnicas recombinantes. Esta hormona fue la primera obtenida a partir de microorganismos. (39)

### Hormona Somatotropina Corionica ( HCS )

El polipeptido hormonal somatotropina corionica, es secretado por la placenta y se incrementa durante el embarazo del orden de un gramo por día pasando el primer trimestre. La función fisiológica de esta hormona todavía no se conoce pero parece que su actividad primordial radica en que interviene en el metabolismo de la madre, dotando de importantes nutrientes de origen materno al feto, para su buen desarrollo.

La estructura primaria de la HCS es muy similar al de la hormona humana del crecimiento ( HGH ) conteniendo 191 aminoácidos y el 85% de las secuencias codifican para aminoácidos homólogos.

Tal similitud sugiere que los genes de estas dos hormonas junto con la que codifica para la hormona pituitaria prolactina poseen un gen ancestral que evolucionó. Sin embargo la hormona HCS es secretada unicamente por la placenta, mientras que la HGH es producida por la pituitaria.

Para lograr la síntesis de la HCS por bacterias los investigadores John Shine, Peter H. Seeburg, Josep A. Martial y otros de la Universidad de California en San Francisco, obtuvieron el gen que codifica para esta hormona pero no por síntesis química, sino por una combinación de este y la obtención de un gen natural para lo cual se aísla el RNAmensajero ( RNAm ) de la placenta humana . (44)

Por medio de este RNAm y haciendo uso de la enzima transcriptasa inversa (21) se obtiene así un DNA llamado complementario (DNAc), que contiene el gen con la información para codificar la hormona deseada.

La síntesis de esta hormona por recombinación genética requiere de una serie de pasos elaborados por medio del uso de enzimas de restricción, tanto en el tratamiento del plasmido como en el gen a insertar. El plasmido elegido que actuó como vector fue el pMB9, este se trató con la enzima Eco RI, proporcionando así los extremos adherentes del plasmido para la posterior inserción del gen deseado.

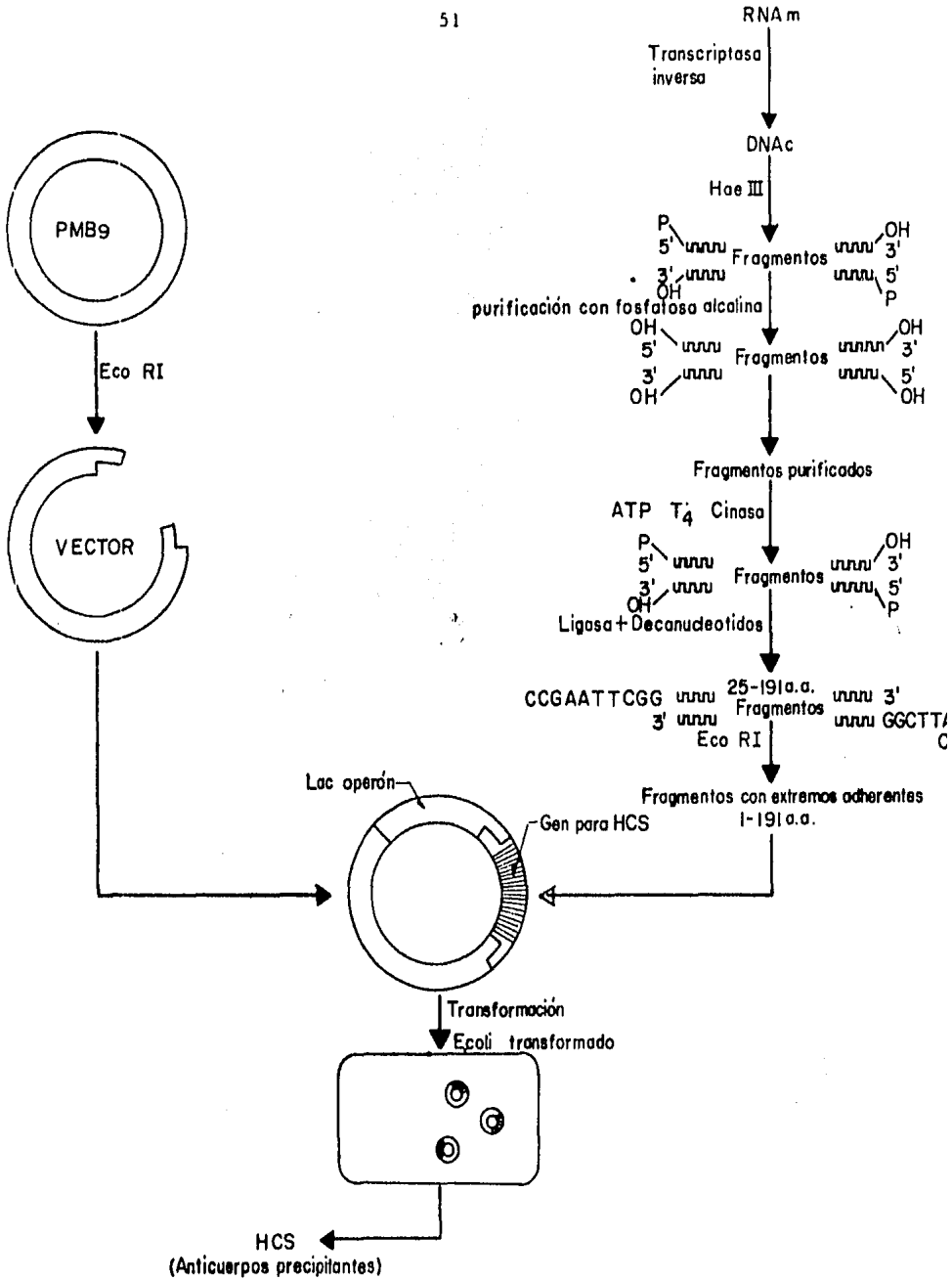
El DNAc es tratado con la enzima HaeIII que lo fragmenta y los fragmentos generados contendrán el gen para la HCS.

A continuación dichos fragmentos son tratados con fosfatasa alcalina que hidrolizan los extremos 5' de ambas cadenas para la posterior purificación, los fragmentos ya purificados tras un tratamiento con ATP más la enzima T4 cinasa que regenera los grupos fosfato en posición 5' de las dos cadenas, se les inserta deca nucleótidos en cada extremo 5' que contienen sitios de reconocimiento de la Eco RI, por medio de la enzima ligasa, el tratamiento con EcoRI proporciona los extremos adherentes que se unirán al plasmido generado anteriormente obteniéndose así el DNA recombinante. Este plasmido recombinante es introducido a E. coli por medio de un tratamiento de la bacteria con  $\text{CaCl}_2$  resultando una



transformación, verificando la presencia de bacterias transformadas por exposición a el antibiotico al cual el plasmido introducido proporciona resistencia, por lo tanto las bacterias no resistentes al antibiotico moriran.

La comprobación de que efectivamente el producto sintetizado por E. coli transformada es HCS se hizo por pruebas de precipitación con anticuerpos especificos. fig 14



fig/4. - Esquema que marca la obtención de la hormona HCS, observándose paso a paso el procedimiento seguido para el tratamiento del plasmido vehic-  
 1o y la obtención del gen natural a partir del RNA m. (4/1)

Hormona humana del crecimiento ( HGH )

En 1979 investigadores como David V. Goeddel, Herbert L. Heyneker, Toyohara Hozumi y otros del City of Hope National Center de Duarte California lograron sintetizar la hormona humana del crecimiento a partir de técnicas recombinantes (45) .

La hormona humana del crecimiento es un polipeptido de 191 aminoácidos elaborada en los tejidos de la hipófisis. El interés médico que despierta esta hormona se basa en el hecho de que su déficit conlleva a una forma de enanismo que puede curarse por administración de la misma. Dicha hormona es característica de cada especie; su fuente habitual ha venido siendo cadáveres humanos. Su escasa disponibilidad aun a pesar de muchas aplicaciones clínicas, ha constituido un factor condicionante del desarrollo de la investigación sobre la misma. Por lo tanto la utilización de técnicas recombinantes aumentara sin duda la producción de la hormona y su disponibilidad en el mercado al grado de que la compañía Genentech una de las firmas establecidas para explotar la tecnología de DNA recombinante se ha asociado a la compañía sueca Kabi Gen AB, para la elaboración de la hormona humana del crecimiento.

El paso inicial dado por Goeddel para la obtención de la hormona fue la extracción de RNAm de los tejidos hipofisarios, posteriormente la utilización de la enzima transcriptasa inversa proporcionó un fragmento que codifica para los últimos 167 amino-

-ácidos es decir el gen resultante resultó incompleto por lo que se tuvo que hacer uso de la síntesis química para la producción de los nucleótidos complementarios es decir un segmento que codifica para los primeros 24 aminoácidos el cual se construyó por el método del triéster en tres bloques los cuales fueron unidos por la enzima ligasa, a este fragmento se antecede el codón ATG que codifica para la metionina.

UNA vez obtenido el gen y su complemento se procede a unirlos lograndose por fin el gen completo que codifica para los 191 aminoácidos, insertandose en el plásmido pBR322 que tiene la característica de poseer su operon lac , como la parte sintética del gen se construyó con su propio codón de iniciación ATG y su extremo adherente, la unión al plásmido y la iniciación de la transcripción estan previstas para su correcta realización.

El plásmido recombinante se introdujo por tratamiento con  $\text{CaCl}_2$  a la bacteria E. coli la cual sintetizó la hormona humana del crecimiento verificandose por la identificación de la homona con electroforésis y la producción de la HGH por bacteria por medio de radioinmunoensaye. fig. 15

Puesto que la importancia de las hormonas sintetizadas por bacterias es grande como el caso de la HGH principalmente por su utilización médica en humanos despues de que se logró su síntesis por técnicas recombinantes se han seguido investigando los efectos tanto in vitro como en animales, tal es el caso de los hallaz-

-gos encontrados por los investigadores Paul P. W. van Buul y Sylvia van Buul miembros (46) del Departamento de radiación genética de la Universidad de Leiden, ellos demostraron que el tratamiento con altas concentraciones de HGH sintetizada por bacterias a ratones enanos provoca alteraciones cromosómicas en las células de la médula ósea . Lo anterior se comprobó también in vitro en cultivos celulares de ovarios de Hamster. Por esto se considera importante que el uso de hormonas sintetizadas por bacterias antes de usarse en la terapia humana deben cumplir con una serie de requisitos que avalen su efectividad además de no ser riesgoso. (47).

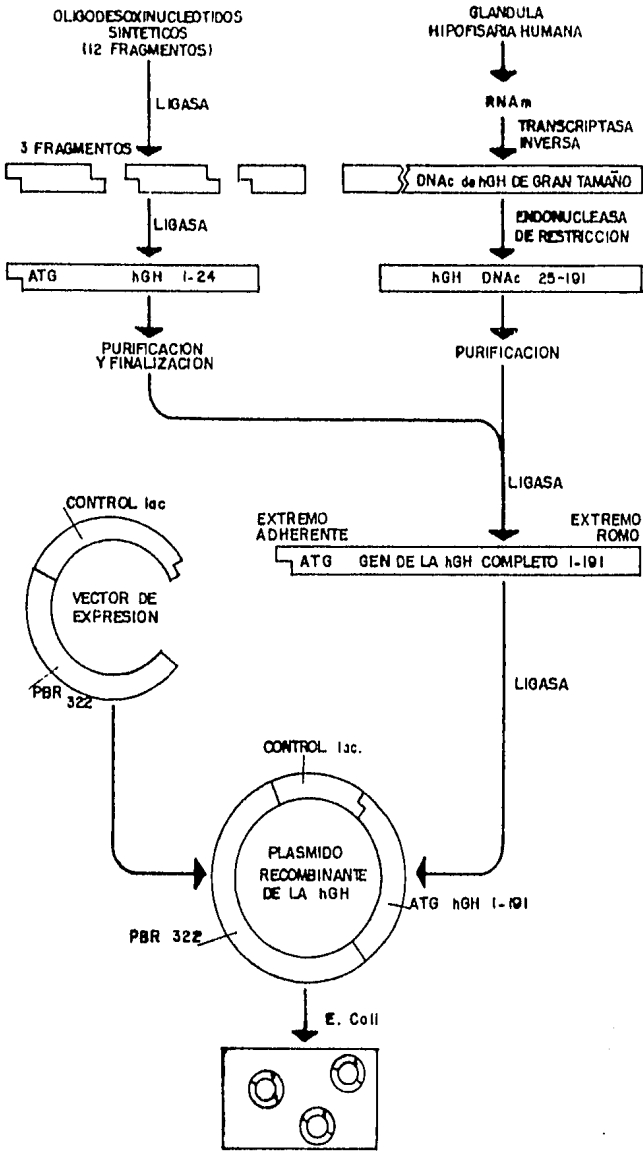


fig. 15.- El gen para la hormona humana del crecimiento fué creado mediante una combinación de síntesis química y aislamiento de la molécula natural. El segmento del gen para los primeros 24 aminoácidos se construyó químicamente y para el resto se utilizaron una serie de enzimas. Se empleó también la transcriptasa inversa para copiar al gen a partir de RNA<sub>m</sub>, la parte sintética se construyó con su propio código de iniciación (ATG) que da la señal de comienzo de transcripción. (39).

Hormona Insulina

La hormona Insulina posee gran demanda en el mercado puesto que es utilizada para el tratamiento de la Diabetes hasta ahora esta insulina se obtiene del pancreas de ganado porcino y bovino .

La insulina humana esta formada por dos cadenas polipeptidicas de 21 y 30 aminoacidos respectivamente y difiere ligeramente de la extraida de animales, aunque esta insulina animal controla los principales síntomas del diabético, no impide efectos secundarios como el deterioro renal y de la retina; - - ademas, algunos diabéticos son alérgicos a las hormonas animales . La insulina humana producida por bacterias por medio de la Ingenieria Genética es la que ha dado mejores resultados en cuanto a - - producción se refiere, obteniendose más moléculas por células bacterianas y si a esto se suma que sea capaz de contrarrestar los efectos secundarios producidos por la insulina animal, dicha insulina sintética ocupara un lugar preferente en el mercado mundial.

Como se mencionó anteriormente la insulina humana esta formada por dos cadenas polipeptidicas llamadas A y B que difieren por su contenido y número de aminoacidos. Esta hormona insulina es sintetizada en el humano en forma de precursor peptídico llamado proinsulina, este polipeptido pierde un segmento interno cuando la proinsulina es convertida a insulina por acción de enzimas

específicas . . . Con el conocimiento de lo anterior así como la determinación de la estructura y secuencia de amino-ácidos , los primeros investigadores que sintetizaron insulina humana por medio de técnicas recombinantes fueron Alex Ullrich, John Shine, John Chirgwin, Raymon Pictet del Departamento de Bioquímica y Biofísica de la Universidad de California en San Francisco en 1977. (48)

El punto de partida fué el aislamiento de el RNAmensajero (RNAm) para insulina de las células beta del páncreas en los islotes de Langerhans, con el objeto de obtener un DNacomplementario (DNAc) por medio del uso de la enzima transcriptasa inversa. Una vez obtenido el DNAc, y con el uso de las enzimas tanto ligasa como de restricción se procedió a unir los extremos adherentes al gen que lleva la información para la insulina, al igual que el plasmido vector. Como se observa en la figura 16 los pasos para la obtención de Insulina sintética por medio de transcriptasa inversa son muy similares a los utilizados en la síntesis de la hormona somatotropina corionica y la hormona humana del crecimiento lo básico en este técnica será la utilización de las enzimas que se ajusten al proceso para lograr la generación de extremos adherentes y su posterior unión con la ligasa respectiva.



Otros investigadores como es el caso del equipo de Roberto Crea, Adam Kraszewski, Todaaki Hirose y Keiichi Itakura, del City of Hope National Medical Center, construyeron en tres meses los genes que codifican para las dos cadenas A y B de la insulina humana . Cada gen sintético se unió a un plasmido que fue el pBR322 cerca del gen que codifica para la beta galactosidasa, así como al operon lac. ( 49 )

Los genes sintéticos para cada cadena A y B se recombinaron por separado en diferentes cultivos de E. coli donde cada uno de los cultivos produce una de las dos cadenas. fig. 17

En los mamíferos las dos cadenas A y B están unidas entre sí a través de puentes disulfuro que se forman entre las dos cisteínas de ambas cadenas polipeptídicas. Existen métodos químicos que permiten la unión correcta de las dos cadenas partiendo de las cadenas por separado. Esto se logra por una oxidación controlada de derivados sulfonados de ambas cadenas (49) .

La producción de insulina humana por bacterias ha sido sin duda un gran logro que aunado a que puede bajar sustancialmente de valor en el mercado implicará que esta se comercialice , actualmente se estima que la ganancia es de unos 200 millones de dólares anuales por lo que se espera triplicar esta suma. ( )

En este sentido la empresa Eli Lilly ha anunciado ya planes de introducción del proceso de producción a la industria basada

en la síntesis bacteriana. Por lo tanto dicha industria ha tenido que someter a la insulina sintética ha una serie de estudios que necesariamente tienen que confirmar desde el efecto que ocasiona en el organismo así como sus propiedades físicas, químicas , biológicas e inmunológicas (50-55)

De esta manera en la actualidad esta demostrado despues de una larga serie de investigaciones que la insulina humana sintetizada por bacterias posee semejantes propiedades a la insulina animal por lo que se anuncia la entrada de la insulina humana producida por bacterias al mercado.

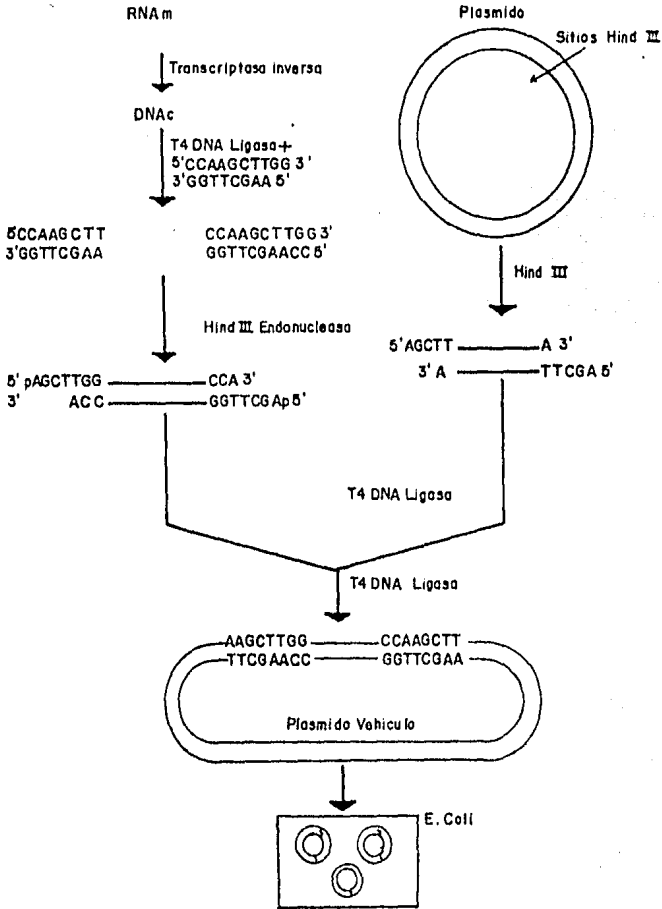


Fig 16.-El esquema marca los pasos seguidos para lograr la obtención de insulina humana a partir de RNAm aislado de las células beta del páncreas, se señalan las enzimas empleadas en cada paso. Se puede apreciar que el uso de la enzima *Eco RI* en este caso también es posible siempre y cuando se proporcionen los extremos adherentes tanto al plásmido como al gen deseado y que serían  $5' \text{TGAATTCA } 3'$ . (48)

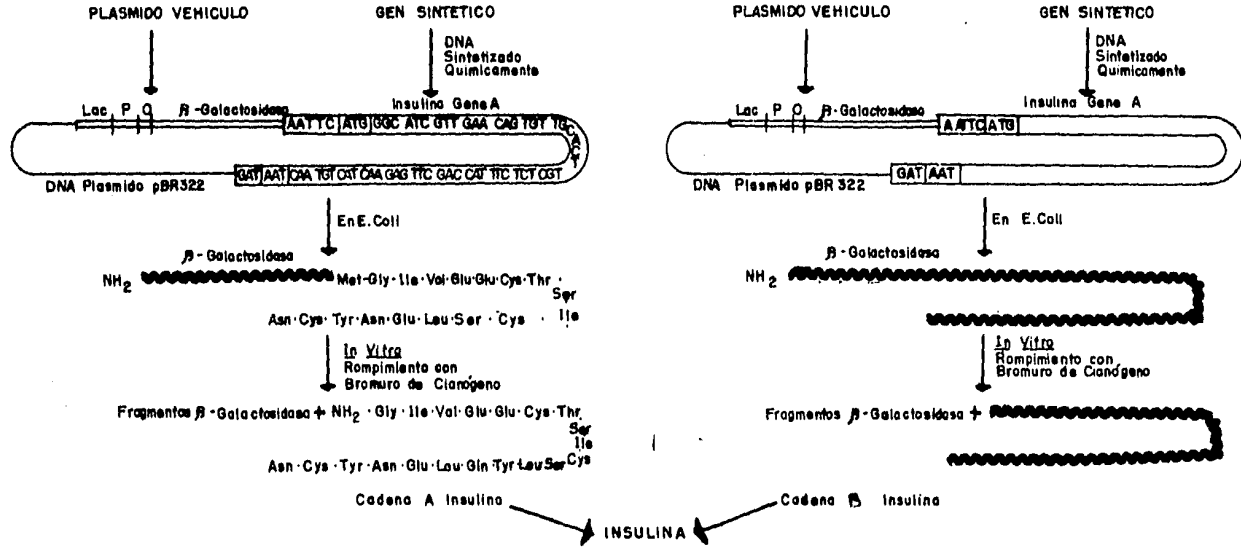


Fig. 17 Obtención de insulina humana a partir de genes sintéticos, tanto para la cadena A como para la B, las cuales se obtienen separadas que se unen por oxidación controlada de derivados sulfonados. (44)

## INTERFERON

El interferón se descubrió en el curso de los estudios realizados sobre el virus de la gripe en fragmentos de membrana corioalantoidea de pollo, mantenida en un medio artificial. (56,57) Los sobrenadantes de este cultivo celular, aunque no poseían células víricas, inhibían la multiplicación de los virus de la gripe aun en concentrados frescos; por lo tanto se concluyó que esta sustancia era un inhibidor viral y que era soluble en agua. Posteriormente se demostró que las sustancias de esta clase, denominadas ya interferones las producían las células infectadas de la mayor parte de virus animales ya sea que estos posean DNA o RNA en los cultivos de tejidos o en el animal ( 58,59,60 )

El interferon humano es producido por las células leucocíticas y fibroblastos en respuesta también a las infecciones virales (aunque también se produce por otro tipo de estímulos). En la actualidad se han distinguido tres tipos de interferones llamados alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gama ( $\gamma$ ) en base a sus propiedades físicas químicas y biológicas (61) .

El interferon producido por leucocitos es de tipo alfa ( $\alpha$ ), (62) es sintetizado por estas células en casos de estímulos virales y presenta la característica de ser ácido estable. Se han distinguido en la actualidad por lo menos tres tipos diferentes de---

interferones  $\alpha$  ( INT  $\alpha$  ) que son los que se sintetizan en mayor proporción , la diferencia entre ellos estriba principalmente en su secuencia de amino ácidos y se han clasificado en tres tipos hasta ahora el INT  $\alpha$  1, INT  $\alpha$  2, INT  $\alpha$  3. ( 61 )

Estudios hechos por Masucci Grazia M. y col., ( 62 ) han demostrado la actividad "asesina" del interferon tipo  $\alpha$  1 . Estas investigaciones se realizaron in vitro resultando que en los cultivos celulares dicho interferón presentaba el siguiente comportamiento:

- Engrandece la actividad natural de linfocitos humanos
- Realza la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)
- Inhibe la migración de leucocitos
- Inhibe el crecimiento de líneas celulares como la línea Namalwa

Por todo lo anterior, suprime al virus es decir inhibe su crecimiento por lo que se le ha llamado "asesino".

De cada uno de los interferones hasta ahora clasificados se han obtenido datos tanto de su actividad y de su estructura, demostrándose que en general todos los interferones poseen; receptores de membrana celular además de ser moduladores de la respuesta inmune es decir supresores o inductores según sea el caso .

con lo que respecta al interferon ( $\beta$ ) se sabe que es producido por Leucocitos . en un 10%, (el otro 90% corresponde al INF ( $\alpha$ )) el cual es tambien estable al ácido pero presentando diferencias en sus propiedades serológicas, físicas y químicas. En cuanto al interferón ( $\gamma$ ) presenta la característica de ser lábil al ácido y este es producido por linfocitos T su actividad primordial en la respuesta inmune es la de ser responsable en el ataque a mitógenos. (42).

Todos los estudios anteriores se han podido realizar gracias al gran apoyo de poder sintetizar interferón por medio de bacterias dado que la obtención de interferón celular por medio de su extracción y purificación es altamente costoso.

El interferón sintetizado por bacterias se logro en el año de (1980) por Nagata y col., (43) obteniendo RNAm de leucocitos humanos, posteriormente por medio de la enzima transcriptasa inversa se logro obtener el DNAComplementario ( DNAC ) que llevaria la informacion para la síntesis por E. coli de interferón El plasmido que serviria de vector seria el PBR322 y la introducción del plasmido a la bacteria con un tratamiento con cloruro de calcio (  $\text{Ca Cl}_2$  ) resultando la E. coli transformada, la cual efectivamente sintetizó interferon de tipo ( $\alpha$ 1) comprobándose al someterlo a una serie de pruebas se encontraron en este todas las propiedades mencionadas anteriormente. **pg 18**

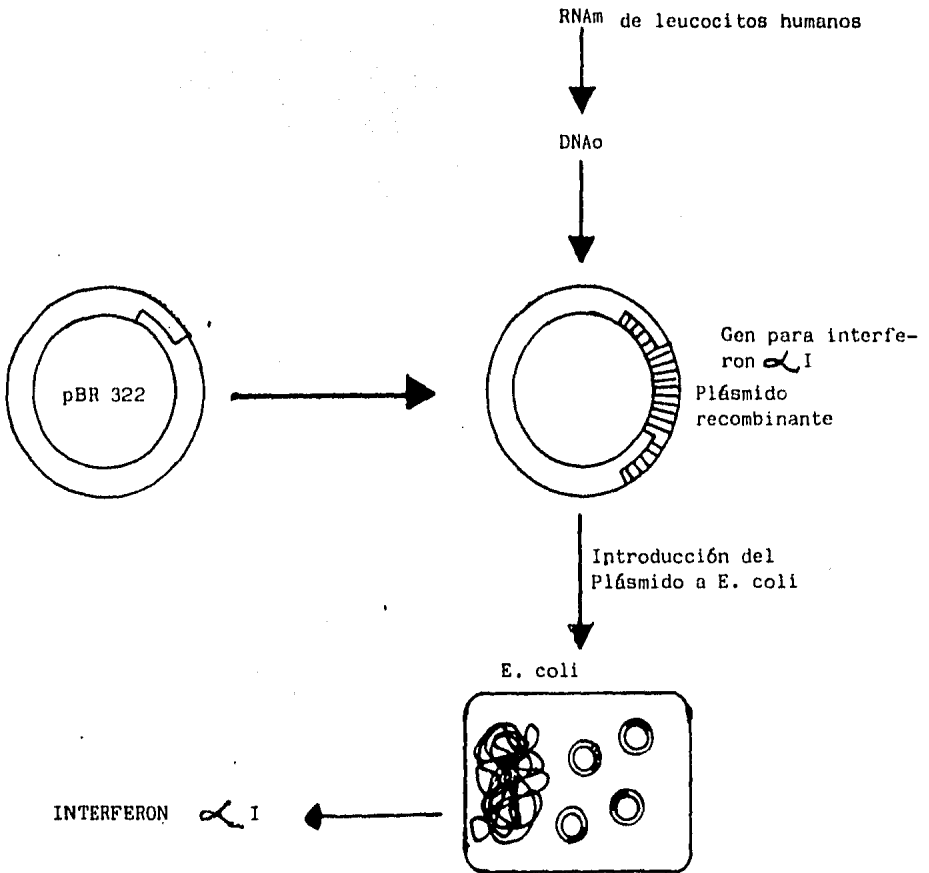


Fig. 18 - Síntesis bacteriana de Interferon tipo  $\alpha$ I utilizando RNAm de leucocitos humanos.



## FACTOR VIII

Uno de los mas exitosos logros de la Ingeniería Genética es la síntesis del factor VIII, pertenece este al grupo de proteínas encargadas del mecanismo llamado cascada de coagulación sanguínea que no es otra cosa que la interacción de proteínas presentes en el plasma, las que por medio de un estímulo inicial se activan en cascada para lograr la síntesis de un producto llamado fibrina que con la ayuda de otros componentes sanguíneos forman un coágulo que finalmente es el encargado de detener la hemorragia.

La función específica del factor VIII en el sistema de coagulación sanguínea es el de activar al factor X que permanece inactivo si dicho factor no cataliza la transformación. (64)

Es conocida desde hace muchos años una enfermedad llamada hemofilia la cual es hereditaria, cuya etiología es una anomalía en el gen que codifica la síntesis del factor VIII por lo tanto y debido a que es un sistema en cascada la falta de esta proteína inhibe la síntesis de fibrina y por consecuencia la formación del coágulo. Se ha observado que la transfusión sanguínea de un donador sano ( con la presencia del factor VIII en la sangre) a un paciente hemofílico, controla la enfermedad, pero desafortunadamente dichas transfusiones acarrear muchos riesgos como son la transmisión de virus como el de la hepatitis B, así como el virus HTLVIII causante de la enfermedad llamada SIDA ( síndrome de inmunodeficiencia adquirida ). (65).

Por lo tanto y debido a estas graves consecuencias de la transfusión sanguínea, la Ingeniería Genética se torna cada vez más importante dado que se ha logrado sintetizar este componente sanguíneo, gracias a la previa purificación de este,<sup>(66)</sup> con lo que mas tarde se pudo conocer su secuencia de amino-ácidos,<sup>(66)</sup> para finalmente lograr caracterizar el gen que lo codifica.<sup>(67)</sup>

Este último estudio reveló que el gen "completo" que almacena la información para la síntesis de este factor VIII se halla constituido de 186,000 pares de bases el cual contiene 26 exones y 69 intrones, de todo esto finalmente nueve kilobases constituyen el RNAm. Con esto se puede ver que la proteína resultante de este RNAm es bastante grande teniendo aproximadamente entre 2332-2351 amino-ácidos (67.).

La obtención del gen con esta información puede ser lograda por síntesis química o con la obtención del RNAm obtenido de diferentes fuentes ya que no se sabe con certeza las células que son productoras de este factor, y por medio de las enzimas de restricción, grandes pedazos de DNA pueden ser cortados para lograr así finalmente aislar el RNAm (68).

La información obtenida de este proceso es insertada en el plasmido pSAT 8cl e introducida a cultivos de células de riñón de Hamster.

La identificación de la proteína producida por estas células se hace poniendo en contacto al factor X con esta, si la proteína obtenida es el factor VIII este activará al factor X. (69).

Productos futuros que promete la Ingeniería Genética

Una idea del gran potencial que nos ofrece la Ingeniería Genética con respecto a los nuevos productos que se podrán obtener a partir de técnicas recombinantes en el futuro lo ofrece en las tablas no 2,3. Esta información se dio a conocer en el reporte del Office of Technology Assessment Report, basada en estudios estadísticos de compuestos cuya necesidad de obtener es grande por el tipo de enfermedad o condición que podrán ser tratadas por estos. (70)

Enfermedad ó condición	Medicamento obtenido de microorganismos por técnicas recombinantes
Diabetes	*INSULINA
Arterioesclerosis	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas ( PDGF )
Enfermedades virales Influenza Hepatitis Polio Herpes Resfriado comun	*INTERFERON
CANCER Enfermedad de Hodgkin Leucemia Cáncer en mama	*INTERFERON

Enfermedad o condicion	Medicamento obtenido de microorganismos por técnicas recombinantes
Anovulacion	Gonadotropina corionica humana
Enanismo	*Hormona humana del crecimiento
Dolor	Encefalinas Endorfinas
Inflamación	Hormona adrenocorticotropa
Enfermedades reumaticas	
Desordenes de los huesos	Calcitonina y Hormona Paratiroide
Afecciones a los nervios	Factor del crecimiento delnervio
Anemias hemorragicas	Eritropoietina
Hemofilia	Factores VIII* y IX
Cuagulos sanguineos	Urokinasa
Shok	Albúmina sérica
Inmunoterapia	Cit

→ Compuestos ya producidos e incluso algunos ya probados en animales

Tabla no 2: Enfermedad o condición y el compuesto obtenido por Ingeniería Genética utilizado en el tratamiento ( )

Bacterias	Parasitosis
Desinteria Fiebre tifoidea Colera Diarrea	Tracoma Malaria Esquistosomiasis Enfermedad del sueño
Virus	
Hepatitis Influenza Herpes simple Catarro comun ( rinovirus ) Varicela zoster Paperas	

Tabla No. 7 Principales enfermedades en las que se requiere el desarrollo de vacunas. ( )

## Riesgos de la Ingeniería Genética

Se puede afirmar ya en la actualidad que la Ingeniería Genética ofrece gran potencial que se podría considerar como ilimitado sin embargo, existen dentro de estas posibilidades de uso algunas que han llegado a preocupar sin duda desde los principios de la manipulación genética a numerosos científicos al grado de considerarse ya estas como problemas sobresalientes en los trabajos de esta tecnología llegándose finalmente al establecimiento de un conjunto de normas muy rígidas dictadas por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos ( NIH ). (71)

Algo de esto es el hecho preocupante de trabajar con microorganismos productores de cáncer y resistentes a los antibióticos como es el caso del virus SV40 que representa un riesgo muy importante ya que estos virus se encuentran reprimidos en la naturaleza por mecanismos inexistentes en las bacterias donde pueden llegar a despertar y empezar a reproducirse, si las bacterias con que se trabaja la recombinación es decir bacterias que poseen en su interior virus cancerígenos escapan al medio natural donde se reproducen como lo es el intestino humano pueden producir un tipo de cáncer de carácter epidémico. (72)

También se ha trabajado con fragmentos de DNA humano en el interior de una bacteria para conseguir un poco al azar, la localización de algún gen. Este método llamado del tiro limpio es el que se introduce una información desconocida en el inte-

-rior de una bacteria de la que todo el mundo posee varios millones en el intestino, se pueden introducir tambien fragmentos de DNA de virus carcinogénicos puesto que muy a menudo se encuentran en el DNA humano y que podria ser el caso del que se utilizara en el trabajo de recombinación por lo anterior cabe recordar que los virus son microorganismos que no poseen la maquinaria especializada para la síntesis de sus propias proteínas por lo que se ven obligados a introducir su material genético en una célula que si posea esta característica, lo que hace posible su reproducción, por esto los virus son considerados como parasitos intracelulares obligados y el genoma viral introducido es insertado al de la célula huésped obteniendose asi una información portadora de cáncer viral.

Estos factores pueden generar bacterias patogenas que se convertirian en epidemicas pues son resistentes a los antibioticos y no habria casi posibilidad de atacarlas.

Tambien se podria considerar la posibilidad de la introducción de un gen para una toxina bacteriana como es el caso de la que producen la bacteria *Clostridium botulinum* ( causante del botulismo ) o *Clostridium tetani* ( causante del tetanos ), hay que destacar que la transformación perjudicial de una bacteria no es lo mismo que la liberación de un compuesto tóxico al ambiente mientras que este último tarde o temprano se diluye y desaparece por lo tanto su efecto negativo también, la bacteria si se esca-

-pa del laboratorio productor a un medio natural se va reproduciendo y extendiéndose siempre que su modificación sea una ventaja para ella.

Incluso se podría pensar en una bacteria que sintetize la hormona humana del crecimiento en el intestino de una persona sin que su producción sea regulada como lo es en la glandula productora, esto provocaría problemas importantes.

Por todo esto se dictaron las normas para la seguridad por -- iniciativa de los mismos científicos que estan trabajando en el campo entre otras las más importantes son:

- Se prohíbe la utilización de la manipulación genética para incorporar material genético de virus carcinogénicos o patógenos, genes de toxinas o fragmentos peligrosos, en el DNA de bacterias como es el caso del virus SV40, 40 o polyoma virus. (73)

- En técnicas de manipulación genética se hará uso de una variedad de bacterias como la E. coli K-12 que desde un principio se eligió por que solo sobrevive en condiciones de laboratorio muy especiales fuera de él sus mutaciones recesivas le impiden proliferar y muere con lo que en teoría no puede convertirse en agente patógeno.

Con lo que respecta al uso de los laboratorios también fué regulado clasificandolos en cuatro tipos de acuerdo a su seguridad ; P-1 : Baja seguridad

Laboratorios con buenos procedimientos, personal adecuado para tecnicas que requieren poco adestramiento y descontaminacion de desechos.



P-2 : Mediana seguridad

Laboratorios que no poseen accesos públicos, autoclave para descontaminación de desechos en el edificio, facilidad de lavado tanto del material como humano sin riesgo de contaminación ambiental alguna.

P-3 : Alta seguridad

Presión de aire negativa, filtros de vacío de alta seguridad, armarios utilizados para almacenamiento o cualquier otro uso llamados de Clave II.

P-4 : Máxima seguridad

Construcción monolítica, aire con llave de seguridad, descontaminación con autoclave de todo el material, armarios de alta seguridad llamados Clave III.

Trabajar con pequeñas cantidades de cultivo bacteriano como máximo 10 litros.

Sin embargo desde la promulgación de estas normas y después de un periodo de cierto control estricto de parte de los organismos oficiales de salud, se está llegando al momento en que la progresiva relajación está conduciendo al abandono gradual de casi todas las medidas de seguridad tomadas, dado que experimentos que necesitaban de laboratorios de tipo P-4 o sea de alta seguridad se están practicando en laboratorios de mediana seguridad o sea P-2. De los diez litros de cultivo bacteriano es decir de la bacteria manipulada se está pasando a 100 litros de cultivo e inclu-

-so más. Se abandona la cepa E. coli K-12 por ser tan frágil y su mantenimiento implica mas trabajo que con las cepas salvajes que son más resistentes. ( 74,75 )

Incluso se ha tenido que expulsar de la Universidad Americana un investigador que introdujo un DNA clasificado como peligroso y que no podia ser clonado en el interior de una bacteria.

Esto a llegado hasta el límite de que el mismo Paul Berg premio Nobel de Química en 1980 por sus trabajos en Ingeniería Genética este abogando por la supresión de la normativa de seguridad en este campo que considera importante pensando en que ya esta entrando al uso industrial esta tecnologia. (76)

Sin embargo por todo lo anteriormente mencionado se considera impresindible la implantación de normas sumamente estrictas para el control del uso de la Ingeniería Genética que si bien comporta esperanzas benéficas para la humanidad tambien grandes amenazas como es el caso de que si en un momento dado la liberación de microorganismos peligrosos al medio ambiente se considerará de bajas o nulas probabilidades, pudiera darse el caso de una liberación intencional que nos hace pensar sin duda alguna en la amenaza de una nueva arma biológica de terribles consecuencias.

## RESUMEN

Tomando como antecedentes fundamentales; el Dogma de la Genética Molecular que nos dice que todos los seres vivos, plantas, animales superiores, microorganismos, utilizamos el mismo código genético y la molécula de DNA ( ácido desoxiribonucleico ) para acumular información y transmitirla, los mismos o casi los mismos aminoácidos, así como los mismos mecanismos de transcripción y traducción para llegar finalmente a las proteínas que son las que proporcionan las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas típicas de cada especie, así como el descubrimiento de las enzimas de restricción y la síntesis química de genes en el laboratorio, la Genética Molecular ha podido aportar una novedosa tecnología con múltiples aplicaciones en la que destaca la de su utilidad en la industria Farmacéutica llamada Ingeniería Genética.

Este es el término con el que se le conoce a la metodología llamada recombinación " in vitro " de DNA y esta permite la manipulación de fragmentos específicos de material genético en un tubo de ensayo, es decir gracias a esta tecnología hoy es posible aislar un segmento de DNA de cualquier ser vivo e introducirlo a una bacteria como *Escherichia coli* K-12 por ejemplo para la posterior obtención de aquella sustancia que el gen introducido codifica . Además de esto lo más admirable de la Ingeniería Genética es que ha permitido la expresión de genes

sintetizados en el laboratorio, con estos genes hoy es posible programar a una cepa bacteriana que produzca una determinada proteína como es el caso de productos humanos de interés médico en el caso de deficiencia de estos, o usados en la terapéutica de ciertas enfermedades, como son hormonas, anticuerpos, interferon .

Aunque las técnicas de la Ingeniería Genética ya en el laboratorio son complejas lo que se debe de considerar como básico son los tres pasos siguientes; 1) La producción u obtención del gen deseado 2) La inserción dentro de un organismo efectivo que se replique y se reproduzca 3) Verificación de la inserción del gen y que se exprese. Esto es al final lo que da que la proteína deseada se sintetice en la bacteria. Hasta ahora se ha llegado con satisfacción a obtener productos que antes solamente sintetizaba el hombre o que se extraían de animales para uso humano pero en muy poca cantidad y a muy alto costo además de otros inconvenientes. Esta útil y novedosa tecnología ofrece para un futuro no lejano la obtención de compuestos de los cuales algunos no se han logrado sintetizar por ningún otro método ni obtenerlos de manera natural. Por esto es indudable que la aplicación de esta tecnología en el campo farmacéutico será una de las mayores aportaciones tanto económica como técnica y social de los últimos tiempos si bien quedara sometida a las exigencias legales que autorizan el uso adecuado de la manipulación genética así como el empleo de los productos así obtenidos.

## CONCLUSIONES

Se considera a la Ingeniería Genética como el eje central para reconvertir a la Industria Farmacéutica en altamente eficiente en sus procesos de producción, ya que los proyectos anteriores de esta tecnología van pasando rápidamente de pura ciencia-ficción a la realidad. Al disponer en la actualidad de bacterias transformadas que se han manipulado para que sean capaces de producir sustancias cuya utilidad está centrada básicamente en el campo de la Medicina. Esto es posible si se considera que en teoría la Ingeniería Genética puede hacer que cualquier característica que se encuentre en una determinada especie y tenga determinado interés pueda ser aislada en forma de gen y ser introducido en un organismo que a su vez contenga ciertas características ventajosas como pueden ser; que se reproduzcan más rápidamente que otros, que sea más pequeño, etc. Por ejemplo, con esta tecnología se ha conseguido transportar el gen que codifica la insulina humana a una bacteria que la ha asumido como propia y se hace capaz de sintetizarla y segregarla al exterior donde puede ser recogida y concentrada. Finalmente esta Insulina pueden utilizarla los diabéticos. De la misma forma se han obtenido también bacterias capaces de producir la somatostatina, la hormona humana del crecimiento, y últimamente el interferón el cual se considera como una cura contra el cáncer además de ser antiviral. Lo anterior ha lle-

-gado a ser tan trascendente que algunas compañías farmacéuticas se han valido de estas tecnologías para la obtencion rápida y eficiente de varias sustancias que actualmente son muy costosas de obtener por otro tipo de método.

Por otro lado se vislumbra que las posibilidades de aplicacion son practicamente infinitas ya que se tiene a disposicion toda la inmensa informacion acumulada durante millones de años en cada una de las especies y variedades existentes.

Por lo mencionado en este trabajo se puede decir que la Ingeniería genética es incapaz de crear vida o fabricar nuevas especies, lo máximo que puede hacer es distribuir genes procedentes de diversas especies en una sola para darle a éstas características que de forma conjunta no se daban en la naturaleza. Dicho en otras palabras se trata de proporcionarle a determinados microorganismos unas condiciones en las cuales trabajaran con alta eficiencia, rapidez, perfeccion y especificidad que lo hace altamente potencial para la obtencion de una sustancia o producto deseado.

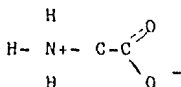
La importancia de los productos que se han obtenido hasta ahora como los futuros es básicamente el interés mundial ya que la demanda de estos es grande y repercutira beneficiando a la salud humana por su bajo costo y facil adquisición en el mercado lo que avala su producción.

Otra posibilidad que marca el uso de la Ingeniería Genética es la "creación" de una bacteria transformada perjudicial que se logra obtener al introducir DNA de virus patógenos o cancerosos y la introducción en esta de factores de resistencia a los antibióticos. Con estos factores se puede pasar a una bacteria patógena que se convertiría en epidémica y no podrían atacarse. También es posible la introducción de genes que sintetizen alguna toxina que si se considera también que la bacteria transformada es resistente a los antibióticos se convertiría en una plaga mortal.

Por todo ello la promulgación de normas para el uso adecuado y provechoso de la Ingeniería Genética se considera imprescindible pensando en que se está ya utilizando esta tecnología en la Industria farmacéutica y las normas de seguridad hasta ahora seguidas no son rígidas, lo que se piensa de alto riesgo. Se considera pues a la Ingeniería Genética debidamente reglamentada para uso industrial como una perspectiva nueva y esperanzadora que allanara el camino con soluciones hasta hace poco insospechadas. (77-88)

G L O S A R I O

AMINOACIDOS : Unidades estructurales de las proteínas. Existen veinte aminoácidos comunes que comparten la misma estructura química, variando solo en cuanto a sus grupos laterales.



ANTICUERPOS : Llamados también inmunoglobulinas son moléculas proteicas con forma de Y que se unen a antígenos específicos y los neutralizan, se componen de unidades de cuatro cadenas polipeptídicas dos pesadas y dos livianas unidas entre sí por puentes disulfuro. Se pueden dividir en cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD, IgE según el tipo de la cadena pesada que las compone.

BASES NITROGENADAS : Moléculas aromáticas que contienen N, con características básicas (tendencia a adquirir un átomo de H). Las bases nitrogenadas importantes para la célula son purinas y pirimidinas.

CARCINOGENO : Agente inductor de cáncer

CONJUGACION : Mecanismo de recombinación en el que se transfiere el DNA entre dos bacterias por contacto celular.

CORREPRESOR : Metabolitos mediante los cuales en combinación con su represor inhiben específicamente la producción de la proteína implicada en su metabolismo.

CROMOSOMA : Estructura filamentososa en las que se asocia el material hereditario de las células y los virus.

DNA : Polímero de desoxiribonucleótidos, el material genético toda célula.

DESOXIRIBONUCLEOSIDO : Producto de la condensación de una purina o pirimidina con la pentosa desoxiribosa, un azúcar de cinco carbonos.



DESOXIRIBONUCLEOTIDO	:	Compuesto que consiste de una base purica o pirimidica ligada al azúcar desoxiribosa, el que ha su vez esta unido al grupo fosfato.
ENLACE FOSFODIESTER	:	
ENLACE DE HIDROGENO	:	Fuerza de atraccion debil que existe entre un atomo electronegativo y un atomo de hidrogeno unido covalentemente a otro atomo electronegativo.
ENLACE DISULFURO	:	Enlace covalente entre dos atomos de azufre de aminoacidos distintos de una misma proteina, es importante en la fijación de ciertas estructuras proteicas.
ENLACES COVALENTES	:	Enlaces quimicos fuertes que se generan cuando atomos comparten electrones.
ENZIMAS	:	Moleculas proteicas capaces de catalizar reacciones quimicas.
ENZIMAS DE RESTRICCION	:	Componentes del sistema defensivo de una celula contra acidos nucleicos extraños. Estas enzimas cortan el DNA de dos hebras siempre y cuando no este modificado ( p. ej., metilado ) en secuencias especificas, las cuales acusan simetria en torno a un punto.
EPISOMA	:	Elemento genetico que puede existir libremente, o como parte del cromosoma celular normal.
EXON	:	Porción del DNA cuya informacion se transcribe al RNAm para la posterior sintesis de proteinas.
EXTREMOS ADHERENTES	:	Serie de bases al final de de la doble cadena de un fragmento de DNA que no estan apareadas con su respectiva base y que por lo mismo presentan alta afinidad quimica a sus bases correspondientes.

- FAGOSITOSIS** : Proceso para la recolección de alimentos empleado por muchas células. Este proceso implica rodear a los objetos de tamaño celular con proyecciones tipo pseudopodo.
- GEN** : Un tramo a lo largo de un cromosoma que codifica para un producto funcional, que bien puede ser RNA o proteínas.
- GENETICA MOLECULAR** : Parte de la Genética que interpreta los conocimientos del material hereditario desde un punto de vista molecular ofreciendo sus conceptos en base a las características fisicoquímicas y biológicas de dicho material.
- GENOMA** : Conjunto haploide de cromosomas con sus genes correspondientes.
- INTRONES** : Genes a lo largo del DNA cuya información no es transcrita a la forma de RNA en otras palabras no poseen sentido de lectura para la síntesis de proteínas. Se piensa intervienen en la regulación de la expresión hereditaria.
- IN VITRO** : Relativo a los experimentos efectuados en un sistema no vivo es decir exento de células.
- IN VIVO** : Relativo a los experimentos realizados en un sistema tal que el organismo permanece intacto, ya sea a nivel de célula o de un organismo completo.
- MAPA GENETICO** : Disposición de algún gen a lo largo de un cromosoma.
- NUCLEASAS** : Enzimas que rompen los enlaces fosfodiéster de las cadenas de ácidos nucleicos.
- OPERON** : Unidad genética constituida por genes adyacentes que actúan coordinadamente bajo el control de un operador y un represor.
- PALINDROMA** : Trocho de DNA en que corren en direcciones opuestas secuencias idénticas de bases.

- PINOCITOSIS** : Proceso para la captura DE objetos nutrientes de tamaño macromoleculuar. Se cree que su mecanismo sea basicamente similar al de la fagocitosis.
- PLASMIDO** : Elementos cromosomicos bacterianos del citoplasma que presentan duplicacion autonoma.
- POLINUCLEOTIDO** : Secuencia lineal de nucleotidos, en la que el azucar en la posicion 3' de un nucleotido se une al azucar de la posición 5' del nucleotido adyacente, mediante un grupo fosfato.
- RECOMBINACION** : Aparicion en la descendencia de razgos que no se encontraban reunidos en ninguno de los progenitores.
- REPRESOR** : Producto de un gen regulador: actualmente se cree que es una proteina y se puede combinar tanto con su inductor, como con su operador o bien con su correpresor.
- RIBOSOMAS** : Organelos celulares constituidas por proteinas y RNArribosomal, los ribosomas son lugares de sintesis proteica.
- RNA** : Polimero de ribonucleotidos.
- SECUENCIAS DE INICIACION** : Estas secuencias son reconocidas por los ribosomas y por lo general codifican para el aminoacido metionina que es el inicial en la nueva cadena polipeptidica en vias de desarrollo por lo tanto estas secuencias son la señal para el arranque de la traduccion.
- SECUENCIAS DE TERMINACION** : Cierta cantidad de nucleotidos al final de de cualquier informacion que puede transcribirse y que es la señal para finalizar la transcripcion.

- TRADUCCION** : Proceso mediante el cual la información genética contenida en una molécula de RNAmensajero, dirige el orden de los aminoácidos específicos durante la síntesis de proteínas.
- TRANSCRIPCIÓN** : Proceso que implica apareamiento de bases con lo que la información genética contenida en el DNA se utiliza para ordenar una secuencia complementaria de bases en una cadena de RNA.
- TRANSCRIPTASA INVERSA** : Enzima que es codificada por ciertos virus de RNA y que es capaz de producir cadenas complementarias de DNA de una hebra usando el molde de RNA y luego convertir estas cadenas de DNA a la forma de doble hélice.
- TRANSDUCCIÓN** : Transferencia de genes bacterianos de una bacteria a otra mediante una partícula de bacteriofago.
- TRANSFORMACION** : Modificación genética inducida en una célula por incorporación de DNA purificado proveniente de otras células.
- VIRUS** : Microorganismos que siempre requieren células huésped intactas para su duplicación. Contienen como componente genético ya sea DNA o bien RNA.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Watson, James, D., and Tooze, John. The DNA Story  
( A documentary history of gene cloning ) Ed. W.H. Freeman  
and Company (1981).
- 2.- Crick, Francis. "Central Dogma of Molecular Biology".  
Nature: 227 p.p. 561-563 (1970).
- 3.- Benjamin, Lenin. Gene Expression - 1 ( Bacterial genomes)  
Ed. John Wiley and Sons. London England. (1975)
- 4.- Gibbons, John, H. Impacts of Applied Genetics. Ed. Office  
of Technology Assessment. ( 1981 )
- 5.- Abelson, John. " A Revolution in Biology". Science: 209  
p.p. 1319-1321 (1981).
- 6.- Portugal, Franklin, H., and Choen, Jack, S. A century of DNA  
Ed. The MIT Press U. S. A. ( 1979 ).
- 7.- Watson, James, D., and Crick, Francis, H., C. "Molecular  
Structure of Nucleic Acid; A Structure for Deoxyribose  
Nucleic Acid". Nature: 171 ( 1953 ).
- 8.- Woodward, and Woodward. Concepts of Molecular Genetics.  
Ed. Mc. Graw-Hill. ( 1977 ).
- 9.- Cove, D., J. Genetics. Ed. University Press. ( 1971 ).

- 10.- Carlson, Elof, Axel. Gene Theory. Ed. D. P. Co. ( 1967 ).
- 11.- Harris, Harry. The principles of Human Biochemical Genetics.  
ED. North Holland Publishing Co. ( 1977 ).
- 12.- Whitehouse, H.,L.,K. The mechanism of Heredity. ED. Edward  
Arnold ( 1973 ).
- 13.- Khorana, H., G. " Total Synthesis of Gene". Science: 203 p.p.  
614 - 625 (1979).
- 14.- Itakura, Keichi, and Arthur, D., Riggs. " Chemical DNA  
Synthesis and Recombinant DNA Studies". Science: 209 p.p.  
1401-1405 ( 1980 ).
- 15.- Setlow, J., K., and Hollander. Genetic Engineering. Princi-  
ples and Methods. Ed. Plenum Press. (1980).
- 16.- Mark, J. "Restriction Enzymes: New Tool for Studing DNA"  
Science: 180 482 ( 1972 ).
- 17.- " Structure and Mechanism of Multifunctional restriction  
endonucleasas". Ann. Rev. Biochemical: 50 ( 1981 ).
- 18.- Smith, H., O., and Nathans, D. " Restriction and Modifica-  
tion ensymes and Their recognition sequences". J. Mol.  
Biol.: 81 ( 1973 ).

- 19.- Chang, Shing, and Choen, Stanley, N. " In vitro Site Specific Genetic Recombination Promoted by the Eco R1 Restriction endonuclease". Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.: 74 (1977).
- 20.- Smith, Hamilton, O., and Kenneth, Wilcox, W. " A Restriction Enzyme from Haemophilus Influenzae: Purification and General Properties". J. Mol. Biol.: 51 ( 1970 ).
- 21.- Temin, H., and Baltimore, D. "RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses". Adv. Virus Res.: 17 129 ( 1972 ).
- 22.- Temin, H. " The RNA tumor viruses ". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. : 69 (1972 ).
- 23.- Guarente, Leonard. " A Technique for Expressing Eukaryotic Genes in Bacteria. Science: 209 p.p. 1428-1430 (1980).
- 24.- Crick, Francis. "Split Genes and RNA Splicing". Science:204 p.p. 264-271 (1974).
- 25.- Chambon, Pierre." Split Genes". Scientifican American: 244 ( 1981 ).
- 26.- Dickson, R., C., Abelson, J., Barnes, W., M., and Reznikoff W., S. " Genetic Regulation: The Lac Control Region". Science 187 p.p. 27-35 (1975).

- 27.- Corden, J., Wasylyk, B., Buchwalder, A., Sassone-Corsi, P.  
 " Promoter Sequences of Eukariotic protein- Coding Genes."  
 Science: 209 p.p. 1406-1413 (1980).
- 28.- Hale, Arthur, J. " Genetic Engineering: Do WE it ? How  
 wuold we Do it .?. Biochem. Sco. Symp.: 44 p.p. 123-131 (1979).
- 29.- British Medical Journal. " genetic Engineering for Medicine":  
282 6259 p.p. 169-170 (1981).
- 30.- Ferrandiz, Garcia, F. " Biothecnology Gnetic Engineering  
 Chemical- Pharmaceutical". Rev. Esp. Fisiol.: 38 p.p.353-366  
 (1982).
- 31.- Cape, W., F., Amon, S., I., Neidleman, S., R. " Biotechnology  
 Letters: The Future of Biotechnology". Biotechnology Letters: 2  
 p.p. 199-204 (1980).
- 32.- Leah, David, and Krohngold, Lorraine. "La Biología Molecular  
 en la Industria. Información Científica y Tecnológica: 2 24  
 p.p. 7-13 (1980).
- 33.- Braval, Leonardo. "Ingeniería Genética". Información Científica  
 y Tecnológica: 4 63 p.p. 9-14 (1982)
- 34.- " Biotechnology becomes a Glod Rush ". The Economist: Junio  
 ( 1981 ).
- 35.- Bolivar, F. . " Un accidente con ADN recombinante. Informa-  
 ción Científica y Tecnológica. 2 p.p: 18-19 (1980).
- 36.- " Federal Agency to Check Laboratory Cloning Mixup ". New  
 York Times: CXXIX sep.(1980).



- 37.- Lorraine, Krohngold, Mata, Jose, y Castro, Andrea.  
 "Biotecnología en México". Información Científica y  
 Tecnológica: 2 24 p.p. 15-18 (1980).
- 38.- Peden, K., Pipas J., Pearson-White, S. "Isolation of mutants  
 of an animal virus in bacteria" Science 204 p.p. 1392-1395 (1980).
- 39.- Aharonowitz, Yair, y Choen, Gerald. "Producción micro-  
 biológica de fármacos". Investigación y Ciencia: 62 p.p. 78-93  
 (1981).
- 40.- Milstein, Cesar. "Monoclonal Antibodies". Scientifican  
 American: 243 p.p. 66-74 (1980).
- 41.- Philip, Tucker, W. "Mouse Immunoglobulin D: Messenger RNA  
 and Genomic DNA Sequence". Science: 209 p.p. 1353- 1360 (1980).
- 42.- Kohler, and Milstein, C. " Derivation of Specific Antibody  
 Producing Tissue Culture and Tumor Lines by Cell fusion".  
 J. Eur. Immunology: 6 p.p. 511-519 (1976).
- 43.- Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A., Heynebes, H.,  
 Bolivar, F., Boyner H. " Expression in E. coli of a Chemi-  
 cally Synthesized Gene for the Hormone Somatostatin".  
 Science: 198 p.p. 1056- 1063 (1977).
- 44.- Shine, Jhon, Seeburg, Peter, H., Martial, Joseph, A., Baxter,  
 Jhon, D., Goodman, Haward, M. " Construction and Analysis of  
 recombinant DNA for Human Chorionic Somatomammotropin.  
 Nature: 270 p.p. 494-500 (1977).

- 45.- Goeddel, David, V., Heyneker, Herbert, L., Toyonara, Hozumi, Rene, Arentzen, Itakura, Keiichi, Yansura, Daniel, G., Ross, Michael, J., Crea, Roberto, Seeburg, Peter, H. "Directed expressing in E. coli of DNA sequence coding for human Growth hormone". Nature: 281 p.p. 544-548 (1979).
- 46.- Seeburg, Peter, H., Crea, Roberto, Toyonara, Hozumi. "Nucleotide sequence and amplification in bacteria of structural gene for rat Growth Hormone". Nature: 270 p.p. 486-493 (1977).
- 47.- Vanbuul, P., Vanbuul, Offers. "Clastogenic effects of Biosynthetic human growth hormone on Shell Dwarf mice and CHO cell in vitro". Mutation Research: 127 p.p. 61-64. (1984).
- 48.- Ullrich, Axel, Shine, John, Chirwin, John, Picratt Raymond, Tischer, Edmund, William, J., Rutter, Goodman, Howard, M. "Rat Insulin Genes: Construction of plasmid Containing the sequences. Science: 196 (p.p. 1313-1319 (1977).
- 49.- Ondarza, Raul, Robert, Manuel, Bolivar, Francisco. Transplante y movilizaci3n de genes. Ed. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. 2 edici3n (1981).
- 50.- Rapis, S., y col. "Biologic activities of biosynthetic human insulin in healthy volunteers and insulin-dependent diabetic patients monitored by the artificial endocrine pancreas. Diabetes Care: 4 p.p. 140-143 (1981).

- 51.- Massi-Benedetti M., y col. " A comparative study of activity of biosynthetic human insulin and pork insulin using the glucose clamp technique in normal subjects ". Diabetes Care: 4 p.p. 163-167 (1981).
- 52.- Bottermann, P., y col. " Pharmacokinetics of biosynthetic human insulin and characteristics of its effect. Diabetes Care: 4 p.p. 168-169 (1981):
- 53.- Federlin, K., y col. " Biologic and immunologic in vivo and in vitro studies and biosynthetic human Insulin. Diabetes Care: 4 p.p. 170-174 (1981).
- 54.- Viberti, G., y col. " Biosynthetic human insulin: effect in healthy men on plasma glucose and non-esterified fatty acid in comparison with highly purified pork insulin. Diabetes Care: 4 p.p. 175-179 (1981).
- 55.- Bayer, J., y col. " Comparison of biosynthetic human insulin and pork insulin during rest, food ingestion, and physical work in insulin dependent diabetic subjects using a glucose controlled insulin infusion system. Diabetes Care: 4 p.p. 189-192. ( 1981).
- 57.- Joklik, W., K., and Merigan, T., C. " Concerning the mechanism of action of interferon. Proc. Natl. Acad Sci.: 56 (1966)
- 58.- Abreu, S., L., y col. " Interferon Priming: Effects of Interferon Messenger RNA ". Journal of Biology and Chemistry (E.U.) CCLIV no. 10 (1971).

- 64 .- Maddox, John. "Who will clone a chromosome?". Nature: 312  
p.p. 306 ( 1984 ).
- 65.- Brownlee, G., George and Rizza, Charles. "Clotting factor  
VIII cloned". Nature: 312 p.p. 307 (1984).
- 66.- Vehar, A., Gordon y col. " Structure of human factor VIII"  
Nature: 312 pp. 337-341 ( 1984).
- 67, v Gitschier, Jane y col. " Characterization of the human factor  
VIII gene". Nature: 312 p.p. 326-329 ( 1984 ).
- 68.- Wood, I., William y col. "Expression of active human factor VIII  
from recombinant DNA clones". Nature: 312 p.p. 330-335 (1984)
- 69.- Toole, J., Jhon y col. "Molecular cloning of a cDNA encoding  
human antihemophilic factor". Nature: 312 p.p. 330-331 (1984).

- 56.- Hillerman, M.,R. " Toward control of viral infections of man  
Science: 164 p.p. 506-514 (1969).
- 59.- Merigan, T., C. " Purified Interferons: Physical properties  
and species specificity. Science: 145 p.p. 811-817 (1964)
- 60.- Merigan T., C. " Interferon stimulated by double stranded  
RNA. Nature: 228 p.p. 219-222 (1970).
- 61.- Streuli, M., Nagata, S., Weissman, C., H. " At Least There  
Human type  $\alpha$  interferon. Structure of  $\alpha$  2". Science: 209  
p.p. 1343-1347 (1980).
- 62.- Masucci, G., M. y col. " Efect of Interferon  $\alpha$  I from E.coli  
on some cell Funtion". Science: 209 p.p. 1431-1438 (1980)
- 63.- Nagata, S., y col. " Shynthesis in E. coli of a polypeptide  
whit human leukocyte interferon activity". Nature: 284  
p.p. 316-320. (1980).
- 64 .- Maddox, John. "Who will clone a chromosome?". Nature: 312  
p.p. 306 ( 1984 ).
- 65.- Brownlee, G., George and Rizza, Charles. "Clotting factor  
VIII cloned". Nature: 312 p.p. 307 (1984).
- 66.- Vehar, A., Gordon y col. " Structure of human factor VIII"  
Nature: 312 pp. 337-341 ( 1984).
- 67, r Gitschier, Jane y col. " Characterization of the human factor  
VIII gene". Nature: 312 p.p. 326-329 ( 1984 ).
- 68.- Wood, I., William y col. "Expression of active human factor VIII  
from recombinant DNA clones". Nature: 312 p.p. 330-335 (1984)
- 69.- Toole, J., Jhon y col. "Molecular cloning of a cDNA encoding  
human antinaemophilic factor". Nature: 312 p.p. 330-331 (1984).

- 70.- Bevan, E., A. " Genetic engineering Part 2: Synthesis of pharmaceuticals". Indian Journal of pharmaceutical Science: 44 p.p. 65-71 (1982)
- 71.- " Recombinant DNA Research: I DHEW publication (NIH): 75-1138 (1976)
- 72.- Bazelon, David, L. " Risk and responsibility". Science:205 p.p. 277-280 (1979).
- 73.- Jackson, D., A. " Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus SV 40: circular SV40 molecules containing lambda phage genes and galactose operon of E. coli ". Proc. Nat. Acad. Sci.: 69 ( 1972 ).
- 74.- Wade, N. " Recombinant DNA: NIH Sets Strict Rules to Launch New Technology". Science: 190 p.p. 767-769 (1975).
- 75.- Israeli, M., A. Chan, H.,W., P., and Martin, M., A. "Molecular Cloning of Polyoma Virus DNA in Escherichia Coli: Plasmid Vector System ". Science: 203 p.p. 883-892 (1979).
- 76.- Berg, Paul, y col. " Potential Biohazard of Recombinant DNA molecules". Science: 185 p.p. 303-304 (1974).
- 77.- Richard, C., Mulligan, and Berg, Paul. " Expresion of a Bacterial Gene in mammalian Cell ". Science: 209 p.p. 1422-1427 (1980).
- 78.- Anderson, French, W., and Elaine, G.,d. " Genetic Engineering in mammalian Celll. Scientifican American: 245 (1981).

- 79.- Lape, Mark. "Relatities of Genetic Engineering". Medical Research Enginerring: 12 p.p. 25-29 (1976).
- 80.- Kellog, S., T. " Genetic and Biotechnology". J.Am.Oil.Chem. Soc.:59 p.p. 2-6 (1982).
- 81.- Noguchi, T., Nakato, H. " Research and Development of new Drugs by Biotechnology.". Japanese Pharmacological Society:33 (suppl) p.p. 28-31 (1983).
- 82.- Rabbits, T., H. "Bacterial cloning of plasmids carrying copies of rabbit globin messenger RNA. Nature: 260 p.p. 221-225 ( 1976 ).
- 83.- Nicolau, Claude, and Paraf Alain. " LOs liposomas Agentes te-rapeuticos del mañana. Mundo Cientifico: 1 p.p. 661-662 (1981).
- 84.- Watson, James, D. Biologia Molecular del Gen. Ed. Fondo Educativo Interamericano 3er. edición (1978).
- 85.- Dulbeco, Davis, Ginsberg, Wood. Tratado de Microbiologia. ed. Salvat 2da. edición (1978).
- 86.- Gibbons, John, H. Impacts of Applied genetics. Ed. Office of Technology Assessment. (1981).
- 87.- Hayes, William. The Genetics of Bacteria and Their Viruses. ed. Blacwell Scientifican Publications 2da. edicion ( 1968 ).
- 88.- Zimmerman, Burk, H . BIOFUTURE. ED. Plenum (1984).