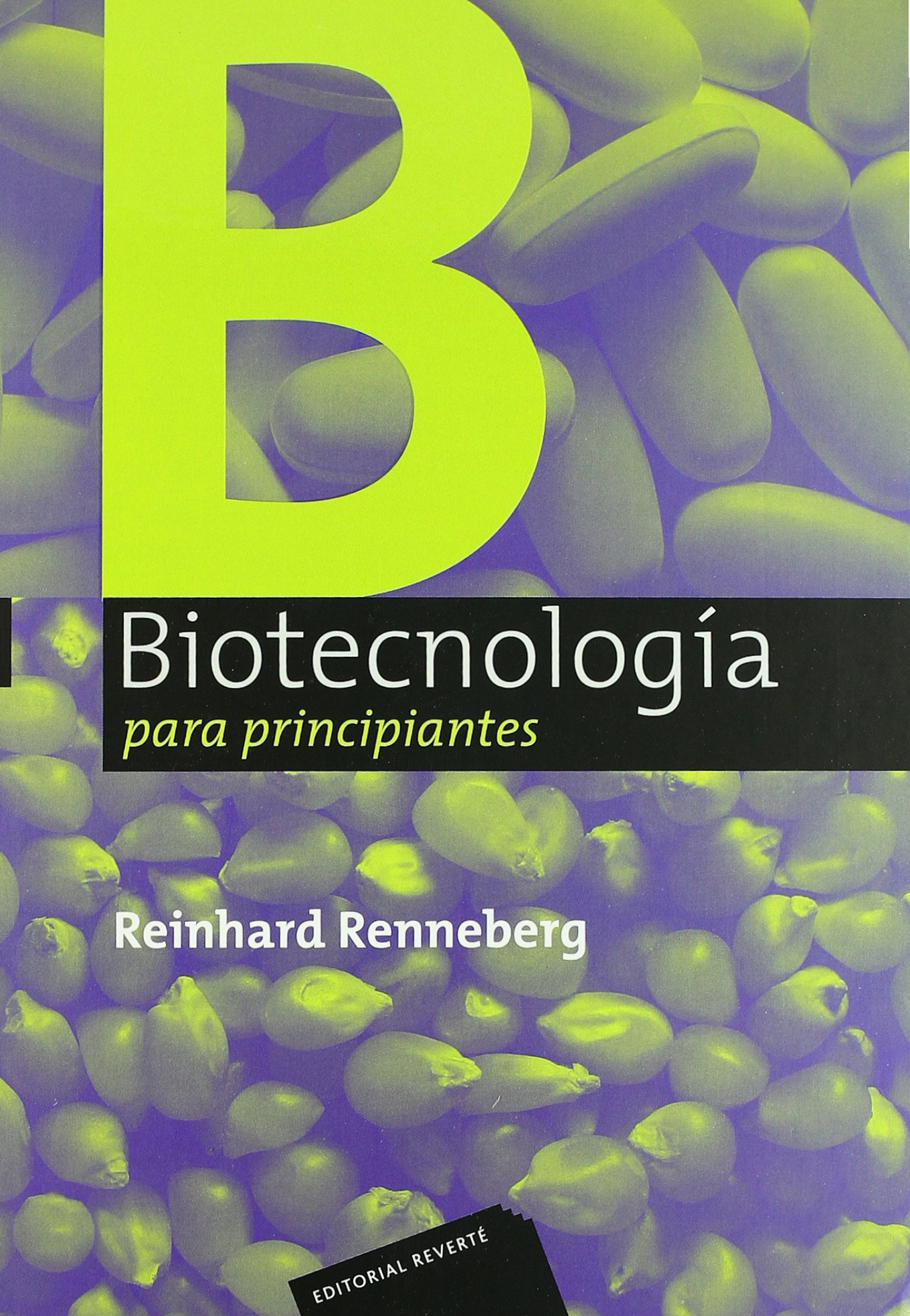


Biotecnología
para principiantes

Reinhard Renneberg

EDITORIAL REVERTÉ

BASE LEGAL PARA DIGITALIZACIÓN DE LIBROS CON DERECHOS DE AUTOR

El Sistema Integrado de Bibliotecas de la Universidad Central del Ecuador, digitalizará su acervo bibliográfico siempre y cuando sea para fines educativos y de investigación. No se permite la reproducción y distribución para la comercialización directa e indirecta del mismo

La digitalización del material bibliográfico se lo realiza de acuerdo al Código Orgánico De La Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación **Art. 212 numeral 9, Literal ii "(…) Una biblioteca o archivo podrá, además, realizar los siguientes actos (…) La reproducción electrónica y comunicación pública de obras de su colección para ser consultadas gratuita y simultáneamente hasta por un número razonable de usuarios, sólo en terminales de redes de la respectiva institución o para usuarios de esa institución bajo su control, en condiciones que garanticen que no se puedan hacer copias electrónicas de esas reproducciones" y literal vii "La reproducción, adaptación, traducción, transformación, arreglo, distribución y comunicación de una obra protegida por derechos de autor o una prestación protegida por derechos conexos, en uno o más formatos accesibles para el uso exclusivo de personas con discapacidad"**

Este material se considera un producto intelectual a favor de su autor; por tanto, la titularidad de sus derechos se encuentra protegida por el Código Orgánico De La Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación. La violación a dichos derechos constituye un delito que será responsabilidad del usuario.

Reinhard Renneberg
Darja Süßbier (Ilustraciones)

BIOTECNOLOGÍA PARA PRINCIPIANTES

EDITORIAL REVERTÉ

Barcelona · Bogotá · Buenos Aires · Caracas · México

Registro bibliográfico (ISBD)

Renneberg, Reinhard

[Biotechnologie für Einsteiger. Español]

Biotecnología para principiantes / Reinhard Renneberg ; [versión española por Josep Joan Centelles y Magdalena Ferrer Peralta]. Barcelona : Reverté, [2008]
XI, 300 p. : il. col. ; 28 cm.
Traducción de: Biotechnologie für Einsteiger. – Bibliografía. Índice

1. Biotecnología. I. Centelles Serra, Josep Joan, trad. II. Ferrer Peralta, Magdalena, trad. III. Título.
66

Título de la obra original:
Biotechnologie für Einsteiger

Versión original publicada en lengua alemana:
Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag,
Heidelberg, Germany

Copyright © 2004 Elsvier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Versión española por:
Dr. Josep Joan Centelles
Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular
Universidad de Barcelona
y
Magdalena Ferrer Peralta
Traductora diplomada de inglés y alemán
Universidad Autónoma de Barcelona

MAQUETACIÓN: REVERTÉ-AGUILAR, S. L.

Edición en español:
© Editorial Reverté, S. A., 2008

Propiedad de:
EDITORIAL REVERTÉ, S. A. Barcelona. ESPAÑA

Esta obra ha sido publicada con una subvención de la Dirección General del Libro, Archivos y Bibliotecas del Ministerio de Cultura, para su préstamo público en Bibliotecas Públicas, de acuerdo con lo previsto en el artículo 37.2 de la Ley de Propiedad Intelectual.

Impreso en España - Printed in Spain

Impreso por Alvagraf
La Llagosta (Barcelona).

La suerte favorece al espíritu preparado.

Louis Pasteur

A mis maravillosos padres, Ilse y Herbert Rennenberg, dedicado con amor y agradecimiento

Colaboradores

Colaboraciones en todo el libro

Francesco Bennardo, Liceo Scientifico S. Valentini, Castrolibero, Cosenza
David S. Goodsell, The Scripps Research Institute, La Jolla
Oliver Kayser, Rijksuniversiteit Groningen
Oliver Ullrich, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Colaboraciones en capítulos individuales

Rita Bernhardt, Universität des Saarlandes, Saarbrücken
Uwe Bornscheuer, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald
George Cautherley, R&C Biogenius Hong Kong
Ananda Chakrabarty, University of Illinois
Arnold L. Demain, Drew University, Madison
Theodor Dingermann, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Stefan Dübel, Technische Universität Braunschweig
Peter Fromherz, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried/München
Saburo Fukui (†), Kyoto University
Roland Friedrich, Justus-Liebig-Universität Gießen
Dietmar Fuchs, Universität Innsbruck
Oreste Ghisalba, Novartis AG, Basel
Horst Grunz, Universität Duisburg Essen
Georges Halpern, University of California at Davis
Albrecht Hempel, Krankenhaus Dresden-Friedrichstadt
Choy-L. Hew, National University of Singapore
Bertold Hock, Technische Universität München
Martin Holzhauer, IMTEC, Berlin-Buch
Woo-Suk Hwang, Seoul National University
Hwa A. Lim, D'Trends Inc., Silicon Valley, Kalifornien
Inca Lewen-Dörr, GreenTec., Köln
Isao Karube, Tokyo Institute of Technology
Frank Kempken, Christian-Albrechts-Universität Kiel
Albrecht F. Kiderlen, Robert-Koch-Institut, Berlin
Uwe Klenz, Institut für Physikalische Hochtechnologie e.V. Jena
Jutta Ludwig-Müller, Technische Universität Dresden
Stephan Martin, Deutsches Diabetes-Zentrum, Düsseldorf
Alex Matter, Novartis Singapore
Marc van Montagu, Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtung, Köln
Reinhard Niessner, Technische Universität München
Susanne Pauly, Hochschule Biberach
Jürgen Polle, Brooklyn College of the City University of New York
Tom Rapoport, Harvard Medical School, Boston
Matthias Reuss, Universität Stuttgart
Frieder W. Scheller, Universität Potsdam
Andreas Sentker, Die Zeit, Hamburg
Matthias Seydack, 8 sens.biognostic AG, Berlin
Georg Sprenger, Universität Stuttgart
Gary Strobel, Montana State University, Bozeman
Eric Stewart, INSERM - University Paris 5
Kurt Stüber, Köln
Atsuo Tanaka, Kyoto University
Dieter Trau, National University of Singapore
Thomas Tuschl, Rockefeller University, New York
Larry Wadsworth, Texas A&M University
Catherine Wan, Hongkong
Terence S. M. Wan, Head of Racing Laboratory, The Hong Kong Jockey Club
Eckhard Wellmann, Universität Freiburg
Dieter Wolf, Boehringer-Ingelheim, Biberach
Christian Wandrey, Institut für Biotechnologie, Forschungszentrum Jülich
Zeng-yu Wang, The Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma
Michael Wink, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Mengsu Yang, City University of Hong Kong
Leonhard Zastrow, Research and Development Coty Inc., Monaco

Con las contribuciones de

Charles Coutelle, Imperial College, London
Rainer Erb, Zentrum für Umweltkommunikation, Osnabrück
Herrmann Feldmeier, Institut für Infektionsmedizin der Charité, Berlin
Ricardo Gent, Verband der Chemischen Industrie, Frankfurt am Main
Oreste Ghisalba, Novartis AG, Basel
Frank Hatzak, Novozymes Dänemark
Stefanie Heiden, Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Osnabrück
Jörg Knäblein, Schering AG, Berlin
Norbert Mülleder, Syngenta, Düsseldorf
Netzwerke TransGen und bioSicherheit, Aachen
Uwe Perlitz, Deutsche Bank Research, Frankfurt am Main
Jens Reich, Max-Delbrück-Centrum, Berlin-Buch
Christoph Winthertaler, Wacker-Chemie GmbH, München
Eckhard Wolf, Universität München
Holger Zinke, B.R.A.I.N. AG, Zwingenberg

Contenido

Introducción X

Cerveza, pan, queso – Suculenta biotecnología 1

Capítulo 1



1.1 Al principio fue la cerveza y el vino: la leche materna de la civilización *2* · **1.2** Las levaduras son los burros de carga de la fermentación alcohólica *2* · **1.3** También hoy en la industria cervecera se utilizan levadura, agua, malta y lúpulo *5* · **1.4** Las células funcionan con energía solar *11*· **1.5** El alcohol no es un placer sino una necesidad para las levaduras *11* · **1.6** Los licores muy concentrados se producen mediante destilación *12* · **1.7** Productos bacterianos: ¡La acidez los hace duraderos! *15* · **1.8** Café, cacao, vainilla, tabaco – Fermentación para el placer *18* · **1.9** Los mohos cooperan con las bacterias y producen queso *18* · **1.10** Sake y salsa de soja *22* · **1.11** ¿Qué es en realidad la fermentación? *22*

Enzimas – Supercatalizadores moleculares para el hogar y la industria 25

Capítulo 2



2.1 Las enzimas son biocatalizadores eficaces y específicos *26* · **2.2** La lisozima: la primera enzima cuya anatomía y función se entendieron en detalles moleculares *27* · **2.3** Los cofactores sirven como herramientas a las enzimas complejas *31* · **2.4** Las enzimas pueden obtenerse de animales, plantas y microorganismos *32* · **2.5** Las hidrolasas extracelulares degradan los biopolímeros en pequeñas unidades utilizables *34* · **2.6** Las amilasas mezclan, cuecen y trenzan *34* · **2.7** Las pectinasas prensan más zumo de fruta y verduras *36* · **2.8** Los biodetergentes son la aplicación más importante de las enzimas hidrolíticas *37* · **2.9** PLas proteasas ablandan la carne y curten la piel *38* · **2.10** Inmovilizaciones: cuando se quiere reutilizar las enzimas *40* · **2.11** Glucosa isomerasa y jarabe de fructosa: azúcar con mayor fuerza edulcorante *40* · **2.12** Alimentos y forrajes con enzimas inmovilizadas *42* · **2.13** Los reactores de enzimas de membrana usan regeneración de cofactor *44* · **2.14** Células inmovilizadas *46*

El milagro de la ingeniería genética 49

Capítulo 3



3.1 DNA: La doble hélice porta el material hereditario *50* · **3.2** Las DNA polimerasas catalizan la replicación de la doble hebra de DNA *50* · **3.3** No todos los genes constan de DNA: los virus RNA utilizan RNA de una única hebra *51* · **3.4** La aclaración del código genético *51* · **3.5** El genoma humano – Una enorme enciclopedia de 24 volúmenes *52* · **3.6** El código de DNA se agrieta: el RNA sintético descifra los codones *53* · **3.7** Los genes estructurales cercanos a los fragmentos de DNA controlan la expresión de los genes *58* · **3.8** Ribosomas – La fábrica de proteínas de la célula: una molécula gigante de RNA y proteínas *58* · **3.9** Recombinación: las cartas genéticas se barajan de nuevo *60* · **3.10** Los plásmidos son vectores ideales para el material genético *61* · **3.11** Tijeras y pegamento moleculares: endonucleasas de restricción y DNA ligasas *62*· **3.12** Los primeros experimentos de ingeniería genética: ¿bacterias que croan? *62* · **3.13** Cómo se obtienen los genes *65* · **3.14** ¿Insulina humana a partir de bacterias? *66* · **3.15** Cómo se sintetiza la insulina en humanos: desde la preproinsulina, pasando por la proinsulina, hasta la insulina activa *68* · **3.16** Los inicios de la ingeniería genética con proinsulina de rata *69* · **3. 17** Hibridación de DNA: cómo se encuentran bacterias con sondas de DNA *71* · **3.18** Un pequeño desvío: la somatostatina – La primera proteína humana de bacterias *71* · **3.19** Cómo se obtiene enzimáticamente insulina humana a partir de insulina de cerdo *73* · **3.20** ¡Finalmente se consiguió! La primera insulina humana producida por ingeniería genética *73* · **3.21** Asilomar: ¿cuál es el peligro de la nueva ingeniería genética? *74* · **3.22** Proinsulina humana a partir de una única cepa de *E. coli*76 · **3.23** Levaduras de cocción como productoras de proinsulina *77* · **3.24** Variantes artificiales de la insulina (muteína) mediante ingeniería genética *78* · **3.25** Los genes manipulados de células de mamífero producen proteínas complejas modificadas *78*

Capítulo 4 **BIOTECNOLOGÍA BLANCA** – Las células como fábricas de síntesis 83



4.1 El problema de la visión general *84* · **4.2** Adaptación táctica: regulación por retroacoplamiento *86* · **4.3** Adaptación estratégica: producción de enzimas a demanda *87* · **4.4** Un ordenador molecular alostérico: la glutamina sintetasa *89* · **4.5** Represión de catabolitos o cómo se pesca una polimerasa *90* · **4.6** ¡Mohos en lugar de limones! *90* · **4.7** Lisina en abundancia: la retroinhibición de la aspartato quinasa se burla con mutantes *91* · **4.8** L-glutamato: condimento de sopa "levorrotatorio" en exceso *93* · **4.9** ¿Tienen que ser siempre microbios? La síntesis química contra la fermentación *94* · **4.10** Ácido L-ascórbico, la vitamina C *96* · **4.11** Aspartamo – La marcha triunfal de un éster dipeptídico dulce *99* · **4.12** Las células inmovilizadas producen aminoácidos y ácidos orgánicos *101* · **4.13** Mutaciones: un camino hacia la programación selectiva de microbios *101* · **4.14** *Penicillium notatum*: el hongo milagroso de Alexander Fleming *106* · **4.15** *Screening*: biotecnólogos a la caza de hongos *106* · **4.16** El menú de los microbios *107* · **4.17** La biofábrica moderna *110* · **4.18** Calor, frío y sequedad nos mantienen los microbios en el cuello *110* · **4.19** Recuperación del producto: *downstream processing* *114* · **4.20** Estreptomicina y cefalosporina – Los siguientes antibióticos después de la penicilina *115* · **4.21** La competencia con los microbios: resistencias *115* · **4.22** Ciclosporina – Un producto microbiano para trasplantes *117* · **4.23** Hormonas esteroideas: la cortisona y la píldora anticonceptiva *119*

Capítulo 5 **VIRUS, ANTICUERPOS Y VACUNAS** 123



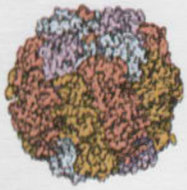
5.1 Virus – La vida prestada *124* · **5.2** De qué forma atacan los virus a las células *124* · **5.3** Cómo se defiende el cuerpo de las infecciones: respuesta inmunitaria humoral mediante anticuerpos *127* · **5.4** Respuesta inmunitaria celular: células T asesinas *129* · **5.5** La primera vacuna: la viruela vacuna contra la viruela humana *134* · **5.6** Las vacunas modernas *137* · **5.7** Las vacunas vivas *139* · **5.8** Anticuerpos monoclonales: balas mágicas de un biorreactor altamente específicas y uniformes *140* · **5.9** Anticuerpos catalíticos *141* · **5.10** Anticuerpos recombinantes *142* · **5.11** Bibliotecas de anticuerpos combinatorias *143* · **5.12** "A cuestas" o visualización de fagos — La próxima revolución *144* · **5.13** Visualización de fagos para la hormona del crecimiento de alta afinidad *144* · **5.14** Nuevas esperanzas en el cáncer: rituximab, un anticuerpo recombinante *145*

Capítulo 6 **BIOTECNOLOGÍA DEL MEDIO AMBIENTE** – Adiós a los caminos de una dirección, bienvenido a los circuitos 149



6.1 Agua limpia –Un bioproducto *150* · **6.2** Depuración aeróbica de los vertidos: campos de aguas residuales, tanques depuradores por filtración y lodo activado *152* · **6.3** Biogás *153* · **6.4** ¡El biogás podría salvar bosques! *154* · **6.5** El biogás en los países industrializados: explotación del estiércol líquido *155* · **6.6** SEl alcohol que crece en los campos *156* · **6.7** Los devoradores de petróleo de Ananda Chakrabarty *157* · **6.8** Azúcar y alcohol a partir de la madera *158* · **6.9** ¿Materias primas químicas de biomasa? *160* · **6.10** Minería silenciosa *164* · **6.11** ¿Una nueva vida para los pozos de petróleo agotados? *164* · **6.12** Bioplástica: ¡circuitos en lugar de caminos de una dirección! *165*

Capítulo 7 **BIOTECNOLOGÍA VERDE** 171



7.1 Los microbios son comestibles *172* · **7.2** Algas y cianobacterias *172* · **7.3** La proteína *single cell*: la esperanza de las fuentes baratas de proteínas *174* · **7.4** La micoproteína tiene éxito como proteína vegetal para el consumidor *175* · **7.5** ¡La biotecnología "verde" *ante portas*! *178* · **7.6** El campo en un tubo de ensayo: cultivo de plantas *in vitro* *178* · **7.7** El cultivo de meristemos *179* · **7.8** Cultivos haploides: anteras y ovarios *180* · **7.9** Cultivos de callos y en suspensión *181* · **7.10** Las células vegetales en un biorreactor producen principios activos *183* · **7.11** ¿Qué principios activos vegetales seguirán a la shikonina? *184* · **7.12** *Agrobacterium* –Un parásito como ingeniero genético *185* · **7.13** Transferencia genética biolística: un disparo de DNA *185* · **7.14** Plantas transgénicas: resistencia a los herbicidas *188* · **7.15** Insecticidas biológicos *189* · **7.16** Claveles azules y tomates "antifofos" *193* · **7.17** ¿Son peligrosos los alimentos genéticos? *194* · **7.18** Hay que identificar a los alimentos genéticos? *195* · **7.19** *Gene-Pharming* (granja de producción genética) *195* · **7.20** Plantas transgénicas –Un debate acalorado *198* · **7.21** ¿Palmeras tropicales en Alemania? *198* · **7.22** Las bacterias de los cañones de nieve aseguran las vacaciones de esquí *200*

EMBRIONES, CLONES Y ANIMALES TRANSGÉNICOS 203

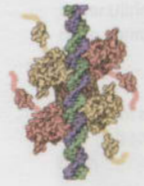
Capítulo 8



8.1 Inseminación artificial *204* · **8.2** Transferencia embrionaria y fecundación artificial *204* · **8.3** Las especies en peligro de extinción y amenazadas se pueden salvar mediante la transferencia embrionaria *205* · **8.4** Las quimeras tienen como mínimo cuatro padres genéticos *206* · **8.5** Animales transgénicos: ¿del ratón gigante al toro gigante? *207* · **8.6** Hormonas del crecimiento para bovinos y cerdos *208* · **8.7** *Gene-Pharming*: valiosa proteína humana a partir de huevo y leche *209* · **8.8** Peces transgénicos: del *GloFish®* a la trucha gigante *211* · **8.9** Ratones *knock out* *214* · **8.10** Xenotrasplantes *215* · **8.11** Clonación –Producción masiva de gemelos *215* · **8.12** Clonación de salamandras y ranas *219* · **8.13** Dolly –El descubrimiento decisivo en la clonación *219* · **8.14** Dificultades de la clonación *221* · **8.15** Clonación de gatos –Las diferentes variantes de progenitores *222* · **8.16** ¿Y el ser humano? Clonación, FIV y DPI *223* · **8.17** El embrión cristalino y el proyecto del genoma humano *224*

INFARTO DE MIOCARDIO, CÁNCER Y CÉLULAS MADRE – La biotecnología roja como medio para salvar vidas 227

Capítulo 9



9.1 El infarto de miocardio y los anticoagulantes *228* · **9.2** La fibrinólisis después del infarto de miocardio: disolución enzimática de los coágulos *228* · **9.3** La embolia: una enzima de vampiro sirve de ayuda *229* · **9.4** Factor genético VIII –Una ayuda segura para la hemofilia *232* · **9.5** EPO para enfermos de riñón y deportistas *234* · **9.6** El interferón contra los virus y el cáncer *234* · **9.7** La interleuquina *238* · **9.8** Cáncer: crecimiento celular anormal incontrolado *238* · **9.9** Nuevas terapias contra el cáncer *239* · **9.10** El paclitaxel contra el cáncer *242* · **9.11** La hormona del crecimiento humana *243* · **9.12** La hormona del crecimiento epidérmico –Desaparecen las arrugas y se curan los pies diabéticos *243* · **9.13** Las células madre: ¿la fuente de juventud decisiva? *244* · **9.14** Terapia génica *248* · **9.15** ¿Diamantes en la basura? El RNAi, el RNA que interfiere *249*

BIOTECNOLOGÍA ANALÍTICA Y GENOMA HUMANO 253

Capítulo 10



10.1 Pruebas enzimáticas para millones de diabéticos *254* · **10.2** Biosensores *254* · **10.3** Sensores microbianos: las levaduras miden la carga de los vertidos en cinco minutos *256* · **10.4** Prueba inmunológica del embarazo *257* · **10.5** Pruebas del sida *258* · **10.6** Pruebas para el infarto de miocardio *259* · **10.7** Pruebas *Point-of-Care* (POC) *260* · **10.8** Cómo se analiza el DNA: la electroforesis en gel separa los fragmentos de DNA según su tamaño *260* · **10.9** Vida y muerte: huellas dactilares genéticas para aclarar la paternidad y el asesinato *261* · **10.10** Marcadores de DNA: breves repeticiones en tándem y SNP *263* · **10.11** La reacción en cadena de la polimerasa: el copiador de DNA *264* · **10.12** ¿Se despertará a los saurios y al mamut a una nueva vida? *265* · **10.13** Cómo se secuencian los genes *268* · **10.14** *Southern Blotting* *268* · **10.15** Secuenciación automática de DNA *269* · **10.16** FISH: localización en cromosomas y cantidad de copias genéticas *270* · **10.17** La coronación de la biotecnología: el proyecto del genoma humano *273* · **10.18** Mapas genómicos genéticos *274* · **10.19** Mapas genómicos físicos *274* · **10.20** La lucha de los métodos: Contig contra escopeta *275* · **10.21** ¿Cómo se continúa con el genoma humano? *276* · **10.22** ¿Cómo se puede entender la secuencia genómica? *278* · **10.23** La farmacogenómica *279* · **10.24** Chips de DNA *280* · **10.25** Descubrir las causas de las enfermedades: perfiles de expresión genética *281* · **10.26** La proteómica *281* · **10.27** MALDI: Un gas de iones de proteínas *282* · **10.28** Aptámeros y chips de proteína *282* · **10.29** ¿Finalmente el control a través del genoma humano? *283* · **10.30** ¿*Quo vadis* biotecnología? *283*

CRÉDITOS DE LAS ILUSTRACIONES 287

ÍNDICE DE NOMBRES PROPIOS 289

ÍNDICE ALFABÉTICO 291

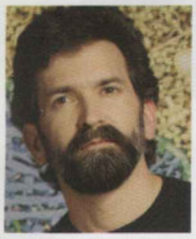
Introducción



El autor, tras los experimentos de clonación con los gatos Fortuna I, II, III y IV



Darja Sübbier con el gato Asmar Khan



David Goodsell, gráfico molecular, se confiesa practicante de yoga y visionario de nanobiotecnología

¡Nadie lee las introducciones largas! Así pues, corto: ¿Por qué se originó este libro?

De la **curiosidad y entusiasmo**. Ya cuando era un joven, leía todo lo que el mundo me aportaba. Hoy, como científico, la biotecnología es para mí sobre todo el tema más excitante, pues ¡trata de nosotros y de nuestro futuro! ¿Qué puede ser más excitante?

De la **adicción a todo el saber**. Al leer determino que "sólo sé, que no se nada", como dijo Sócrates. Me hubiera gustado ser un erudito universal, como fueron algunos científicos del Renacimiento. Pero esto es actualmente del todo imposible. Conseguir tener una visión general sobre un tema, es ahora aún razonablemente viable. Pero para ello se necesita el trabajo en común con investigadores especialistas en temas próximos. Al comprender esto, me uní dos exitosos "Olivers": Oliver Kayser de Berlín (ahora en Groningen) y Oliver Ullrich de Hamburgo. Ambos cubren una vasta área del conocimiento, leyeron todo el libro e hicieron grandes contribuciones. ¡Gracias! Cuando el tema era complejo, he consultado a varios expertos y he comprimido sus opiniones (a menudo muy resumidas) en Cuadros. Los nombres de estos expertos se encuentran en la página VI. Les estoy agradecido de todo corazón. ¡Espero no olvidar a nadie!

De la **pereza**. Desde hace diez años enseño Biotecnología analítica y Química en Hong kong. Mis estudiantes de Química chinos no saben casi nada sobre fabricación de cerveza, enzimas de detergentes, DNA, bacterias comedoras de aceite, "arroz dorado", GloFish@, infarto de miocardio o del proyecto del genoma humano. Así, mis seminarios tendían a consumir mucho tiempo en desviaciones hacia temas biotecnológicos. La propuesta de una bibliografía de 88 libros no era útil. ¡Los estudiantes querían tener un solo libro! Ahora puedo decirles: "¡Comprad y leed mi libro, que cubre todo lo que necesitas saber!"

De la **diversión**. "La creatividad lo es todo", dijo Picasso. Convertir este nuevo tipo de libro de texto en un realidad con la ayuda de Darja Sübbier, que para mi es la mejor "artista bio-gráfica" de Alemania, fue una enorme diversión. Todas mis ideas –a veces espontáneas o inmaduras– se consolidaron y transformaron en maravillosos gráficos. Cualquier otra artista gráfica se habría perdido con mi desorden. ¡Gracias, Dascha!

Que David Goodsell en La Jolla hubiera contribuido al libro con sus estupendos gráficos moleculares, fue para mi un sueño, que se hizo realidad. Como me aburrió el recuento de los átomos de carbono del taxol, Francesco Bennardo de Italia le dio un empujón y por arte de magia en una noche creó los modelos espaciales de las moléculas más importantes. ¡Todo esto ha sido una gigantesca diversión!

De la **adicción a imágenes**. En Asia se representa tradicionalmente todo de forma ilustrada. Durante una búsqueda de imágenes en Google me embriagaron las figuras de Biotecnología. La editorial en principio se aterrorizó al ver cómo a partir el "blanco del bonito libro de texto en dos colores" se convirtía gradualmente en una explosión de color. ¡Apenas han quedado algunas zonas blancas!

Un problema fue conseguir los derechos de tantas ilustraciones. Sin embargo, casi todos los propietarios de los derechos reaccionaron positivamente. La editorial-Ringier me cedió generosamente todos los derechos de la anterior editorial-Urania en Leipzig en mi primer libro "Bio-Horizonte". El virus del escritor de libros ha interaccionado con el lector en jefe de la Urania, Bernd Scheiba: "¡Quien escribe, se queda!"

Algunas empresas, como la GBF Braunschweig, la Roche Penzberg, Degussa, la red Transgen y Bioseguridad han dado el visto bueno a docenas de imágenes, mi servidor ha disfrutado con mails de 10-Megabites. Larry Wadsworth de Texas me ha mandado fotos de todos los animales clonados. Si olvidé citar o conseguir a alguien como autor de las imágenes, por favor informadme. ¡No fue debido a un enfado!

El lector notará seguramente también mis propias fotografías: gatos, aves, ranas, delfines, comidas y bebidas, China y Japón –todo se fotografió para ser utilizado en el libro de Biotecnología. Espero que a usted no le moleste verme a mi en mis experimentos en lugar de a un modelo profesional.

De la **furia de la comunicación**. No había nada más maravilloso que sentarse por la mañana, con una taza de café, frente a una vista del mar de China Meridional, abrir el ordenador portátil y mirar los mensajes que me habían enviado por la noche. Encontraba algunas noticias importantes sobre biotecnología, otras no tanto, o recibía nuevos diseños que me enviaba Dascha desde Berlín. Definitivamente viajaron diez mil correos de aquí para allá, ¡y todo el tiempo fue como en Navidad! Gracias, Internet, sin ti el libro no se habría creado. ¡Me siento en una isla subtropical, presiono algunos botones y en Alemania aparece un hermoso libro! Julio Verne estaría impresionado.

¿Quién tuvo la **idea**? Fue Merlet Behncke-Braunbeck quien me prometió convertir mis ideas en un libro de texto. Esta altamente motivadora, efectiva y al mismo tiempo encantador equipo de conferenciantes con Imme Techentin-Bauer, Bärbel Häcker y Ute Kreutzer a veces en voz baja evadieron seguramente, si debía cambiar de lugar o "ampliar" de nuevo durante la noche un capítulo entero, aunque siempre reconfortaron maravillosamente mi espalda y la de Dascha. ¡Gracias, queridas damas!

¿Cómo se puede utilizar este libro?

Como una **introducción** para estudiantes de institutos y universidades, para profesores, periodistas o simplemente para personas interesadas en la Biotecnología.

Como **libro de texto para estudiantes**. Se puede estudiar sistemáticamente todos los capítulos e intentar responder a las ocho preguntas que se encuentran al final de cada capítulo.

Para encontrar **experiencias**: El libro se puede hojear rápidamente, y espero que se sienta suficientemente intrigado e inspirado para buscar más información en otros libros especializados o en Internet.

Como **libro de referencia**: Puede ser el punto de partida para resolver una duda sobre biotecnología. Luego el lector puede buscar más información en Internet o en libros especializados.

¿Si esto va bien? A algunos colegas se les puede torcer sus narices. ¡El libro es un experimento! Odio los libros aburridos: los árboles han muerto en vano por ellos.

Me alegro de cualquier comentario de usuarios de este libro.
Mándenme un mail a: *chrenneb@ust.hk*

Reinhard Renneberg,



Oliver Ullrich con un ratón normal llamado Ollie ...



Oliver Kayser con su hijo y su hija



Historia de la Biotecnología: Francesco Bennardo disfrutando de un producto de la fermentación (flecha roja), por su efecto fue suspendido en las prácticas de orgánica. Francesco fuma hoy en día delante del ordenador y modela moléculas.

Cerveza, pan, queso –
Suculenta biotecnología

1.1 Al principio fue la cerveza y el vino: la leche materna de la civilización 2

1.2 Las levaduras son los burros de carga de la fermentación alcohólica 2

1.3 También hoy en la industria cervecera se utilizan levadura, agua, malta y lúpulo 5

1.4 Las células funcionan con energía solar 11

1.5 El alcohol no es un placer sino una necesidad para las levaduras 11

1.6 Los licores muy concentrados se producen mediante destilación 12

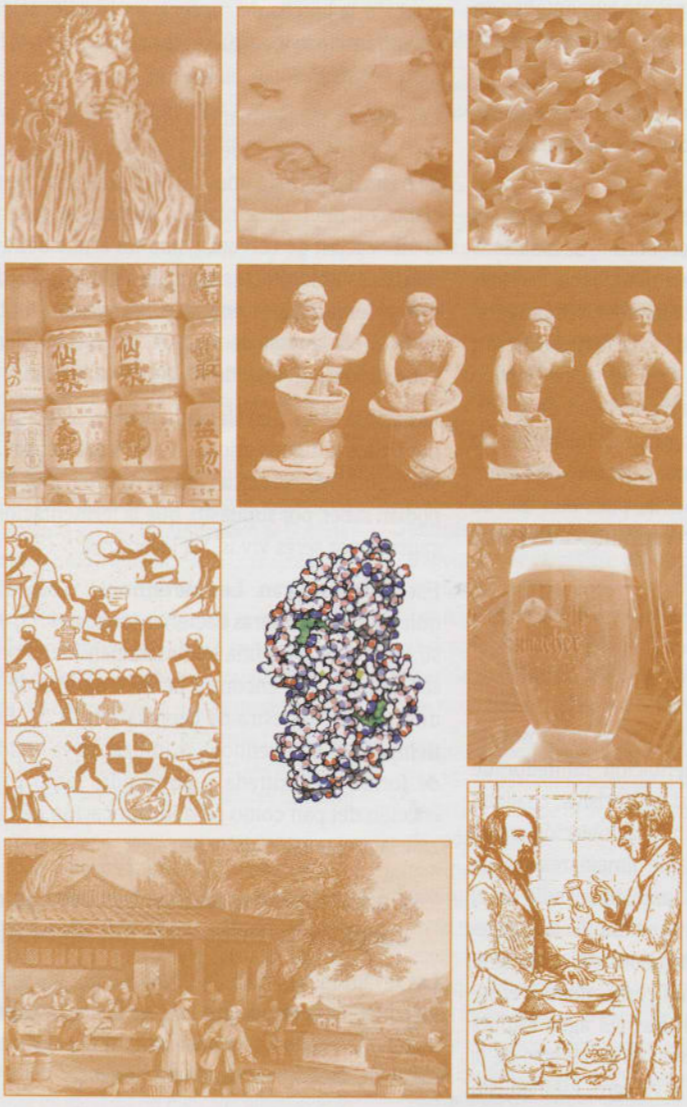
1.7 Productos bacterianos: ¡La acidez los hace duraderos! 15

1.8 Café, cacao, vainilla, tabaco – Fermentación para el placer 18

1.9 Los mohos cooperan con las bacterias y producen queso 18

1.10 Sake y salsa de soja 22

1.11 ¿Qué es en realidad la fermentación? 22



Capítulo 1



Fig. 1.1 Fabricación de cerveza en Egipto hace 4400 años.



Fig. 1.2 Estatuillas de mujeres haciendo pan hace 6000 años.





Fig. 1.3 Levaduras en un dibujo de Leuwenhoek (arriba) y bajo un moderno microscopio electrónico de barrido; claramente se ven los brotes de las células hijas.



Fig. 1.4 Fábrica de cerveza en la Edad Media.

1.1. Al principio fue la cerveza y el vino: la leche materna de la civilización

Ya hace 6000 a 8000 años los sumerios en Mesopotamia, el pedazo de tierra entre los ríos Éufrates y Tigris (hoy Irak), dominaron el arte de la preparación de la cerveza. De los cereales germinados produjeron una bebida nutritiva, duradera y embriagadora. Para ello humedecían cebada o trigo Emmer, una antigua forma del trigo, y llevaban el cereal a la germinación. En una tabla pintada sumeria, el Monument Bleu del Louvre en París, del tercer milenio antes de nuestro tiempo, se representan las conchas con Emmer para la preparación de cerveza. De los cereales germinados, la malta, se preparaba entonces el pan de cerveza, se desmenuzaba y se mezclaba con agua. Con un colador trenzado de mimbre se separaba el líquido del residuo y se dejaba en toneles cerrados. Muy pronto aumentaban en los recipientes las burbujas de gas y el líquido empezaba a fermentar.

Del jugo dulce se originaba, en condiciones anaeróbicas mediante **fermentación**, una bebida alcohólica, la cerveza.

Una parte del grano germinado se secaba al sol –esto corresponde al actual secadero– y se mantenía como mercancía duradera para tiempos sin cereales frescos. La cerveza babilónica tenía un sabor ligeramente agrio, que provenía de una **fermentación láctica** paralela escurrida. Con el ácido láctico aumentaba esencialmente la durabilidad de la cerveza, porque en medio ácido muchos microbios no pueden prosperar. En los climas calurosos de Oriente esto era de gran importancia, pues con ello se encontraba disponible una mezcla higiénicamente perfecta para disfrutar de ella.

El alcohol es azúcar fermentado, un producto final del metabolismo de las levaduras. Un 2 o 3 % de alcohol cambia la permeabilidad (fluidez) de la membrana citoplasmática de las bacterias e inhibe con ello su crecimiento. En los climas calurosos de Oriente, el medio de fermentación inhibidor de microbios es una ventajosa, si no decisiva, cualidad higiénica. Gracias a la agricultura la población creció enormemente. El agua potable limpia resultó de repente un problema, como también sucedió en el siglo XIX en Europa. Recordemos también las imágenes actuales de los rituales sagrados en el Ganges. Las heces animales y humanas contaminan y ensucian incluso hoy el agua potable. ¡El agua impura puede ser altamente peligrosa! Los productos de la fermentación, cerveza, vino y vinagre, estaban, sin embargo, exentos de gérmenes peligrosos. Incluso se podía preparar con agua potable ligeramente sucia, porque no sólo el alcohol sino también los ácidos orgánicos inhibían a los patógenos existentes. El agua no calmó, pues, la sed de nuestros antepasados, sino la cerveza, el vino y el vinagre. Ellos fueron, por así decirlo, la "leche materna de la civilización". La biotecnología más antigua del mundo era nutritiva, estimulante y también segura –un avance revolucionario, que debió ser sencillamente favorable.

También los egipcios prepararon cerveza. Una antigua pintura de la pared de un santuario egipcio de hace 4400 años muestra el proceso de fabricación del producto (Fig. 1.1).

Los egipcios ya sabían que la fermentación empezaba más rápido si se utilizaban de nuevo los restos de una cerveza próspera. Las cervezas egipcias eran principalmente oscuras; se preparaban de panes de cerveza tostados. Algunas tenían un contenido de alcohol del 12 al 15 %. Los egipcios descubrieron también la botella de cerveza: en la edificación de una pirámide se repartía cerveza en jarras en el lugar de la construcción.

Los celtas y los germánicos prefirieron el aguamiel, una cerveza ácida, que se guardaba en recipientes de hasta 500 litros a unos 10 °C bajo tierra y se mezclaba con miel. Sin embargo, primero se desarrolló la fabricación de cerveza como un arte, cuando los monjes asumieron el tema en el siglo VI. Agradecemos al lema *liquida non fragunt ieunum* ("el líquido no viola la regla de ayuno") la especial fuerza y contenido de alcohol de las cervezas fuertes.

La palabra "bier" (en alemán *cerveza*) se debió obtener de los antiguos sajones *bere*, o sea cebada. Los fabricantes de cerveza prósperos del pasado no podían saber, por supuesto, que la fermentación era causada por seres vivos, las levaduras.

Fue **Antonie van Leeuwenhoek** (1632-1723) quien vio las primeras bacterias (cuadro 1.1), y con su microscopio de una lente también fue el primer ser humano que encontró perlas amarillas de levadura en una muestra de cerveza (Fig. 1.3). En los tiempos de Leeuwenhoek se utilizaban ya levaduras de forma concentrada y purificada, tanto para la cocción del pan como para la fabricación de cerveza y la preparación del vino.

1.2 Las levaduras son los burros de carga de la fermentación alcohólica

Las levaduras se cuentan entre los hongos (*fungi*), en concreto pertenecen a la clase de los hongos con micelio tabicado (*Ascomycetes*), el tipo más abundante de la clasificación de los hongos.

En contraste con las bacterias procariotas, los **eucariotas** (del griego *karyon*, núcleo) tienen una estruc-

Cuadro 1.1 Historia de la biotecnología: Leeuwenhoek

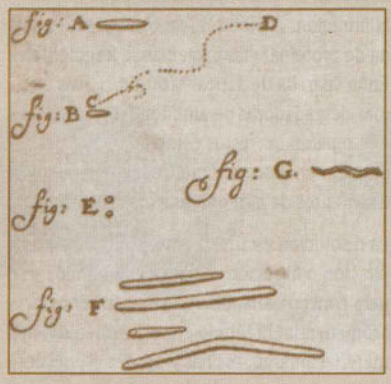


Antonie van Leeuwenhoek trabajando con su microscopio de una lente; con él ampliaba unas 200 veces.

"Teníamos un movimiento muy fuerte y rápido ante nosotros, y disparaban en el líquido como si fuese un humo espeso a través del agua. Estos seres vivos eran muy pocos en número. El segundo tipo tenía una forma como en B. Éstos giraban frecuentemente en círculos y tomaban entonces un movimiento como en C y D. Existían en grupos mucho mayores en número. Al tercer tipo no le pude dar una forma, porque por un lado parecían como un óvalo y por otro lado como un círculo. Eran tan pequeños que no los podía ver más grandes que como en la Fig. E y por ello zumbaban tan rápidamente en la confusión, que era como tener un gran enjambre de moscas o mosquitos ante mí.

Eran tan numerosos, como granos de arena, que creí ver mil en la mezcla de agua, o también en la saliva (disminuye con la materia mencionada), aunque había conseguido la muestra entre los dientes incisivos y las muelas. Principalmente constaba la materia de una cantidad de estructuras en forma de palo de longitudes muy diferentes y en cambio del mismo grosor, que se doblaban en ángulo, otras rectas, como en la Fig. F, que se disponían desordenadas en la confusión." (Fuente: Paul de Kruif, Cazadores de microbios, 1940.)

Con esta observación microscópica de su placa dental, un científico autodidacta, el mercader Sr. **Antonie van Leeuwenhoek** (1632-1723), abrió en la pequeña ciudad holandesa de Delft un nuevo mundo a la humanidad. Fue la primera persona que vio bacterias y las dibujó. Todo ello empezó cuando Leeuwenhoek observó de un fabricante de gafas en un mercado anual el arte de un pulidor de lentes. Con obsesión hasta la locura, empezó a pulir lentes de cristal cada vez más gruesas, hasta que alcanzó con su arte aumentos de 200 veces en el microscopio. Durante horas le pudo cautivar, bajo su microscopio de una lente, convertir un fino pelo de oveja en una gruesa soga.

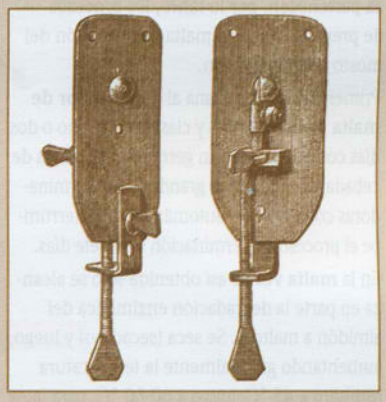


El primer dibujo de bacterias por Leeuwenhoek. Del publicista científico británico Brian F. Ford se analizó una imagen a través del microscopio de Leeuwenhoek. ¡Leeuwenhoek en realidad pudo ver espirilos (Fig. G)!

Un día, Leeuwenhoek tuvo la idea de investigar una gota de agua de una cuba de lluvia. No se sobresaltó poco cuando vio bajo el microscopio una multitud de pequeños seres vivos. Nadaban enérgicamente por todas partes y jugaban unos con otros, como le pareció a él. Los seres vivos eran, según Leeuwenhoek, tesoros mil veces más pequeños que el ojo de un piojo.

Por la presión de un amigo, Leeuwenhoek escribió en 1673 por primera vez una carta entusiasta en holandés a la agrupación más importante de científicos del mundo en ese momento, la Royal Society de Londres. Los hombres eruditos leyeron con asombro la descripción de la "miserable pequeña bestezuela", como denominó Leeuwenhoek a los raros animalillos.

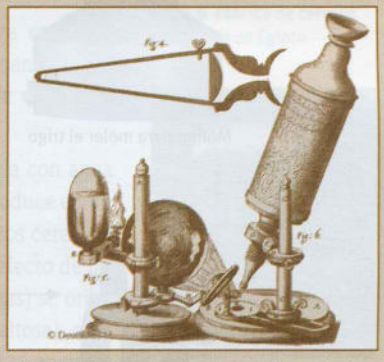
El investigador inglés **Robert Hooke** (1635-1703), como socio de la Royal Society era en ese tiempo responsable de cada encuentro para conocer a los que mostraban nuevos experimentos. Él mismo investigó con su microscopio de varias lentes en forma de corcho de botella, y con él descubrió una muestra ordenada regularmente de pequeños agujeros, que denominó "células". Hooke construyó con la información de Leeuwenhoek el microscopio de Holländer y pudo confirmar sus observaciones. No sospechó que los pequeños "animalillos" también constaban de células, o al menos de una única célula. Los científicos de la Royal Society se convencieron sólo con sus propios ojos de la existencia microscópica de seres vivos más pequeños. Las "miserables bestezuelas" provocaron su activo interés. Leeuwenhoek, que no había asistido a ninguna Universidad, fue escogido en 1680 por unanimidad como socio de la Royal Society, por su habilidad, curiosidad y resistencia más conseguidas que las de muchos científicos de su tiempo, que ante la pregunta de cuántos dientes tiene un burro consultaban en las escrituras del antiguo maestro griego Aristóteles antes que mirar en la boca de un animal gris.



Microscopio de Leeuwenhoek. Él fabricó aproximadamente 500 microscopios de una lente.

Reyes, príncipes y científicos de todos los países se interesaron en los descubrimientos de Leeuwenhoek. La reina de Inglaterra y Federico I de Prusia lo visitaron, así como el Zar de Rusia Pedro el Grande, que se detuvieron con nombres falsos en Holanda para estudiar la construcción naval.

Las "bestezuelas" maravillaron durante largo tiempo como curiosidad y luego pasaron de nuevo al olvido.



Microscopio de varias lentes de Robert Hooke, con el que investigó estrechos cortes delgados de corcho y describió las "células".

Cuadro 1.2 Las fábricas de cerveza actuales

La cerveza se hace en Alemania según se preparaba en Baviera ya en 1516 bajo la vigencia de la **ley de pureza** (véase pág. 21) a partir de cebada de malta, lúpulo y agua, y la adición de levadura.

Los cereales que contienen almidón no pueden fermentar directamente, sino que primero, mediante las **enzimas fragmentadoras de almidón (amilasas)**, deben convertirse en cereales germinados y activarlos a azúcar de malta (maltosa) y "romperlos" a azúcar de uva (glucosa). A la fabricación de la cerveza pertenecen, por lo tanto, los procesos de preparación de la malta, preparación del mosto y fermentación.

Primero, la cebada mana al **contenedor de malta** tras la limpieza y clasificación uno o dos días con agua. Se dejan germinar los granos de cebada a 15-18 °C en grandes cajas germinadoras con agitación automática y se interrumpe el proceso de germinación tras siete días.

En la **malta verde** así obtenida sólo se alcanza en parte la degradación enzimática del almidón a maltosa. Se seca (secadero) y luego, aumentando gradualmente la temperatura (primero a 45 °C, luego a 60-80 °C, para la cerveza negra hasta 105 °C), con agitación y agrupación se obtiene la **malta agitada**.

En la **fabricación de cerveza**, para la preparación del mosto, la malta cocida se remoja, es decir, se agita y se calienta con mucha agua. En la **malta remojada** se superan en fases de parada los procesos de degradación enzimáticos: a 50 °C las β-glucosidasas degradan el "material elástico", que impide la filtración. A 50-60 °C se consigue la "parada de proteína": las proteínas se fragmentan. En la "parada de azúcar" (60-74 °C) las enzimas degradadoras de almidón (α- y β-amilasas) separan los restos completamente del almidón en glucosa y maltosa, y se degradan fragmentos de almidón mayores (dextrinas).

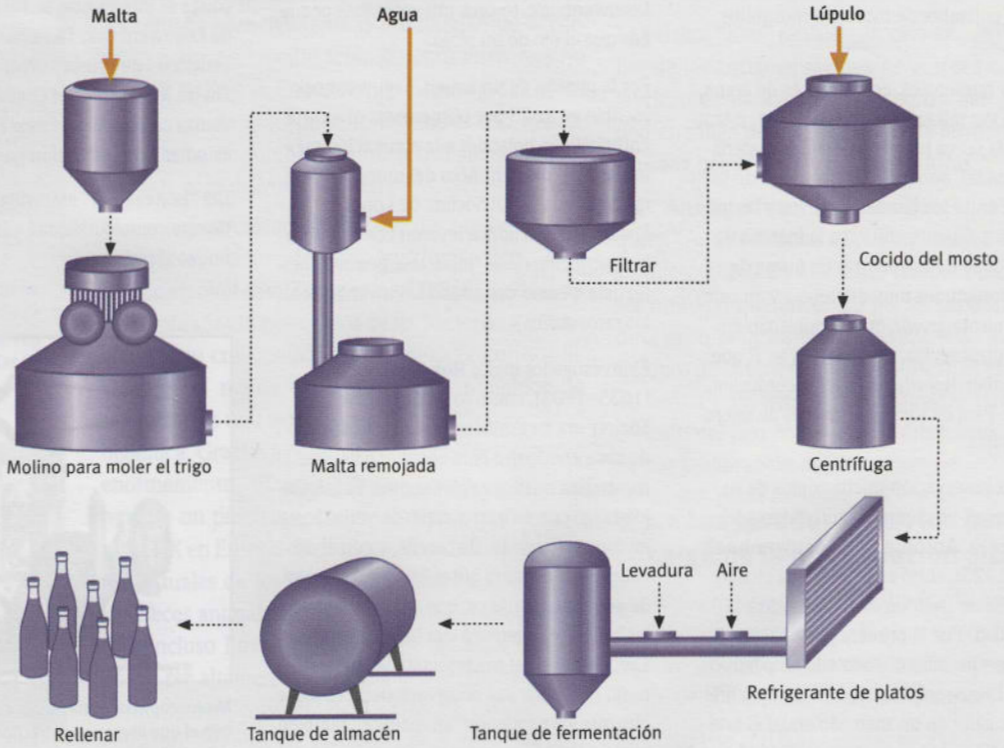
La disolución escurrida (**mosto**) tras la precipitación o filtración se cuece con lúpulo, para concentrarla, liberarla de gérmenes y aromatizarla. El lúpulo con su contenido en material amargo, resinas y aceites esenciales, aporta a la cerveza el sabor amargo estimulante y una mejor durabilidad.

El **contenido de mosto troncal** es el contenido en materiales solubles extraídos, como glucosa y maltosa, en gramos de sustancia seca por 100 gramos de mosto, y está estipulado claramente en la ley de la pureza de la cerveza: las cervezas sencillas contienen un 2 a 5,5 % de mosto troncal, las cervezas límite 7-8 %, las cervezas completas 11-14 % y las cervezas fuertes por encima de un 16 %. El mosto con lúpulo se rebaja y se filtra (se **purifica** en cubas de purificación). Las enzimas que fragmentan almidón se inactivan por cocción, de modo que en la posterior fermentación con levaduras sólo se degraden la glucosa y la maltosa, pero no los fragmentos de almidón cortos (dextrina) indeseados en la cerveza.

Tras el enfriamiento del mosto y la captación de oxígeno se produce la **fermentación mediante la levadura introducida** (trazas de cultivo purificado de *Saccharomyces cerevisiae*). La levadura necesita oxígeno para crecer y proliferar.

Las cervezas (Pilsen, de Dortmund y de Munich, Bock) son duraderas gracias a una lenta **subfermentación** (en 8-10 días), cervezas Lager que pueden ser enviadas, mientras que en una rápida **sobrefermentación** (4-6 días) se originan cervezas más ligeras. Subfermentados son todos los tipos de cerveza corrientes, y también la cerveza de barril. Sobrefermentadas son la cerveza blanca de Berlín, Kölsch y Alt, la cerveza Karamel, así como los tipos de cerveza inglesas Ale, Porter y Stout.

Para terminar se permite a la cerveza la maduración final en sótanos frescos y una posterior fermentación lenta durante varias semanas a 0-2 °C en barriles en almacén, de los cuales se rellenan barriles de envío o, tras la filtración, botellas.



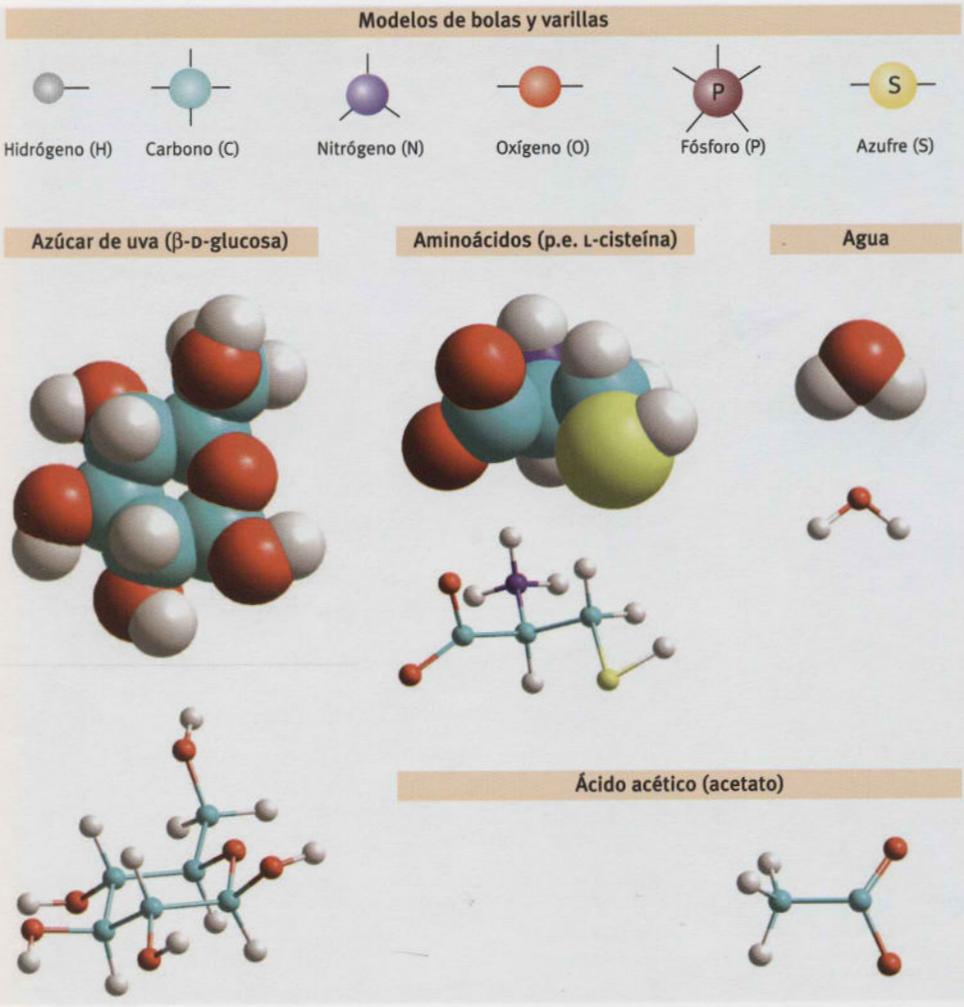


Fig. 1.5 En este libro se presentan los átomos y las moléculas en diferentes representaciones.

tura celular compleja (compartimentos como mitocondrias) y un **auténtico núcleo celular**. Se denominan también hongos productores de esporas, porque se multiplican sobre todo asexualmente (vegetativos) mediante esporulación. Sin embargo, también se pueden reproducir sexualmente por copulación de dos células esporas haploides. Éstos tienen una composición cromosómica completa simple. Las levaduras se clasifican según el tipo de reproducción de los diferentes tipos de hongos.

Las levaduras constan solamente de una única célula. Esta célula madre forma en la esporulación varias protuberancias, brotes hijos, que se separan, son a su vez viables y pueden formar nuevas células (Fig. 1.3). Crecen de modo heterótrofo (a partir de nutrientes, sin fotosíntesis) preferentemente a valores de pH ácidos. Su pared celular consta, como la sustancia del esqueleto de los insectos, de quitina, y además de hemicelulosa. La cerveza se origina mediante fermentación alcohólica a partir de los hidratos de carbono de las semillas de los cereales. Sin embargo, éstos se encuentran en gran parte como polisacáridos y están disponibles para las enzimas de la glucólisis de las células de la levadura (Fig. 1.15), si son degradados a disacáridos y monosacáridos por las amilasas.

1.3 También hoy en la industria cervecera se utilizan levadura, agua, malta y lúpulo

También hoy la fabricación de cerveza empieza, como ya hacían los sumerios con el germen de cebada, con su conversión en la **malta que contiene enzimas** (cuadro 1.2).

La malta se tritura entonces y se mezcla con agua templada. Esta **malta remojada** se introduce en un tanque, donde a partir del almidón de los cereales, que se guarda en los granos, gracias al efecto de las enzimas que degradan almidón (amilasas) se originan en unas horas azúcar de malta (maltosa), azúcar de uva (glucosa) y otros azúcares. Las enzimas que degradan la pared celular (**β-celulasas**) destruyen las envolturas externas de los granos de cereal,



Fig. 1.6 Fábrica de cerveza en el antiguo Egipto.



Fig. 1.7 Cerveza con burbujas de dióxido de carbono claramente visibles.

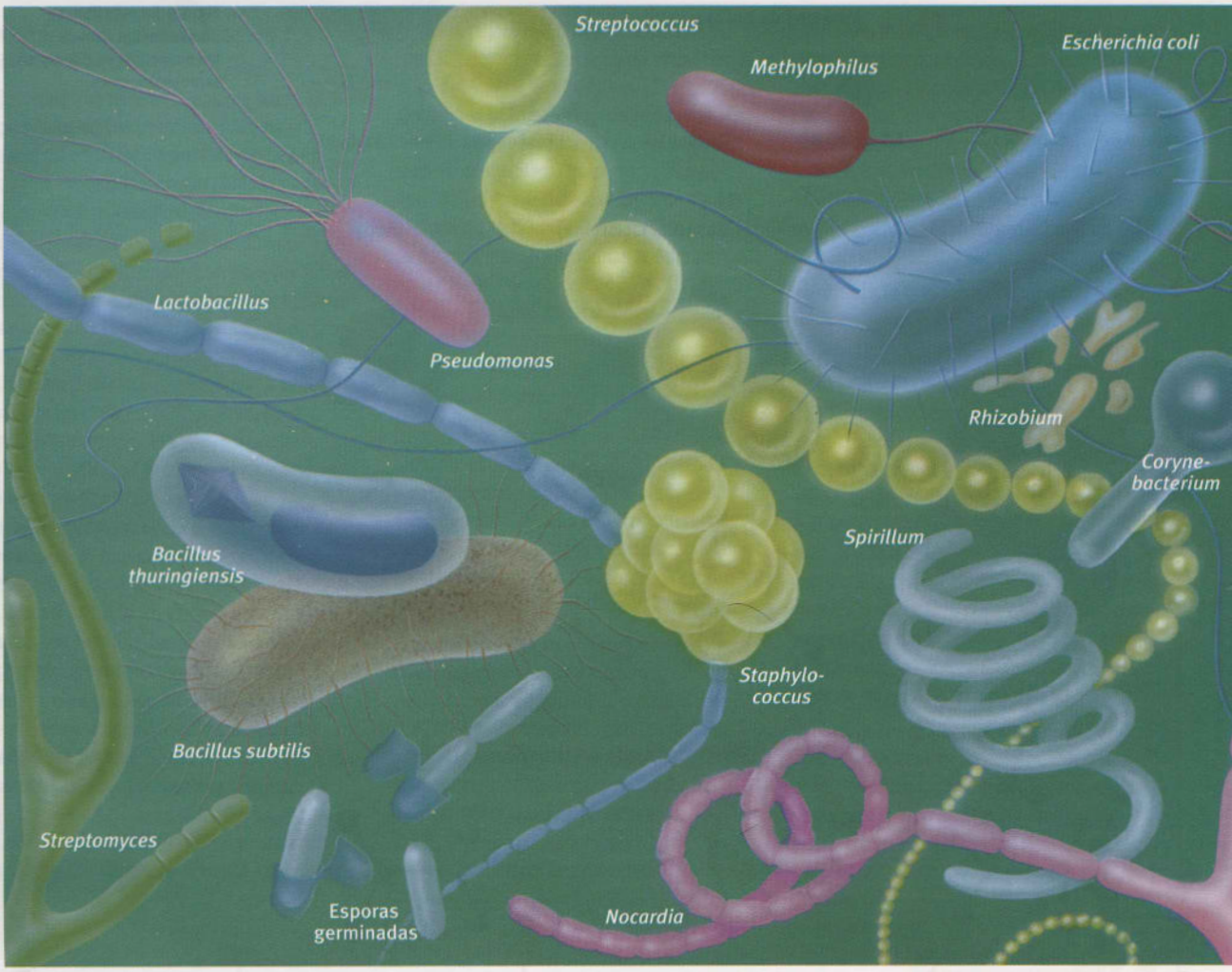


Fig. 1.8 Bacterias

Las bacterias son procariotas, es decir, su información genética no está localizada en un núcleo celular sino que se encuentra libre en el citoplasma como DNA de doble hebra en forma de anillo.

Les faltan los típicos orgánulos subcelulares de los eucariotas (levaduras, células de plantas y animales superiores), como las mitocondrias (para la respiración celular) o los cloroplastos (para la fotosíntesis) y el retículo endoplasmático.

Las bacterias viven predominantemente de modo heterótrofo, es decir, captan su energía de la materia orgánica. Sin embargo, también existen tipos que pueden captar energía fotosintéticamente o de enlaces inorgánicos (por ejemplo azufre).

Entre las bacterias hay unicelulares móviles e inmóviles (por ejemplo pequeños bacilos), pero también pluricelulares, por ejemplo asociaciones celulares del género *Nocardia* y redes similares a hilos de hongos (micelios) del tipo de *Streptomyces*.

La ilustración muestra las bacterias con importancia en biotecnología. Sus paredes celulares están construidas de manera diferente (Cap. 4). Por su coloración bajo el microscopio se distinguen las bacterias grampositivas de las gramnegativas.

A los **bacilos** y **cocos gramnegativos aeróbicos** pertenecen *Pseudomonas* (utilización de hidrocarburos, oxidación de esteroides) y *Acetobacter* (formación de ácido acético), *Rhizobium* (oxidación de nitrógeno) y *Methylophilus* (proteína unicelular, oxidación de metanol).

Los **bacilos gramnegativos anaeróbicos facultativos** son, por el contrario, las bacterias intestinales *Escherichia coli*, los "animales de compañía" del ingeniero genético.

Bacillus (producción de enzimas) y *Clostridium* (producción de acetona y butanol) pertenecen a los **bacilos** y **cocos grampositivos formadores de esporas**.

Los grampositivos en forma de maza del tipo *Corynebacterium* forman aminoácidos.

Los cocos grampositivos son los formadores de ácido láctico, como *Streptococcus*, *Staphylococcus* (intoxicación de alimentos), *Propionibacterium* (vitamina B_{12}, preparación de queso), *Nocardia* (oxidación de hidrocarburos) y estreptomicetos (antibióticos, enzimas).

Lactobacillus (formación de ácido láctico) se cuentan entre las **bacterias grampositivas no formadoras de esporas**.

Las bacterias producen un gran daño al causar enfermedades y estropear alimentos, pero sin embargo también tienen un enorme significado económico en los procesos biotecnológicos.

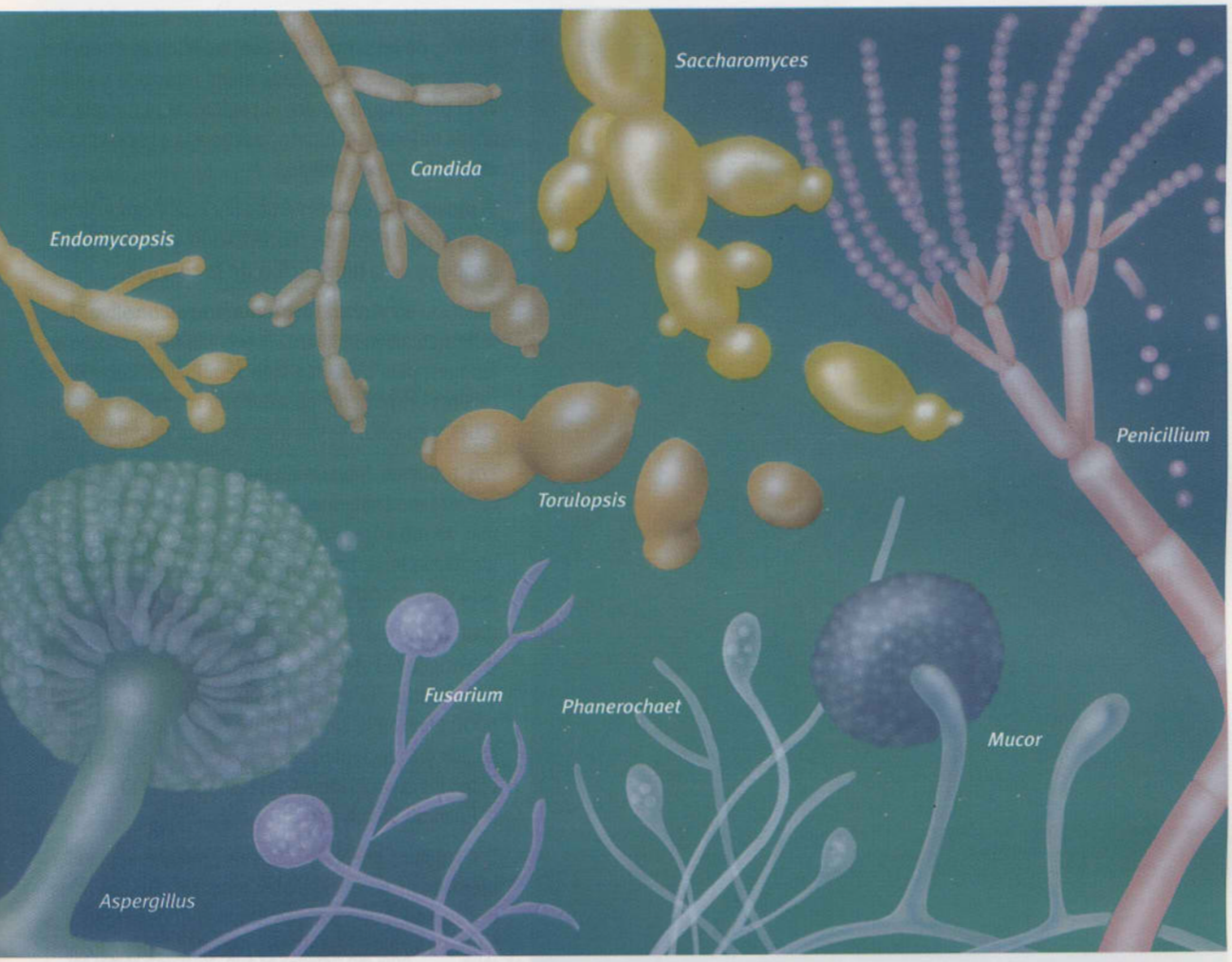


Fig. 1.9 Hongos
Los hongos desempeñan un papel destacado en los ciclos de la naturaleza, sobre todo en los procesos de degradación. Se han clasificado hasta ahora aproximadamente 70 000 hongos. Las **levaduras** pertenecen, como todos los hongos, a los eucariotas, es decir, su material genético está concentrado en un núcleo celular. Son **hongos productores de esporas (endomicetos)**.

A partir de levaduras salvajes se obtienen cultivos de levaduras que tienen un gran significado industrial, como las levaduras de cerveza (por ejemplo *Saccharomyces carlsbergensis*), levaduras de vino y de pan (*S. cerevisiae*) y levaduras del forraje (*Candida*). *Candida utilis* crece sobre las aguas residuales de sulfito de las fábricas de celulosa como levadura de forraje. *Candida maltosa* se alimenta de alcanos (parafinas) del petróleo y puede generar forraje. *Trichosporon cutaneum* es un importante aeróbico que se encuentra en aguas residuales, que incluso puede degradar fenol –un veneno para otros hongos. *Trichosporon* y la levadura *Arxula adeninivorans* se utilizan como sensores microbianos en aguas residuales (Capítulos 6 y 10).

Los **mohos** pertenecen a los **mohos con sacos esporales o esporangios en forma de manguera (ascomicetos)**, que con 20 000 tipos es el grupo mayor de los hongos. Tienen, en contraste con las levaduras redondeadas, largas células estiradas, y viven principalmente estrictamente aeróbicos. Los mohos forman esporas asexualmente mediante división de los núcleos celulares de los sacos esporales, que en general se expanden en el aire del micelio. Las esporas maduras se propagan con facilidad con el viento. Si caen en un sustrato apropiado, germinan y forman nuevos micelios.

Muchos hongos se clasifican según su apariencia (morfología) y el color de sus sacos esporales (esporangios), porque el micelio generalmente es difícil de distinguir, pues es incoloro y representa un desorden en forma de tubo. Puesto que los hongos más importantes industrialmente se introducen (sumergen) principalmente en tanques como grumos móviles de micelios, no forman esporas.

En cuanto a alimentación, los mohos son similares a las levaduras, aunque se tratan más versátilmente. Así, algunos pueden –en contraste con las levaduras– crecer también sobre celulosa (*Trichoderma reesei*) o lignina (*Phanaerochaete chrysosporium*) (Cap. 6).

Los mohos del género *Aspergillus* (mohos con esporangios en forma de regadera) y *Penicillium* (mohos con esporangio en forma de pincel) son la base para muchas fermentaciones, particularmente para la degradación del almidón y las proteínas en la cebada, el arroz y las habas de soja.

Aspergillus niger produce ácido cítrico. *Penicillium chrysogenum* es el productor de penicilina (Cap. 4).

Otros mohos con esporangio en forma de pincel generan quesos como el camembert y el roquefort. Las amilasas y proteasas generadas por hongos se obtienen también como preparados enzimáticos industriales (Cap. 2).

Endomycopsis y *Mucor* producen también enzimas industriales.

Fusarium se utiliza para la producción de proteínas para la alimentación humana ("Quorn", Cap. 6).

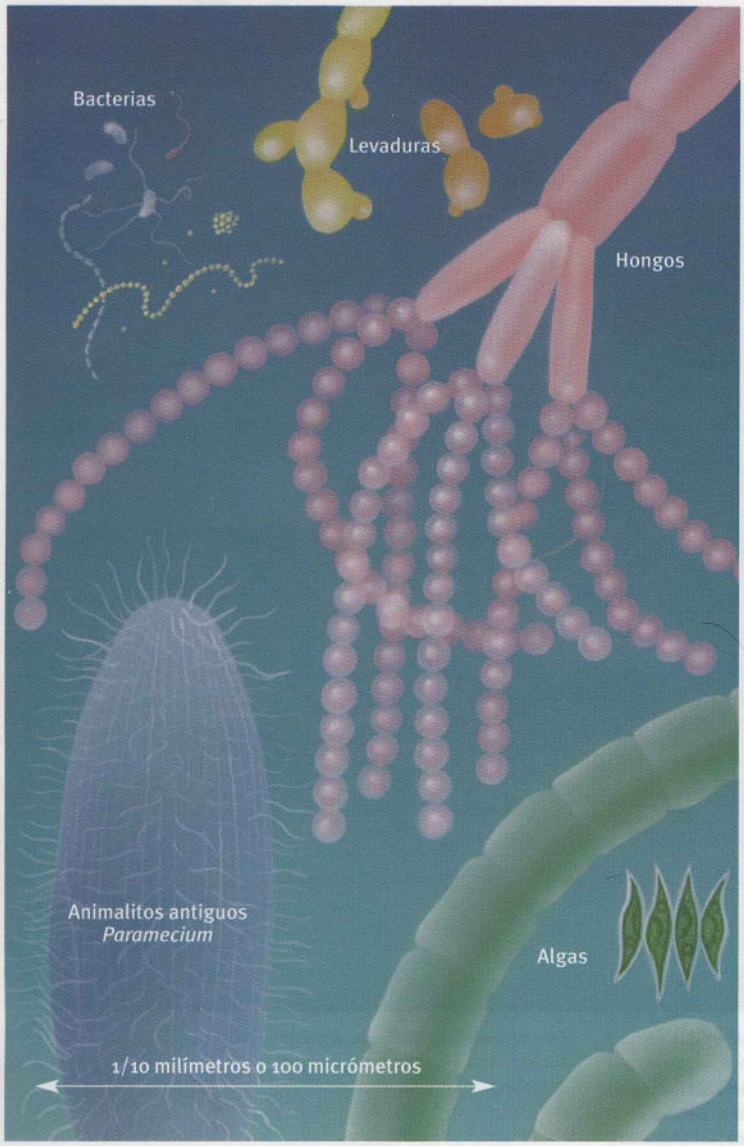


Fig. 1.10 Comparación de la medida de importantes microorganismos biotecnológicos. La longitud de los ciliados (*Paramecium*) indica el grosor de un pelo humano: 1/10 milímetros o 100 micrómetros.

para que la **α-amilasa** pueda atrapar el almidón del interior de las semillas. A continuación se filtran los componentes sólidos de la malta remojada y se lleva la parte líquida dulce al caldero de la mezcla. Se añade entonces el lúpulo, que aporta a la cerveza su sabor amargo especiado.

El **mosto** así creado es vertido por el fabricante de cerveza a un tanque de fermentación y se añaden las levaduras de la **fabricación de la cerveza**.

Entonces empieza la **fermentación alcohólica**. Tras la fermentación se guarda la cerveza algún tiempo en tanques, para madurar. Para terminar, la cerveza se calienta brevemente para destruir microbios perjudiciales, y entonces se vierte en botellas, latas o barriles.

Los procesos fundamentales en la fabricación de cerveza moderna son, pues, los mismos desde hace más de mil años. Pero entonces los seres humanos utilizaron los microorganismos inconscientemente para sus propósitos.

Casi todos los pueblos de la Tierra hicieron en la antigüedad descubrimientos similares a los de los sumerios. El **vino** se inventó seguramente hace 6000 años en la zona del monte Ararat. Sin embargo, los más recientes hallazgos remiten a los chinos como los descubridores del vino hace 9000 años, en la Edad de Piedra (cuadro 1.7).

Los antiguos griegos y romanos preferían el jugo fermentado de las uvas, el vino (cuadro 1.3). Los romanos fueron, pues, los que llevaron el desarrollo y la fabricación del vino al Rhin y Mosel. Del mijo, los africanos obtuvieron con *Schizosaccharomyces pombe* la **cerveza pombe**; el pueblo de la estepa asiática fermentó leche de yegua en botas de cuero para el **kumys**; los japoneses preparaban **sake**, una bebida

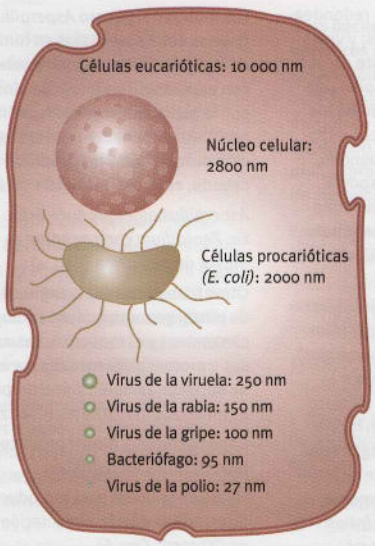


Fig. 1.11, derecha: Proporciones de células eucarióticas y procarióticas y virus.

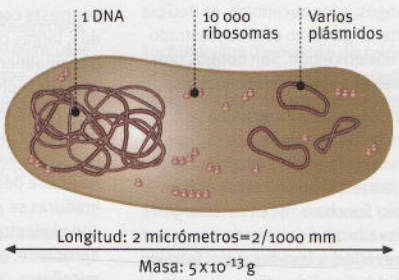


Fig. 1.12, derecha más allá: Una célula bacteriana (*Escherichia coli*) en cifras.

Número de moléculas y porcentaje en peso

Agua	10^{10}	80,0 %
Proteínas	10^6-10^7	10,0 %
Azúcar	10^7	2,0 %
Lípidos	10^8	2,0 %
Aminoácidos y ácidos orgánicos	10^6-10^7	1,3 %
DNA	1	0,4 %
RNA	10^5-10^6	3,0 %
Materia inorgánica	10^8	1,3 %

Cuadro 1.3 Vino y licores

Para la preparación del vino primero se aplastan las uvas en las prensas. En la fabricación del vino blanco sigue enseguida el **prensado** (prensas) o el pisado, y el jugo (mosto) se separa de los tallos, las pieles y los granos (como residuo, denominado orujo). La adición de **pectinasas** (Capítulo 2) incrementa el rendimiento del jugo considerablemente y conduce a un mosto más claro. En la producción de vino **tinto** se mantiene sin separar el prensado directo del fermentado principal, pues el colorante de las antocianinas está localizado principalmente en las pieles de las uvas rojas y azules, y pasan a la disolución con la formación de alcohol. Por ello este prensado se separa tras 4 o 5 días en reposo.

La fermentación tiene lugar a través de la parte exterior de los granos de uva por las bacterias encargadas de ello o por la inocuidad y calidad tras una anterior pasteurización mediante la adición de cultivos purificados de **levadura** (cepas de *Saccharomyces cerevisiae*). El proceso transcurre con una enorme formación de espuma. El "mosto del vino" así originado, que nubla las células de levadura, en algunas zonas es apreciado como bebida. Durante los cuatro a ocho días que dura la **fermentación principal** se utiliza casi el azúcar total. Las proteínas y pectinas se segregan en forma insoluble y se unen con las levaduras como almacenadoras de los restos descritos, que se separan del vino. En el primer año, en una lenta posfermentación en las frías bodegas fermenta aún el azúcar restante (crecimiento); entonces se origina un segundo almacenamiento. Simultáneamente se forman en el vino los materiales aromáticos que originan el bouquet (aroma, flores). El vino joven disponible tras la terminación de la fermentación se tapa herméticamente, antes de rellenar los barriles de almacenamiento ensulfatados, en los cuales (de vez en cuando con aireación temporal) se consigue su **maduración**. Durante este tiempo empieza también el tratamiento en la bodega. Éste sirve en primera instancia para aumentar la durabilidad (por ejemplo mediante azufre, pues el dióxido de azufre es más venenoso para las bacterias que para las levaduras) y la clarificación. Los principales vinos tienen un contenido en etanol entre el 10 y el 12%.

Un proceso más importante es la **degradación del ácido málico (malato)**, mediante bacterias lácticas, a ácido láctico (lactato) esencialmente débil. Sin esta *fermentación malo-láctica* los vinos alemanes, debido a su alto contenido ácido (de 8 a 10 g/L), no podrían beberse.

La **diferenciación de los vinos** tiene lugar según el color (principalmente vino blanco y tinto), el origen y el tipo de vid (por ejemplo Riesling, Trollinger, Spätburgunder, Silvaner). El **contenido restante de azúcar** se produce interrumpiendo la fermentación o la adición del mosto: seco (max. 9 g/L), semiseco (max. 18 g/L) y dulce (más de 18 g/L). Los **vinos reforzados**, como Madeira, Jerez, Oporto o Vermut, son vinos a los cuales se añade azúcar, etanol y a veces hierbas. Los microbios no intervienen para nada.

El **champán y otros vinos espumosos** requieren una fermentación doble. Se incluye deliberadamente CO_2 dentro de la botella. A una mezcla de vino blanco se le añade jarabe de azúcar y se rellenan botellas tapándolas especialmente fuerte con corchos. Las botellas se almacenan en un estante (púlpito), donde el vino puede fermentar lentamente. Una levadura de champán especial crece en la botella. Durante meses se dejan depositar lentamente, con las botellas boca abajo. Las levaduras y los residuos se almacenan entonces sobre el corcho. En ese momento se reemplaza rápidamente el corcho y se añade jarabe de azúcar y brandy. Así se origina un vino noble duradero, que gotea con lágrima fina durante largo tiempo después de abrirlo. En el **vino espumoso**, en cambio, se añade CO_2 bajo presión a un vino tranquilo.

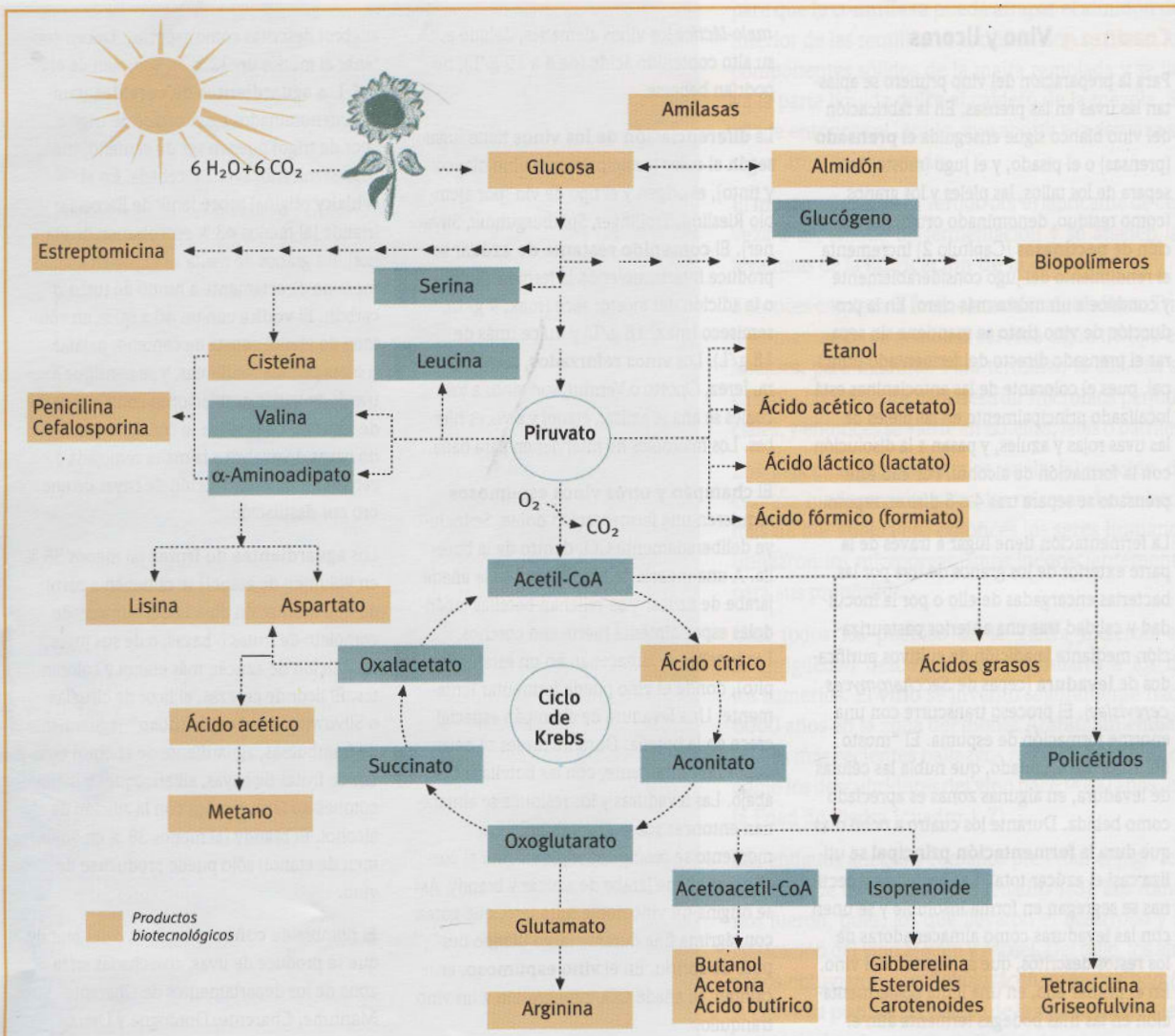
Entre los **espirituosos** (del latín *spiritus*, espíritu) se encuentran los aguardientes, licores, ponches y bebidas mezcladas (cócteles). Son bebidas ya fermentadas, como el vino o productos de féculas, o bien disoluciones de azúcar, como zumo de fruta o melazas, que después de la fermentación se procesan hasta licor, es decir, se destilan. En los denominados licores nobles (brandy, coñac, ron, arrak, whisky, genciana, ginebra y licores de frutas) permanecen los productos originados junto al etanol (éster, alcoholes superiores, aldehídos, ácidos, acetato, etc.), debido a su sabor aromático agradable, completamente o en parte en el destilado. Si se fermentan productos fuertes, se origina poco alcohol.

Las **bebidas aguardientes** habituales se producen en general simplemente por rutas frías mediante mezclas de licores primarios con agua y con determinadas sustancias sabrosas (por ejemplo anís, hinojo, comino, enebro) descritas como especias. Deben contener al menos un 32 % en volumen de etanol. Los **aguardientes de cereales** (también denominados aguardiente de trigo o licor de trigo) pueden ser de centeno, trigo, trigo sarraceno, avena o cebada. En el **whisky** original procedente de Escocia o Irlanda (al menos 43 % en volumen de etanol), los granos de malta se exponen a menudo directamente a humo de turba o carbón. El **vodka** con un 40 a 60 % en volumen de etanol consta de centeno, patatas u otras plantas feculentas, y se consigue a través de varias destilaciones contracorriente de afrecho. La ginebra se consigue añadiendo bayas de enebro a la malta remojada de cereales o de la extracción de bayas de enebro por destilación.

Los **aguardientes de frutas** (al menos 38 % en volumen de etanol) se obtienen a partir de una destilación directa del fermentado completo de frutas o bayas, o de sus jugos, sin adición de azúcar, más etanol y colorantes. El licor de cerezas, el licor de ciruelas o Slivowitz, y el **"espirituoso"** (aguardiente de frambuesas, aguardiente de enebro) constan de frutas de bayas, albaricoques y melocotones no fermentados con la adición de alcohol. El brandy (al menos 38 % en volumen de etanol) sólo puede producirse de vino.

El nombre de **coñac** es exclusivo del brandy que se produce de uvas, cosechadas en la zona de los departamentos de Charente-Maritime, Charente, Dordogne y Deux Sèvres. El **ron** se obtiene del jugo y de los remanentes de la caña de azúcar mediante fermentación y destilación (contenido medio de etanol 38% en volumen). El producto de partida para el **arrak** es arroz o el jugo de dátiles de palmera.

Para obtener **licores**, los espirituosos se tratan con azúcar y determinados productos aromáticos, maceración o destilación con plantas y frutas. Los **ponches** (del hindú *panscha*, cinco) son preparaciones calientes con cinco ingredientes: etanol, condimentos, zumo de limón, azúcar y un poco de té o agua. Los cócteles (en inglés **cocktail**, cola de gallo), bebidas mezcladas que contienen etanol, estimulantes del apetito, reciben su nombre de la guerra de la independencia americana. Entonces se esforzaban en colocar diferentes tipos de líquidos sin mezclar unos sobre otros, de modo que la bebida se asemejaba a una magnífica cola de gallo.



Cuadro 1.4 Cómo se transforma la glucosa

La degradación de la glucosa (**glucólisis**) empieza en la célula con un traslado enzimático de un grupo fosfato del cofactor adenosina trifosfato (ATP) (Fig. 1.15). Esta transformación utiliza energía. En los siguientes pasos, la energía se libera de los productos.

Se forman los **cofactores nicotinamida adenina dinucleótido** (**NADH**) y **ATP**. Los cofactores son importantes productos de ayuda regenerables para enzimas (véase Cap. 2). Los seis átomos de carbono originales que contiene la molécula de glucosa por degradación enzimática se fragmentan en dos partes; finalmente se origina **piruvato** (ácido pirúvico) de glucosa, tras una secuencia de reacciones enzimáticas.

El piruvato desempeña un papel central en el metabolismo. La parte principal del piruvato se oxida y se libera "ácido acético activado" (acetil-coenzima A). Con ello se origina también por primera vez un producto final de la combustión de glucosa: **CO_2**. Ahora quedan en el acetil-coenzima A sólo dos átomos de carbono. Una pequeña cantidad de piruvato se convierte en oxalacetato. Con esta pequeña cantidad de oxalacetato empieza el denominado **ciclo de Krebs** (por su descubridor, el bioquímico alemán emigrado a Inglaterra y ganador del premio Nobel Sir Hans Krebs), también denominado ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en el cual los dos átomos de carbono del acetil-coenzima A entran en un ciclo y se oxidan a dos moléculas de CO_2. Los productos intermedios del ciclo de Krebs, como el ácido cítrico, están disponibles normalmente a concentraciones menores; se decide en un equilibrio de flujos (Cap. 4). En la degradación de glucosa, la deshidrogenación (pérdida de hidrógenos) libera energía. Para ello interviene el cofactor oxidado NAD^+, sobre el cual se transfiere el hidrógeno con el tiempo. Sin embargo, el cofactor reducido (NADH) debe "liberar" hidrógeno de nuevo, porque si no no podrían producirse las reacciones de degradación de glucosa que liberan energía. Esto ocurre mediante reacciones enzimáticas en las mitocondrias, en la denominada **cadena de respiración**. En la cadena de respiración, el hidrógeno del NADH lo utiliza la enzima **citocromo oxidasa** (Fig 1.14 y Cap. 2), descubierta por Otto Warburg, para quemar hidrógeno con una elevada obtención de energía "fría" a agua. Con ello se obtiene energía.

alcohólica de arroz; los rusos **kwass** con tipos de *Lactobacillus* y el moho *Aspergillus oryzae* para azucarar.

Hasta hoy la **producción del vino** (Cuadro 1.3) ha cambiado sólo un poco: de uvas rojas y blancas, tras la vendimia se obtiene por aplastamiento y presión (prensas de vino) jugo de uva. Este jugo filtrado fermenta en barriles cerrados. Antes eran barriles de madera, hoy se utilizan tanques de metal con capacidad de hasta 250 000 litros. Mundialmente se producen cada año alrededor de quinientos millones de hectolitros.

1.4 Las células funcionan con energía solar

Diariamente la esfera incandescente del Sol manda cuatro miles de billones de kWh de energía a la Tierra. El Sol, por consiguiente, cada 30 minutos suministra gratis la energía que utilizan todos los habitantes de la Tierra juntos en un año. Sólo tres milésimas de esta energía solar se transforman en energía química mediante fotosíntesis en las plantas verdes.

El agua, con la ayuda de un cuanto de luz energético, se destruye en los cloroplastos de las células (Cap. 7) en sus componentes oxígeno (anualmente 100 000 millones de toneladas) e hidrógeno, y solamente el oxígeno se libera en forma molecular, gaseosa. Lo utilizan todos los seres vivos que respiran para la "combustión fría" de las sustancias. El hidrógeno liberado en la fotosíntesis, en cambio, se estabiliza en un tiempo breve mediante el enlace anualmente con 200 000 millones de toneladas de carbono y se une temporalmente a hidratos de carbono (azúcares).

Los **hidratos de carbono** son productos cuantitativamente habituales en la fotosíntesis y, por ello, son la fuente de energía para los principales seres vivos.

Con la respiración, el hidrógeno se separa de nuevo de su unión a la materia carbonada y se libera gradualmente en una "reacción de explosión gaseosa bioquímica" produciendo energía en la cadena de respiración. Al final, ¡toda la energía viene del Sol!

Las células necesitan, tanto durante el crecimiento como en el estado de reposo, un suministro permanente de energía, que se obtiene mediante el intercambio dirigido de las sustancias dentro de las células (**metabolismo** o **intercambio de materia**). Las fuentes de energía son los alimentos ingeridos. Se transforman mediante una serie de reacciones enzimáticas dispuestas una tras otra en rutas metabólicas.

Así originan los **componentes** y la **energía** para las síntesis y otros procesos complejos energéticos: primero los alimentos se degradan en pequeños trozos y se transforman en compuestos de bajo peso molecular, a partir de los cuales se construyen los componentes de la célula: azúcar de uva (glucosa), aminoácidos, nucleótidos (bases pirimidínicas y purínicas y azúcares-fosfato), ácidos orgánicos y lípidos.

A partir de ellos se construyen las "enormes moléculas" de las proteínas, los ácidos nucleicos y los componentes de la pared celular.

Puesto que los hidratos de carbono son cuantitativamente los productos habituales de la fotosíntesis, y con ello, al mismo tiempo, el alimento para la mayoría de los seres vivos, salen en primer lugar de la **glucosa** (azúcar de la uva). De la misma manera en que la producción de muchos productos de biotecnología depende de la degradación de glucosa en las células.

1.5 El alcohol no es un placer sino una necesidad para las levaduras

Pasemos ahora a la bioquímica, para responder a una "pregunta vital" de las células de levadura. Las levaduras pueden vivir como **respiradores (aeróbicos)** o **fermentadores (anaeróbicos)**, y por lo tanto son aeróbicos facultativos. En presencia de oxígeno las levaduras crecen espléndidamente, con la respiración convierten azúcar en CO_2 y agua, y originan con ello energía, que utilizan para el crecimiento y la producción de nuevas células.

Si se detiene el suministro de aire a las levaduras, los microbios interrumpen su metabolismo de fermentación en la medida de la necesidad. La fermentación les ayuda a sobrevivir en tiempos hostiles, a pesar de ser energéticamente desfavorable. Louis Pasteur descubrió en 1861 que una levadura sin oxígeno utilizaba más glucosa. Esto se denominó **efecto Pasteur**. Las levaduras en condiciones anaeróbicas procesan más moléculas de azúcar para compensar las pérdidas de energía. Puesto que no hay más oxígeno para utilizar, tampoco puede quemarse en la cadena de respiración con el cofactor NADH + H^+ acumulado. La degradación de glucosa permanece, por lo tanto, en la fase de piruvato (Cuadro 1.4).

La célula transforma piruvato en acetaldehído. Con ello se libera CO_2. El ciclo de Krebs ya no puede ser utilizado. Para utilizar el NADH + H^+ acumulado, que no puede reoxidarse a NAD^+ en la "combustión fría" debido a la deficiencia de O_2, a la célula le queda solamente un camino: utiliza la **alcoholdeshidrogenasa** (Fig. 1.3) y forma, a partir de acetaldehído, con la utilización de NADH + H^+, etanol y NAD^+.



Fig. 1.13 La alcohol deshidrogenasa de la levadura transforma acetaldehído en etanol. Para propósitos bioanalíticos (Capítulo 10) se utiliza la reacción inversa para analizar la presencia de etanol en sangre.

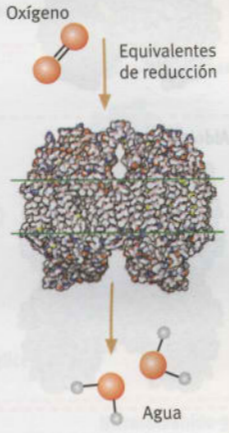
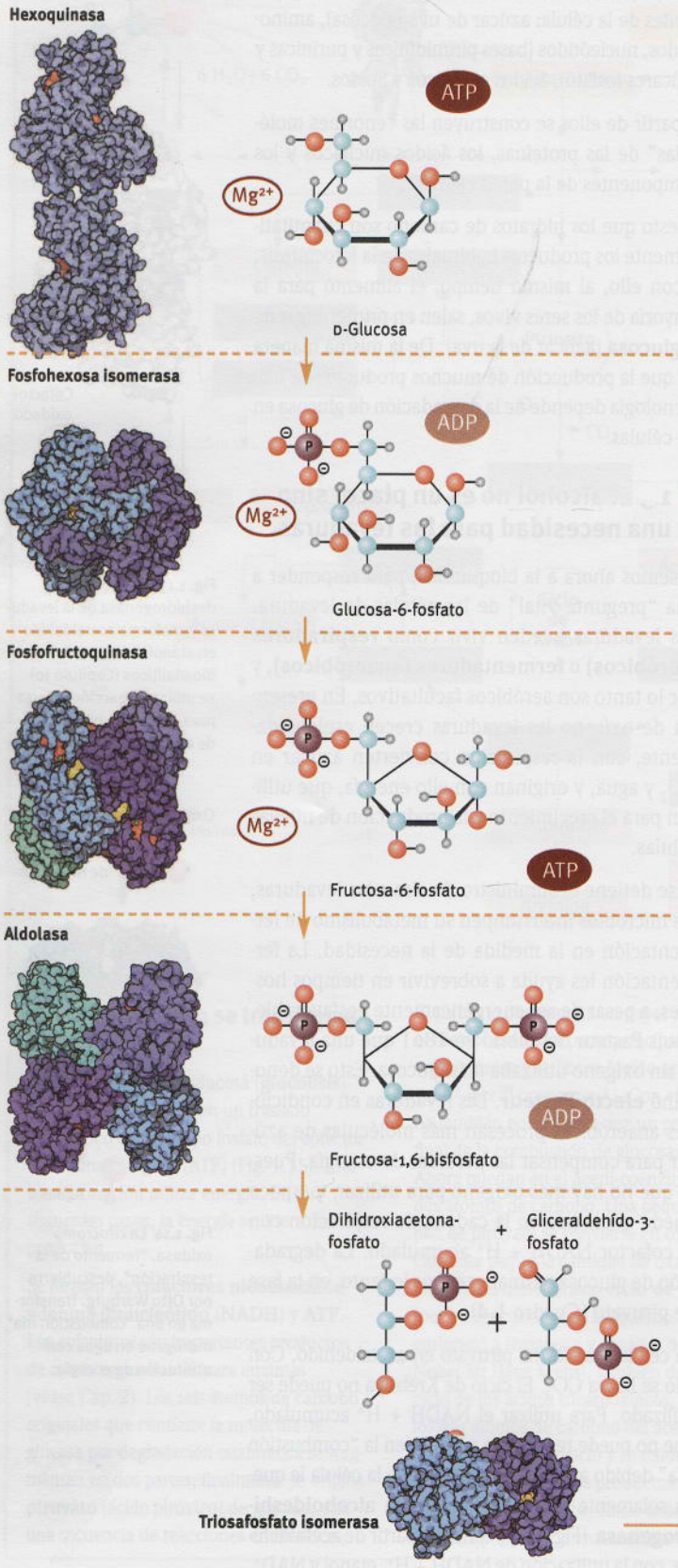


Fig. 1.14 La citocromo oxidasa, "fermento de la respiración", descubierta por Otto Warburg. Transforma en una "combustión fría" hidrógeno en agua con utilización de energía.

Fig. 1.15 La glucólisis y sus enzimas.
Degradación de glucosa a piruvato (simplificada).



La glucosa se "quema" finalmente de modo incompleto a alcohol y CO_2. En la fermentación de una molécula de glucosa se originan sólo una a cuatro moléculas de "moneda de cambio energético" ATP (en lugar de un máximo de 38 en la respiración con oxígeno); esto es suficiente para sobrevivir.

El alcohol no es, por lo tanto, un placer para la levadura, más bien una necesidad, pero muere si el contenido de alcohol supera un determinado valor. Contrariamente a la opinión clásica, el etanol también puede producirse aeróbicamente (efecto *Crabtree*) si el medio de alimentación contiene más de 100 mg de glucosa por litro. En esta "reacción en exceso" el piruvato no se oxida siguiendo el ciclo de Krebs, sino que se reduce a etanol.

Con la ayuda de los modernos **chips genéticos** (Cap. 10) para RNAm de levadura (un ácido nucleico de una única hebra, que desde el DNA del núcleo celular alcanza los ribosomas con las instrucciones de construcción para las proteínas, véase Cap. 3) se observa que cuando hay deficiencia de oxígeno las levaduras anaeróbicas producen otras enzimas diferentes a las de las levaduras aeróbicas. Es decir, los genes (DNA) se escogen de manera diferente y expresan diferentes proteínas, según la situación de oxígeno de la célula de levadura.

Otros fermentadores, las bacterias, forman **ácido láctico** (*Lactobacillus*), **ácido butírico** (*Clostridium butyricum*), **ácido propiónico** (*Propionibacterium*), **acetona** y **butanol** (*Clostridium acetobutylicum*) (Cap. 6), así como otros productos con gasto de ATP, y los secretan.

Los productos de la fermentación se forman, pues, en grandes cantidades, ya que sólo la transformación libera mucha más cantidad de alimentos en ausencia de oxígeno que energía requerida en forma de ATP de las células.

Ahora está claro por qué los primeros procesos de biotecnología que utilizaron los humanos fueron la fermentación del alcohol y del ácido láctico: las fermentaciones liberan grandes cantidades de producto en un breve tiempo y son, por lo tanto, altamente efectivas.

1.6 Los licores muy concentrados se producen mediante destilación

Las levaduras forman alcohol sólo hasta una determinada concentración, pues con porcentajes altos de alcohol mueren. La cerveza y el vino contienen alcohol únicamente en forma diluida. El vino tie-

ne un 12 a 13% de alcohol y el sake alrededor del 16 a18%.

Se conoce una forma concentrada (aguardientes o licores) ya desde el siglo XII, cuando se calentó (destiló) vino en una caldera cerrada.

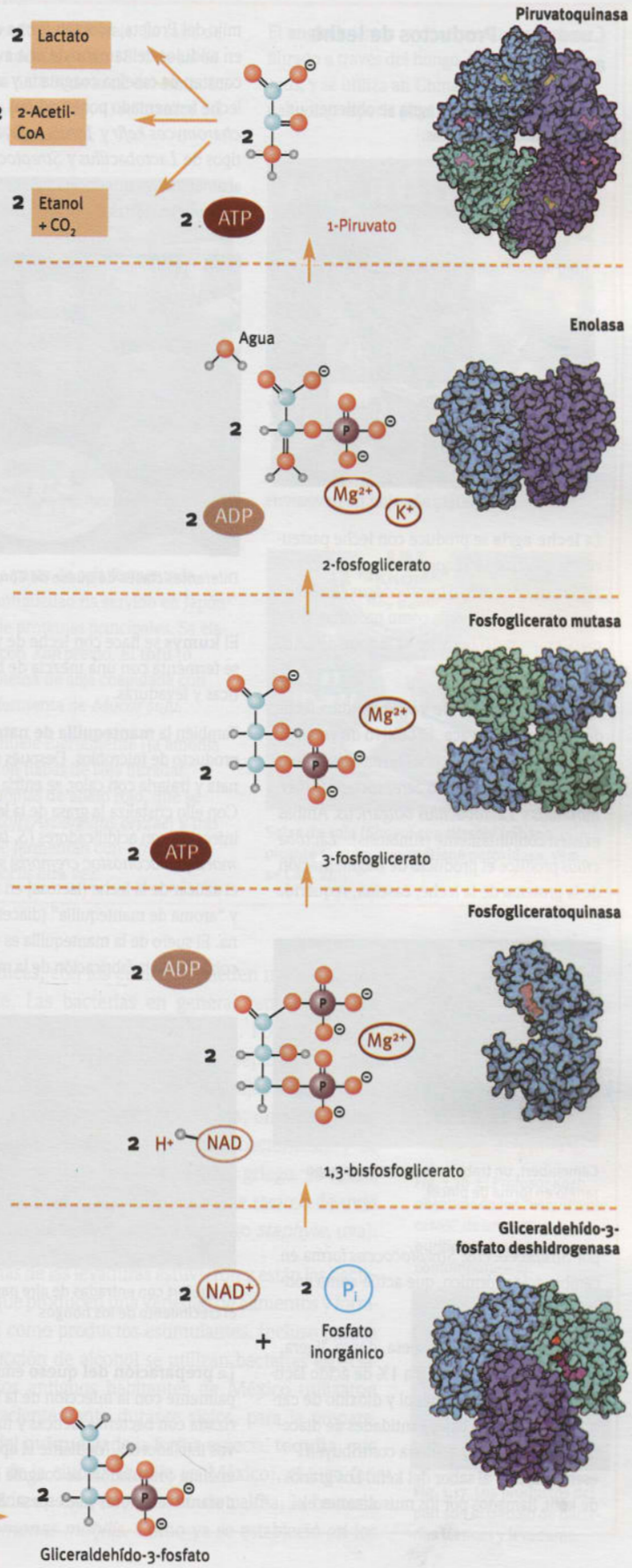
El truco de la **destilación de alcohol** (o sea la rectificación) es que el alcohol se evapora a 78 °C, o sea, bastante antes que el agua, que hierve a 100 °C. El vapor de alcohol creado se conduce a un refrigerante a través del que gira agua fría, se enfría y se condensa en forma de gotas. El alcohol altamente concentrado se introduce en un recipiente.

Los **licores** o espirituosos (del latín *spíritus*, espíritu) son aguardientes con al menos un 32% en volúmen de etanol (Cuadro 1.3). Mencionaremos solamente el coñac, el aguardiente alemán, el armañac, el licor de frutas, el whisky, el vodka y la ginebra.

El famoso **coñac** se descubrió a principios del siglo XV por los cultivadores de vino en la Charente francesa, cuando debieron responder a la menor calidad de su vino frente a la calidad del vino de la vecina región de Burdeos. Tuvieron la idea de destilar su vino. Más tarde el producto se destiló incluso dos veces, una tras otra. También todavía hoy el coñac joven viene con un contenido en alcohol del 70% en barriles de roble de Limousin, donde madura parcialmente durante años hasta alcanzar la grandeza completa, asumiendo el color del tonel y el sabor. Solamente después se diluye a un 40%.

Hoy se obtiene en las destilerías modernas **alcohol puro** de almidón de cereales o patata. Éste se transforma primero mediante amilasas degradadoras de almidón en azúcar, que se fermenta con las levaduras a alcohol, se calienta y el alcohol se destila entonces hasta el límite superior del 96%. Un argumento de los amantes del alcohol es que el alcohol más concentrado destruye los gérmenes. En realidad, el alcohol al 70% se aplica en medicina para la desinfección externa de la piel.

A concentraciones del 2 o 3% el alcohol ya aumenta la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las bacterias e inhibe su crecimiento. Está claro que el alcohol altamente concentrado inhibe aún mejor. Las frutas confitadas en alcohol, por ejemplo en los ponches de fruta y ron, duran mucho tiempo y demuestran claramente el efecto inhibidor de los microbios que tiene el alcohol. Dentro de los microorganismos, los que pudren e intoxican alimentos son principalmente sensibles al alcohol y se destruyen.



Cuadro 1.5 Productos de leche agria y queso

Los productos de leche agria se obtienen utilizando bacterias lácticas.



Preparación del camembert

La **leche agria** se produce con leche pasteurizada a la cual se añaden cultivos de *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis* y *Leuconostoc cremoris*, como bacterias aromáticas, unas 16 horas en el tanque de acidificación.

Para la **producción de yogur** se toma leche de cabra, oveja o vaca. El cultivo de yogur consta de bacterias lácticas termófilas (que les gusta el calor), como *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*. Ambas existen conjuntamente (simbiosis): *Lactobacillus* produce el producto de fragmentación de la proteína de la leche, caseína, requerido



Camembert, un trabajo de mohos con esporangio en forma de pincel

por *Streptococcus*; *Streptococcus* forma en cambio ácido fórmico, que actúa como conservante.

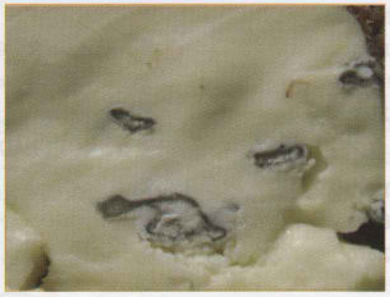
El **kéfir** es una bebida espesa, densa, ligera, con gas. Contiene un 0,8 a 1% de ácido láctico, un 0,3 a 0,8% de etanol y dióxido de carbono, que junto a bajas cantidades de diacetilo, acetaldehído y acetona contribuyen esencialmente al sabor del kéfir. Los granos de kéfir, llamados por los musulmanes el mijo del Profeta, adoptan forma de coliflor, en nódulos del tamaño de una avellana, que constan de caseína coagulada y azúcar de la leche fermentado por levaduras, como *Saccharomyces kefir* y *Torula kefir*, algunos tipos de *Lactobacillus* y *Streptococcus*, los aromatizantes que forman *Leuconostoc* y también bacterias del ácido acético.



Diferentes clases de queso de Córcega

El **kumys** se hace con leche de yegua, que se fermenta con una mezcla de bacterias lácticas y levaduras.

También la **mantequilla de nata agria** es un producto de microbios. Después de obtener la nata y tratarla con calor, se enfría y "madura". Con ello cristaliza la grasa de la leche. Tras la infección con acidificadores (*S. lactis*, *S. cremoris* y *Leuconostoc cremoris*) se convierte el azúcar de la leche (lactosa) en ácido láctico y "aroma de mantequilla" (diacetilo) y acetoína. El suero de la mantequilla es un producto colateral de la fabricación de la mantequilla.



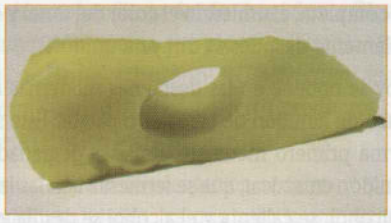
Roquefort con entradas de aire para el crecimiento de los hongos

La **preparación del queso** empieza principalmente con la infección de la leche pasteurizada con bacterias lácticas y mohos (cultivos iniciadores). Mediante el aporte de la enzima coaguladora se coagula la leche (casi durante una hora) y se espesa. Se corta con cuidado la gelatina en dados (quebrado) de un centímetro. Se retira el suero, se da formas al quebrado.

Después de varios cambios y un baño de sal, el queso **Emmental** (queso suizo) se seca (aproximadamente durante dos semanas) y se almacena en un sótano caliente durante seis a ocho semanas. Entonces las bacterias propiónicas fermentan el ácido láctico a CO_2 y ácido propiónico, con lo cual se forman los característicos agujeros y el sabor del queso suizo. Luego el queso madura durante seis meses.

El queso **Limburger** se lubrica varias veces tras el secado, es decir, se trata con un "cultivo de lubricante rojo" (*Brevibacterium linens*).

El **Camembert**, infectado con esporas de *Penicillium caseicolum* de rápido crecimiento o del tradicional *P. camemberti*, se desarrolla en un sótano seco después de tres a cuatro días de crecimiento del moho, y tras nueve a once días se puede empaquetar y vender. El camembert a menudo sigue madurando después de comprarlo: las enzimas fragmentadoras de las proteínas del moho ablandan la masa del queso y liberan materias aromáticas y amoniaco (aroma muy fuerte).



Los conocidos agujeros en el queso: trabajo de las bacterias propiónicas

El **Roquefort** auténtico se produce con leche de oveja cruda fresca. El quebrado se infecta con esporas de *Penicillium roqueforti*. Tras darle forma se transportan los quesos de toda Francia, desde Córcega hasta los Pirineos, a Roquefort, donde se salan y pinchan con agujas (amoscado) para crear entradas de aire para el crecimiento de los hongos. La maduración sigue finalmente en cuevas naturales de las montañas en Roquefort. Los quesos maduran aeróbicamente durante 20 días y luego en hojas de estaño tres meses en ausencia de aire (anaeróbicamente), donde luego actúan las enzimas de los mohos fragmentadoras de proteínas y grasas.

Cuadro 1.6 Sake, salsa de soja y otros productos fermentados asiáticos

La producción del **sake** japonés (**vino de arroz**) se parece más a la fabricación de cerveza que a la del vino, porque el almidón contenido en el arroz debe convertirse primero en azúcar fermentable por las amilasas fragmentadoras. Las esporas del moho *Aspergillus oryzae* se mezclan con arroz cocido. La mezcla se mantiene cinco a seis días a 35 °C, para producir el denominado *Koji*, que contiene en altas concentraciones las enzimas de los hongos fragmentadoras de almidón y proteínas. *Koji*, mezcla de grandes cantidades de arroz cocido y cultivo iniciador (*Moto*) de cepas de levadura, como *Saccharomyces cerevisiae*, fermenta durante tres meses como Moromi el arroz a sake. El sake contiene aproximadamente un 20 % en volumen de alcohol.

En la **salsa de soja** (*Shoyu* en Japón, *Chiang-siu* en China, *Siau* en Hong Kong) se procede de forma similar. Se coloca el Moromi de las habas de soja, trigo y *Koji* con grandes cantidades de sal de cocina y se fermenta durante ocho a doce meses con *Aspergillus soyae* y *A. oryzae*. La bacteria *Pedicoccus soyae*, la levadura *Saccharomyces rouxii*, y cepas de *Hansenula* y de *Torulopsis*, a menudo se añaden como cultivos iniciadores que forman ácido láctico y alcohol. Tras la fermentación, la salsa de soja se prensa; se utiliza el prensado como forraje. La salsa de soja contiene, además de un 18 % de sal de cocina, más de un 1 % de la sal del aminoácido **glutamato** (véase Cap. 4) reforzador del sabor, y un 2 % de alcohol.



Barriles de sake, apilados frente a un templo japonés

El **miso** es una pasta de soja fermentada, que desde la antigüedad ha servido en Japón como aporte de proteínas principales. Se elabora también con *Koji* previo. El **tofu** (o **sufu**) es la proteína de soja coagulada con ácido, que se fermenta de *Mucor sufu*.

El **natto**, que huele fuertemente (¡a amoniaco!), se hace con habas de soja filtradas, envueltas en hojitas de abeto rojo, que se infectan con *Koji* (*Aspergillus oryzae*) y tras varios meses se fermentan con *Streptococcus* y *Pediococcus* otra vez.

El **angkak** (arroz rojo) se produce con arroz filtrado a través del hongo *Monascus purpureus*, y se utiliza en China, Indonesia y Filipinas como especia picante y como colorante.



Habas de soja fermentadas con mohos: *Natto*

El **tempeh** son habas de soja cocidas, que se envuelven en hojas de plátano.



Salsa de soja (*Shoyu*) con *Wasabi* (rábano picante rayado, que contiene peroxidasa, véase Cap. 2).

Al menos en los albores de la humanidad, la fermentación del alcohol fue pues importante para la obtención de comida perfecta, duradera e higiénica.

1.7 Productos bacterianos: ¡La acidez los hace duraderos!

Las bacterias son procariotas y unas diez veces más pequeñas que las células de las levaduras. Para hacernos una idea del tamaño de las bacterias, nos podemos imaginar un dado diminuto de 1 mm de longitud de arista (o sea, con 1 mm^3 de volumen). En él caben no menos de mil millones de bacterias.

Las bacterias (Fig. 1.8) a menudo tienen forma de pequeños bastones. Conocemos también bacterias en forma de esfera, los **cocos** (del griego *kokkus*, grano redondo); las de forma de coma, constantemente temblando, los **vibriones** (del latín *vibrare*, temblar, vibrar), y las serpenteantes en forma de tornillo, los **espirilos** (del latín *spirillum*, pequeños tornillos). Muchas bacterias tienen flagelos, largos apéndices, con los cuales se pueden mover rápidamente. Las bacterias en general reproducen sus células dividiendose por la mitad. Por ello inicialmente se denominaron "células separadoras" (Fig 1.16). La mayoría de las células hijas así formadas se separan. Si se mantienen juntas, unas con otras, se originan cadenas de células bacterianas y se denominan **estreptococos** (del griego *streptos*, cadena). Si se agrupan en forma de racimo de uvas se llaman **estafilococos** (del griego *staphyle*, uva).

Además de las levaduras estuvieron y están las bacterias, que producen una variedad de alimentos y forraje, así como productos estimulantes. Incluso para la producción de alcohol se utilizan bacterias especiales. Los antiguos habitantes de México utilizaron inconscientemente durante siglos, para la preparación del **pulque** (y de la forma especial **tequila**, que viene de la ciudad Tequila en México), el jugo fermentado de ágaves y el vino de palma, la bacteria *Zymomonas mobilis*. Como ya se estableció en los



Fig. 1.16 El Profesor Koch observando los "esquizomicetos" de un cultivo purificado (caricatura contemporánea).



Fig. 1.17 Los productos del pan son el trabajo de bacterias lácticas y levaduras.



Fig. 1.18 Cocción del pan en la Edad Media.



Fig. 1.19 Cocción del pan industrial hoy: los procesos básicos no han cambiado.

Pasteurización

Louis Pasteur advirtió que es suficiente calentar brevemente el vino para matar las bacterias, que lo estropeaban. Esto también era válido para evitar que la leche se agriase.



Este proceso, en el que se mata la mayoría de microorganismos que contiene una sustancia, se denomina hoy pasteurización en honor a Pasteur. ¡Después de todo, 1 ml (1 cm^3) de leche cruda "pobre en gérmenes" contiene 250 000 a 500 000 microbios! Hoy, la leche para beber se pasteuriza principalmente calentándola un tiempo corto entre 71 y 74 °C. Con ello se mata un 98 a 99,5 % de los microorganismos. La denominada leche-H, que se mantiene cuatro semanas sin refrigerar, se calienta con vapor de agua durante corto tiempo a 120 °C y se almacena en recipientes pasteurizados.

últimos años, la bacteria puede crecer también en medios con una concentración de azúcar mucho más alta. Así produce alcohol seis o siete veces más rápido que las mejores cepas de levaduras.

La **cocción del pan**, en el sentido actual, se inventó probablemente tras la fabricación de la cerveza. Primero se conocía solamente el sólido pan plano. Ya hace alrededor de 6000 años, los panaderos egipcios produjeron un pan poroso de una papilla ácida (fermentada).

El fermento se forma a partir de bacterias lácticas (del tipo *Lactobacillus*) y levaduras tolerantes al ácido. Éstas son levaduras que no sólo pueden vivir en medio neutro sino también en medio ácido, como *S. cerevisiae*, *Candida krusei* y *Pichia saitoi*.

Los productos colaterales de la masa fermentada, como alcohol, ácido acético, acetoína, diacetilo y alcohol de fusel, son los que confieren el aroma y el sabor al pan.

El principal producto deseado de la fermentación no es aquí, sin embargo, alcohol, sino **dióxido de carbono (CO_2)**, cuyas burbujas gaseosas hinchan la masa. La masa "reposa" y se convierte en porosa. Como fuente de hidratos de carbono para el fermentado escurrido sirve el azúcar existente en la harina o los azúcares libres aportados, como **glucosa** (azúcar de la uva), **fructosa** (azúcar de la fruta) y **sacarosa** (azúcar de remolacha), así como la glucosa y la **maltosa** (azúcar de malta) que se forman mediante las enzimas de cereales (amilasas) a partir del almidón de la harina. Al cocer termina la fermentación, pues el gran calor en el horno mata las levaduras y bacterias. El alcohol formado en la fermentación se evapora, y en la masa cocinada permanecen sólo los espacios huecos en forma de panales de las burbujas de CO_2, que se pueden reconocer en cada rebanada de pan.

Hoy se produce el pan a partir de una mezcla de harina, levadura, sal y agua, a la cual se agrega el fermento acabado. La masa se amasa y se deja fermentar varias horas. Finalmente, una máquina divide la masa en pedazos de la medida de un pan. Las porciones deben fermentarse de nuevo, se enrollan y se rellenan moldes de cocción.

Antes de que la masa vaya al horno "reposa" otra vez. Tras aproximadamente 20 minutos de cocción se sacan los panes crujientes del horno y se dejan enfriar. Para panes blancos y masa de pasteles se mezclan sólo levaduras con harina y agua, es decir, no tiene lugar ninguna fermentación de ácido láctico.

La **levadura de cocción** (*Saccharomyces cerevisiae*) para pan y pasteles se cultiva sobre el remanente del procesado del azúcar de remolacha (melaza). ¡Anualmente se producen en todo el mundo 1,5 millones de toneladas! Se elabora levadura prensada con un valor de productividad de quinientos millones de euros.

Cuando el ser humano empezó a domesticar ovejas, cabras y vacas, y obtuvo la leche de sus animales caseros, se conoció también la **leche agria** (Cuadro 1.5). Se originó "ella sola", cuando la leche fresca se dejó reposar algún tiempo. La leche cocinada, sin embargo, no se estropeaba tan rápido. En leche fresca ordeñada se pueden multiplicar las bacterias del ácido láctico y parte del azúcar de la leche (lactosa) se fermenta a **ácido láctico (lactato)**. La multiplicación de los causantes de la putrefacción y la enfermedad, como los estafilococos, no es posible en un medio ácido. Se origina un producto duradero, aceptable y nutritivo.

La leche agria se digiere bien, porque la proteína de la leche **caseína** precipita en escamas finas por acidificación. La leche agria reacciona además en el estómago con el mineral calcio, importante para la formación de los huesos, a lactato de calcio, que se puede captar fácilmente de nuevo por la pared del intestino.

Por ello, el calcio no se pierde en el cuerpo. En las diferentes regiones de la Tierra, debido a las influencias climáticas y la naturaleza de la leche, podemos ver diferentes costumbres en el tratamiento de la leche (Cuadro 1.5). En Europa se elaboró **leche agria (cuajada)** y **quark**, en los Balcanes y el Oeste Medio **yogur**, en el Cáucaso **kefir**, en Asia central **kumys**, en India **dahi** y en Egipto **laben**.

En las preparaciones de **mantequilla**, la leche se pasteuriza al principio (véase el márgen izquierdo de esta página y el Cap. 4). Se obtiene la nata y se añade un "despertador ácido", con un cultivo mezcla de bacterias lácticas. Durante 16 a 30 horas la nata madura en tanques. Las bacterias forman ácidos y acetoína, que cambia por oxidación al típico "aroma de mantequilla" (diacetil). En la mantecación en una mantequera se produce **suero de la manteca** como producto secundario.

"¡El ácido es divertido!" Evidentemente, un cierto sabor ácido suave resulta agradable en las comidas. Un proceso de fermentación antiguo es la **acidificación** de la **col** y los **pepinos**. Los pepinos más pequeños se fermentan a menudo con otras verduras (*mixed pickles*). Para ello, *Lactobacillus plantarum* es la bacteria más importante. Los pepinos ácidos se recomiendan por la mañana, tras una noche de gozar los placeres del alcohol... También las **aceitunas** (después de un ligero tratamiento con sosa cáustica

para separar el componente amargo oleuropeína) se hacen duraderas con bacterias lácticas: las frutas no maduras pasan a aceitunas verdes, las maduras a negras.

Para producir **col fermentada** (*choucroute*), la col blanca finamente cortada se cubre largo tiempo con sal de cocina (a veces también con condimentos), hasta que el líquido de las células vegetales destruidas cubre la col. En un lugar frío empieza a fermentar muy pronto. La col blanca fresca en salmuera se convierte gradualmente, en ausencia de aire, en aceptable *choucroute*. Puesto que los microorganismos causantes de la putrefacción no pueden prosperar en el medio fuertemente ácido creado por los ácidos láctico y acético, el choucroute es largamente duradero. Hoy se produce choucroute en recipientes de hasta 80 t de capacidad en siete a nueve días. A menudo, el choucroute originado se calienta (blanquea), lo que mata las bacterias lácticas y acaba la acidificación. Este procedimiento genera un choucroute más suave.

También al ganado le gustan los ácidos: **proceso de ensilado**. En agricultura se corta el forraje verde, maíz y hojas de nabos, se empaqueta fuertemente apretado en el silo y se acidifica para el invierno. Se produce así el ensilado nutritivo de larga duración.

Al inicio del ensilado crecen las bacterias aeróbicas y utilizan oxígeno. El descenso de oxígeno y el creciente contenido de ácido exigen la multiplicación de tipos de *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Leuconostoc*.

Por el contrario, con insuficiente formación de ácido láctico se multiplican –reconocible por un olor punzante– **bacterias butíricas** (*Clostridium butyricum*). El autor de este libro fue educado de joven en el campo alemán y sabe que las vacas no deben ser alimentadas con ensilado estropeado, pues les produce "flatulencia inmediata".

También para hacer embutidos, al preparar la **materia prima de las salchichas** (como salami, salchichón ahumado, longaniza) (Fig. 1.22) se produce una fermentación láctica. A la carne picada de vaca y cerdo se añaden bacterias lácticas y bacterias de la familia *Micrococcus*; son los llamados **cultivos de arranque**. Las bacterias lácticas fermentan el azúcar, que debe añadirse a la carne, porque la carne es pobre en azúcar. El ácido láctico formado no sólo es productor del sabor sino que también inhibe, juntamente con la sal de salmuera añadida (mezcla de sal de cocina y el polémico nitrito sódico), los microbios indeseados, y contribuye a la firmeza de las futuras salchichas. La masa de la salchicha, introducida en una tripa, se cuelga en el recinto de maduración, donde madura dos semanas, mientras se ahuma y entonces prosigue la maduración.

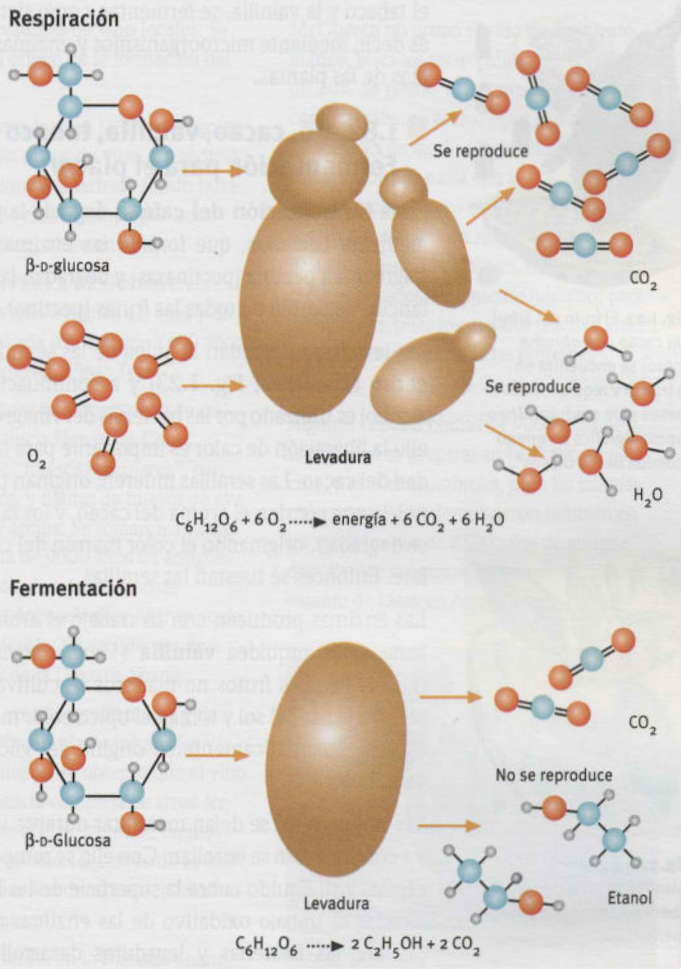


Fig. 1.20 Comparación entre respiración y fermentación en una molécula de glucosa mediante células de levadura.

Si el vino se deja largo tiempo al aire o el barril de fermentación no está completamente cerrado, en lugar de vino se produce un líquido ácido, el **vinagre**.

Se puede observar fácilmente en casa la transformación de alcohol en vinagre si los restos de cerveza o de vino se dejan al aire en un lugar caliente. También los sumerios conocieron ya la preparación de vinagre. Como material de partida utilizaron el jugo de palmera y el jarabe de dátiles, y más tarde también la cerveza y el vino. Los griegos y los romanos bebían vinagre de vino diluido como bebida refrescante. En la Edad Media, en Francia se produjo industrialmente vinagre de vino con la preparación de Orléans aún poco conocida. Hoy se produce vinagre industrialmente, en un "proceso rápido". Las **bacterias del ácido acético** (*Acetobacter suboxydans*) oxidan en seguida el alcohol a vinagre en biorreactores con la ayuda del oxígeno del aire. La **fermentación del ácido acético** no es una auténtica fermentación, pues no ocurre en ausencia de aire. Los estimulantes, como el café, el cacao, el té,



Fig. 1.21 Auténtico vinagre balsámico de Módena.



Fig. 1.22 Conservación de las salchichas y los embutidos gracias a la fermentación del ácido láctico.



Fig. 1.23 El fruto del árbol del cacao (*Theobroma cacao*) se encuentra en el tronco y requiere nueve meses para madurar. *Theobroma* significa en griego "comida de los dioses".



Fig. 1.24 La vainilla (*Vanilla planifolia*), una orquídea, libera su aroma tras la fermentación.



Fig. 1.25 Fermentación de té en China.



Fig. 1.26 Tabaco (*Nicotiana tabacum*).

el tabaco y la vainilla, se fermentan como siempre, es decir, mediante microorganismos y enzimas propios de las plantas.

1.8 Café, cacao, vainilla, tabaco – Fermentación para el placer

En la **fermentación del café** se degrada la pulpa mediante bacterias, que forman las enzimas que fragmentan pectina (pectinasas) y degradan las sustancias de sostén de todas las frutas (pectina).

Las levaduras degradan la pulpa de las semillas de **cacao** (sarcotesta, Fig. 1.23) y a continuación el alcohol es utilizado por las bacterias del vinagre. Por ello la liberación de calor es importante para la calidad del cacao. Las semillas mueren, originan polifenoles, que pierden el aroma del cacao, y los taninos se degradan, originando el color marrón del chocolate. Entonces se tuestan las semillas.

Las enzimas producen con su trabajo el aroma de fruta de la orquídea **vainilla** (*Vanilla planifolia*) (Fig. 1.24). Los frutos no maduros se cultivan, se secan a la luz del sol y toman el típico color marrón oscuro. Enzimáticamente se origina del glicósido vainillina.

Las **hojas de té** se dejan marchitar durante un día y a continuación se enrollan. Con ello se rompen las células y su líquido cubre la superficie de las hojas. Gracias al trabajo oxidativo de las enzimas de las plantas, las bacterias y levaduras desarrollan el sabor y olor característicos del té (Fig. 1.25).

Esto se produce sobre todo por los componentes orgánicos de las hojas, los polifenoles, bien visibles por el cambio de color originado, incipiente por los bordes de las hojas y lentamente hacia el centro de las hojas. Las antes hojas verdes cambian de color a castaño rojizo y más tarde de marrón oscuro a violeta.

En Europa se consume principalmente té negro. Se trata, en comparación con el verde, de té fermentado. Según el tiempo de fermentación se obtiene el té oolong, el té amarillo o el té blanco no fermentado.

Para producir el té oolong, té blanco o té amarillo, el fabricante de té debe detener el proceso de oxidación en el momento adecuado. En una reacción corta, el té no desarrolla aroma y no sabe a nada. Si el proceso es demasiado largo se genera té "quemado" y entonces tiene un sabor amargo.

También en el **tabaco** se producen procesos enzimáticos y microbianos parecidos (Fig. 1.26). El tabaco de los cigarros puros pasa casi siempre por una fermentación natural. Para ello las hojas, antes de secar, se atan en manojos que se ponen unos sobre otros en palos (montones). Debido al calentamiento propio (hasta 50 °C), el tabaco debe girarse una y otra vez. La fermentación que tiene lugar a esta temperatura causa el cambio de color de las hojas de tabaco. A menudo es posible mejorar los colores. Este tipo de fermentación dura tres o cuatro meses. También se garantiza con ello la posterior posibilidad de almacenamiento.

La **fermentación de los alimentos** se descubrió indudablemente por casualidad, pero sus efectos ventajosos (almacenamiento duradero, mejor digeribles, aroma más rico, y experiencia embriagadora con los productos que contienen alcohol) fueron tan obvios que pronto se consiguieron productos de fermentación de muchos cultivos. La fermentación, por consiguiente, fue una primera forma de **refinación** de los alimentos.

En realidad, los primeros pueblos sedentarios conocían sólo el secado y la conservación con sal de los alimentos. Por eso la sal era a menudo un tesoro (Cap. 4).

Con la introducción de la fermentación se pudo elaborar productos más aceptables y más diversos; y también disminuyó claramente el riesgo de intoxicaciones alimentarias.

Mientras que hoy, en los países muy industrializados, el **valor del placer** de los alimentos fermentados está en primer plano, en los países en desarrollo tienen su original importante valor. En estos países todavía se estropea un tercio de los alimentos. La fermentación es, en comparación con las modernas técnicas de enfriamiento, conservación química y liofilización, más barata y puede realizarse fácilmente, no requiere aparatos caros y sus productos se aceptan psicológicamente de modo tradicional. Además, permite crear puestos de trabajo.

1.9 Los mohos cooperan con las bacterias y producen queso

La leche es rica en todos los nutrientes, vitaminas y minerales; por lo tanto, ya era importante en los albores de la agricultura y la ganadería, para conseguir este contenido en materia. El profesor de fisiología Jared Diamond considera la utilización del ganado como un factor crucial del desarrollo de los continentes: solamente en Eurasia había **animales domesticables**. Gracias a la cabra, el cerdo y especialmente los bueyes adiestrados, se aceleró el desarrollo agrícola. El caballo llevó a una movilidad insospechada. En América solamente se domesticaron llamas y alpacas; en Australia ningún animal. Los animales domésticos proporcionaban carne,

Cuadro 1.7 Los chinos no sólo inventaron la pólvora

Patrick McGovern, de la Universidad de Pennsylvania, tiene un trabajo de ensueño: combina la química analítica con la arqueología, investiga las pistas del vino. En estos momentos está realizando una investigación detectivesca-histórica sobre la púrpura de los emperadores obtenida del molusco *Murex trunculus*. McGovern defiende la "hipótesis de Noé": el bíblico Noé llegó a tierra en el monte Ararat, actualmente al este de Turquía, y empezó el cultivo del vino. La agricultura se estableció en realidad en Ararat, con la "domesticación" del grano de trigo.

McGovern inició la comparación del DNA del vino natural (véase Cap. 10).



Recipientes de vino chinos y huesos oraculares

El vino eurasiático natural (*Vitis vinifera sylvestris*) se encuentra desde España hasta Asia Central. La elaboración del vino procede de estos vinos naturales. McGovern busca en las montañas turcas Taurus (donde nace el Tigris) el lugar donde pudo tener su origen el vino natural. José Vouillamoz, del Istituto Italiano Agrario di San Michele all'Adige, en Trento, y Ali Ergül de la Universidad de Ankara, están en el equipo de DNA. El equipo colecciona todas las posibilidades de cultivadores de vino locales. Se quiere seguir el origen de la formación del vino.

Los investigadores buscan también fragmentos de arcilla con restos de vino. Un indicio potente corresponde al tartrato (ácido tartárico), investigado en su tiempo por Louis Pasteur, que se encuentra en el vino.

Hace diez años, Patrick McGovern creía ya que las pistas más antiguas del vino y de la cerveza de cebada son de hace 7400 años, en el pueblo iraní Hajii Firuz Tepe.

Sin embargo, ahora se han encontrado en Jiahu, en la provincia Henan de China, los más antiguos "huesos oraculares", con caracteres chinos, y flautas de huesos de ave y fragmentos de arcilla. Se tomaron 16 fragmentos de arcilla de 9000 años de antigüedad con restos de vino del Museo de Pennsylvania de Arqueología y Antropología, en Filadelfia. Además, 90 recipientes de bronce cerrados de la Dinastía Shang.

Combinando la cromatografía de gas y de líquido, la espectrometría de infrarrojos y el análisis de isótopos, se observó que el vino contenía una mezcla compleja de arroz fermentado, cera de abejas, frutas de espino (que mostraron un alto contenido de azúcar y posiblemente las levaduras para la fermentación) y vino natural.

6000 años más tarde, en la Dinastía Shang, la enología había hecho avances considerables. El vino del emperador Shang de los recipientes de bronce contiene restos de flores (crisantemos), resina de pino (que recuerda la moderna retsina griega), restos de alcanfor, aceitunas, taninos ácidos y también ajenjo (que más tarde tomaron fatalmente los bebedores de absenta de la Belle Époque parisina de Toulouse-Lautrec).

McGovern no probó el vino de Shang aromático, pues los recipientes contienen hasta un 20% de plomo... ¡Interesante! El vino, como se sabe, es ácido, y por ello disuelve los metales de modo sobresaliente. Como los romanos de clase alta con sus tazas de plomo, los emperadores chinos también debieron envenenarse: con síntomas de calambres hasta la locura. El plomo es, como todos los metales pesados, un potente inhibidor para las enzimas, pues los metales pesados atacan los puentes disulfuro de las proteínas (Cap. 2).

Algunas bebidas chinas de 9000 años de antigüedad se preparaban con mijo de panícula, y esto es asombroso, pues las mismas trazas de mijo se descubrieron también en los vinos iraníes de 7500 años de antigüedad. Parece ser que se desarrolló un intercambio de ideas en Asia Central.



Recipiente de bronce en forma de animal (*Hsi-tsun*), de China, para ceremonias de vino

Para Patrick McGovern, el estudio del vino con todas sus conexiones sociales y económicas es la puerta a las civilizaciones antiguas: "una buena botella de Merlot o Shiraz nos puede ayudar hoy a entender los sentimientos de la historia".

leche y estiércol, y tiraban de los arados. Los productores de leche, como vacas, ovejas, cabras, caballos, renos, búfalos indios, yac y camellos, repartieron en el matadero la mayoría de las cantidades de proteína que habían conseguido durante su vida. Mediante la fermentación láctica se hicieron duraderos los productos de la leche.

De la leche agria se obtuvo **quark** por filtración del componente sólido, y a partir del quark se produjo una forma almacenable, el **queso**. Los humanos descubrieron muy pronto que la preparación del queso (Cuadro 1.5) resiste mejor si se añade a la leche una sustancia digestiva del estómago de los terneros, la **enzima coaguladora**. La enzima coaguladora (también denominada **renina**) coagula la proteína de la leche, la caseína. En la coagulación, los componentes sólidos de la leche forman grumos muy rápido y llegan a ser también mucho más sólidos que si ésta se deja simplemente agriar.

En la preparación del queso se añaden a la leche bacterias lácticas como cultivos de arranque y además la enzima coaguladora. Generalmente la leche coagula en 30 minutos y se pone espesa: la caseína precipita y se agrega. Después de presionar el suero líquido se mezcla el quark creado con sal y se corta en piezas.



Fig. 1.27 Fermentación de saque en un cómic de cuando el Prof. Shimizu (Universidad de Kyoto) era estudiante.

Cuadro 1.8 Historia de la biotecnología: Pasteur, Liebig y Traube — ¿Qué es la fermantación?

Casi transcurrieron 200 años desde los descubrimientos de Leeuwenhoek antes de que los microbios fueran otra vez el centro de interés. A mitad del siglo XIX prosiguió el desarrollo industrial de las grandes fábricas. Tampoco el alcohol se producía ya en pequeñas familias emprendedoras, sino al por mayor. Cada vez se necesitaban más urgentemente, por lo tanto, conocimientos exactos sobre los procesos de fermentación, para evitar fracasos costosos.



Louis Pasteur (1822-1895), fundador de la microbiología y la biotecnología, en el laboratorio

En la ciudad francesa de Lille, en el año 1856, un conocedor, Monsieur Bigo, visitante de una fábrica de alcohol, habló con el profesor de química **Louis Pasteur** (1822-1895). El hijo de Bigo estudió con Pasteur. El padre Bigo informó a Pasteur sobre una rara enfermedad que atacaba a muchos de sus barriles de alcohol. Del jugo de azúcar de remolacha no se formaba sino un líquido gris, viscoso, con olor a ácido. Pasteur empaquetó su microscopio y se fue a la fábrica. Allí tomó muestras de barriles "enfermos" y "sanos". El alcohol "sano" contiene, como se analizó mediante observación microscópica, pequeñas esferas amarillas, las levaduras que formaban racimos. Como con los gérmenes, brotaban semillas desde la parte lateral de las pequeñas bolas. Las levaduras, pues, vivían. Su vida causaba la conversión de azúcar en alcohol. Después Pasteur investigó la masa viscosa. No descubrió en ella ninguna levadura, pero sin embargo sí pequeños puntos grises. Cada punto contenía una estructura tangible de palitos temblones, millones de palitos en cada punto gris. La materia ácida, que producían los palitos, se demostró por análisis químico que era ácido láctico (lactato).

Pasteur dejó caer unas gotas del líquido que contenía los palitos en una botella con una disolución clara de levadura y azúcar. Tras un tiempo breve también habían desaparecido aquí las levaduras, y los palitos dominaban el campo. Se creaba de nuevo ácido láctico en lugar de alcohol.

Los palitos descubiertos eran bacterias. Tomaron su nombre de su forma: la palabra griega para palito es *bakterion*. Las bacterias producían obviamente ácido láctico mediante la fermentación láctica del azúcar, mientras que las levaduras fermentaban a alcohol y al gas dióxido de carbono.

Poco después del descubrimiento de las bacterias lácticas en los barriles de alcohol, Louis Pasteur fue requerido por los viticultores en Arbois (el padre de Pasteur había sido curtidor en Arbois). Ellos tenían problemas con la fermentación del vino. Una y otra vez obtenían del jugo de las mejores uvas un vino graso, denso, amargo. También aquí encontró Pasteur, en el caprichoso vino, en lugar de levaduras pequeñas bacterias, que sin embargo formaban estructuras como un collar de perlas. Pasteur descubrió en sus investigaciones básicas los diferentes tipos de bacterias que arruinan el vino. Finalmente pudo pronosticar a los perplejos viticultores qué sabor tendría una muestra de vino, ¡sin que tuviesen que pagar previamente! Para ello observó la muestra bajo el microscopio y determinó el tipo de levadura o de bacteria. Pasteur encontró que es suficiente calentar brevemente el vino para matar las bacterias.

La misma técnica también era apropiada para proteger la leche de agriarse. Este proceso, con el cual se mata la mayoría de microorganismos contenidos en una sustancia, se denomina hoy, en honor a Pasteur, pasteurización.

La pregunta sobre la naturaleza de la fermentación no preocupó solamente a Pasteur. En 1810 **Joseph Louis Gay-Lussac** (1778-1850) demostró que en la fermentación de jugo de uva a partir del azúcar de uva (glucosa) se origina alcohol etílico y el gas dióxido de carbono. A mediados del siglo XIX, el famoso químico alemán **Justus von Liebig** (1803-1873) propuso una teoría. Alegó que para la formación de alcohol intervenía un puro proceso químico y no un proceso biológico. Liebig encontró sencillamente ridículo que la fermentación fuera producida por pequeños seres microscópicos. Más bien deberían ser "vibraciones" en la descomposición de la materia orgánica sobre la transferencia del azúcar y su utilización a CO_2 y alcohol. En todas las fermentaciones alcohólicas se encontraban sin embargo, levaduras, o sea seres vivos.



Justus von Liebig (1803-1873), el mayor químico del siglo XIX, en su laboratorio de química en Gieben

Louis Pasteur, todavía al principio de su carrera científica, empezó una lucha científica vehemente con la autoridad internacional Justus von Liebig: "¡Sin levaduras vivas no hay alcohol!" insistía tercamente Pasteur.

Liebig se burló por otro lado: "Cierta gente, que piensa que el proceso de fermentación se debe a *animalcules* (animalitos), se parecen a niños que creen que la circulación del río Rhin la producen las palas de las ruedas de los molinos de agua que se encuentran en su orilla". La disputa se inclinó hacia un lado o hacia el otro durante años. Finalmente se decidió tras la muerte de Pasteur y de Liebig.

Pasteur divulgó en 1876 los resultados de dos décadas en un libro de envergadura. "La fermentación es la respiración sin oxígeno", aclaró Pasteur. Sirve como "impulso" de los seres vivos, para generar energía. Todos los seres vivos requieren energía para la vida. Obtienen esta energía en su metabolismo principalmente mediante la degradación de azúcares, grasas y proteínas en sus células corporales. El azúcar, por ejemplo, se quema en las células al gas dióxido de carbono y agua. Ambos productos abandonan las células. La energía liberada entonces es utilizada por el cuerpo, por ejemplo, para el movimiento de sus músculos. Para esta combustión "fría" las células necesitan el oxígeno del aire, como es necesario en la combustión "caliente" de la madera a ceniza. Sin oxígeno, los animales y las plantas superio-

res no pueden generar energía y por consiguiente no viven. Los microorganismos poseen, en cambio, un tipo de respiración de emergencia en ausencia de oxígeno: la fermentación. Seguramente esta solución de emergencia proviene de los inicios de la vida, pues en la Tierra aún no había oxígeno. Se liberó más tarde por las plantas a partir de agua (fotosíntesis). Antes, en una atmósfera pobre en oxígeno, la fermentación fue para los microbios antiguos la forma normal de obtener energía.



Moritz Traube (1826-1894).

¿Tenía razón Pasteur, pues, al decir que sin microbios no es posible la fermentación? **Moritz Traube** (1826-1894), un estudiante de Liebig, dijo ya en 1858 que las fermentaciones no vienen necesariamente de la actividad de las levaduras, sino que más bien constan de procesos químicos, que son catalizados por "fermentos" oxidantes y reductores. Traube caracterizó los fermentos por primera vez como materiales proteicos que actúan catalíticamente, como moléculas químicas definidas, que pueden actuar por su propia oxidación y reducción en los organismos, pero también en reacciones de oxidación y reducción fuera de las células vivas.

Dividió los fermentos, en consecuencia, según el tipo de reacción. Más tarde señaló la necesidad del contacto molecular directo entre la enzima y el sustrato para la reacción.

Hasta ahora no se menciona en la bibliografía de la historia de la bioquímica que él ya formuló las consideraciones cualitativas para la cinética de las reacciones, y por primera vez la dependencia del tiempo de reacción y la cantidad de fermento.

En 1897, **Eduard Buchner** (1860-1917) realizó el experimento decisivo, que acabó con la lucha entre Liebig y Pasteur (véase Cap. 2).

En la fabricación de **quesos blandos**, como el Camembert y el Brie, se cuida de que en la superficie de la "masa de queso" crezca moho. Desde hace tiempo se han usado mohos muy especiales en los pequeños lugares franceses **Camembert** y **Roquefort**. Por ello, los quesos producidos en sus pueblecitos se denominaron según los diferentes lugares.

Los **quesos duros**, como el Emmental, se endurecen en la denominada prensa del queso y son más duraderos que los quesos blandos. A la masa del queso se añaden mohos especiales. Los hongos no crecen entonces en la superficie sino en el interior del queso, si se suministra suficiente aire. Para ventilarlo se pincha la masa del queso con brochetas con estrechos canales de aire. En el queso maduro puede reconocerse el cultivo del moho a lo largo de los canales de las brochetas.

Los agujeros y el aroma de los quesos duros, como el Emmental, se debe a las **bacterias del ácido propiónico** que fermentan, en el interior del queso, el azúcar a ácido propiónico, ácido acético y CO_2. El lubricante rojo del Limburger y el Romadur también viene de las bacterias, que crecen en la superficie del queso.

Reconocemos los **mohos** a simple vista, pues al contrario que las levaduras son seres pluricelulares. Sin embargo, generalmente se ven sólo los productores de esporas. Las setas de los hongos comestibles, tal como los conocemos en las exposiciones de setas, son productoras de esporas (cuerpos fructíferos).

El cuerpo verdadero del hongo no es distinto entre los hongos comestibles y los mohos. Consta de hilos largos, delgados, el **micelio** (del griego *mykes*, hongo). Del micelio crecen hacia fuera los **productores de esporas (esporangios)**. Fabrican miles de esporas, que se lleva el viento o son arrastradas por el agua de lluvia. Las esporas germinan en un lugar rico en nutrientes y forman un nuevo micelio.

Los quesos productores de **mohos con esporangio en forma de pincel** se denominan según la forma de sus productores de esporas. Su nombre latino es *Penicillium* (pincelito en latín).

Los **mohos con esporangio en forma de regadera** (*Aspergillus*) crecen sobre el pan y la mermelada. Al contrario que los mohos, inofensivos para la preparación del queso, *Aspergillus flavus* puede, por ejemplo, producir aflatoxina, que puede activarse en el hígado por el sistema enzimático del citocromo P-450 captador de oxígeno y provocar cáncer de hígado (Cap. 4).





Fig. 1.28 El duque de Baviera Guillermo IV (1493-1550) promulgó en 1516 la ley de pureza.
Abajo: documento de la ley.

Redacción de la ley de pureza (extracto)

"Queremos especialmente que, en todas partes de nuestras ciudades, mercados y en las tierras, en ninguna cerveza se puedan usar y utilizar más materiales que sólo cebada, lúpulo y agua. Quien reciba nuestra orden y a sabiendas no la cumpla, debe dar como multa este barril de cerveza a las autoridades de justicia, tan a menudo como ocurra esto, se retirará indulgentemente."

Postulada por Guillermo IV Duque de Baviera, el día de San Jorge del año 1516 en Ingolstadt.



Fig. 1.29 Publicidad de la salsa de soja.

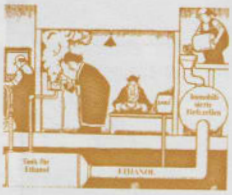


Fig. 1.30 Antigua fermentación combinada con la tecnología moderna: en las bolas de alginato, las células de levadura encerradas (inmovilizadas) (véase Cap. 2) producen etanol continuamente, que se utiliza en los hogares japoneses (dibujo no muy serio de los años 1980).

1.10 Sake y salsa de soja

En el este de Asia (Japón, China, Corea) se utilizan los mohos, desde hace siglos, para descomponer las habas de soja y el arroz ricos en proteínas con las enzimas del moho (amilasas fragmentadoras de almidón, proteasas fragmentadoras de proteína) para una posterior fermentación alcohólica y láctica. La **salsa de soja** (*Shoyu*) (Cuadro 1.6 y Fig. 1.29) es para nosotros en Europa la más conocida; en Japón se producen y se utilizan anualmente alrededor de diez litros por cabeza (!). Consta de una mezcla de trigo y soja que se trata con esporas de *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus soyae* como cultivos competidores.

Las enzimas eliminadas de los hongos descomponen la proteína de las habas de soja y las moléculas de almidón del trigo; además, se añade sal de cocina a altas concentraciones para inhibir la putrefacción. En ocho a diez meses se desarrollan las levaduras y las bacterias (cepas de *Pediococcus*) y conducen la fermentación hasta el final. Entonces se separa la salsa de soja por presión.

De modo similar se produce el **vino de arroz (sake)** (Fig. 1.27). Primero se debe degradar el almidón del arroz a azúcares fermentables. Esto ocurre mediante enzimas (amilasas) que los mohos ceden al entorno. A continuación los azúcares así formados se fermentan a alcohol mediante cepas de *Saccharomyces*.

El vino de arroz, por lo demás, contiene aproximadamente un 20 % de alcohol en volumen, que no es ninguna menudencia si uno considera que muchos pueblos asiáticos se diferencian de los europeos en la dotación insignificante de enzimas de su hígado, pues poseen una variante molecular (**isoenzima**) de la acetaldehído deshidrogenasa que degrada más lentamente que la isoenzima "europea" el producto de la alcohol deshidrogenasa (Fig. 1.13). Como consecuencia de ello, cantidades menores de alcohol en los asiáticos tienen indudablemente el mismo efecto de embriaguez que las mayores en los europeos (¡muy económico!), y las consecuencias, por todos conocidas a la mañana siguiente del placer son, también más graves.

1.11 ¿Qué es en realidad la fermentación?

Todos los procedimientos y procesos de fermentación descritos hasta ahora se aplicaron y se aplican por los humanos desde hace miles de años. Las experiencias así recogidas pasaron de generación en generación. Sin embargo, se desconocía lo que era en realidad la fermentación y cómo se ponía en marcha. En el siglo XIX **Louis Pasteur** (1822-1895) aclaró el asunto. Colocó la primera piedra para el dominio de los procesos técnicos, en los cuales los microorganismos son los "animales de carga", y por ello es uno de los padres de la biotecnología moderna (Cuadro 1.8).

La fermentación alcohólica está causada por las levaduras. Degradan azúcar, con la utilización de aire, a alcohol y dióxido de carbono. Las levaduras pueden respirar bien en presencia de oxígeno o fermentar. Mediante la fermentación, sin embargo, originan mucha menor energía que con la respiración. Sin oxígeno se multiplican aproximadamente 20 veces más despacio que con suficiente oxígeno. El ser humano lleva las levaduras, por así decirlo, a una situación de necesidad, para obtener alcohol o en la cocción del pan con las burbujas de dióxido de carbono para hacer esponjosa la masa.

Para sobrevivir, las levaduras deben procesar mucho más azúcar en la fermentación que en la respiración. ¡Por eso las fermentaciones son tan productivas! Sin embargo, si se utilizan grandes cantidades de levadura, por ejemplo para empezar bioprocesos o para producir levaduras de forraje, si las levaduras deben también multiplicarse el oxígeno se bombea adicionalmente a la disolución de alimentación. Entonces se origina sólo poco alcohol.

Junto a las levaduras, como "aeróbicos facultativos" con su doble vida, hay también microbios, para los que son mortales las más pequeñas cantidades de oxígeno (anaeróbicos estrictos), por ejemplo las metanobacterias –forman metano sólo en ausencia de aire– o los clostridios, que también pueden vivir en los alimentos enlatados sin aire y causan peligrosas intoxicaciones alimentarias.

Bibliografía utilizada y aplicada

- El clásico de Biotecnología alemán: Dellweg H (1987) Biotechnologie. VCH, Weinheim
- La biblia de bolsillo de la Biotecnología: Schmid R D (2002) Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH, Weinheim
- Escrito por el divertido decano de la biotecnología alemana: Dellweg H (1992) Biotechnologie verständlich. Springer, Heidelberg
- Antiguo, pero bueno – una buena introducción: Gruss P, Herrmann R, Klein A, Schaller H (Hrsg.) (1984) Industrielle Mikrobiologie. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg
- Especial para interesados en tecnología: Crüger W und Crüger A (1989) Biotechnologie – Lehrbuch der Angewandten Mikro-biologie. 3. Aufl. Oldenbourg, München.
- Sucinto y didácticamente bueno, especialmente para universitarios: Leuchtenberger A (1998) Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie. Teubner B G, Stuttgart, Leipzig
- Quizás el mejor libro de bolsillo de Microbiología: Schlegel H G (1992) Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl. Thieme, Stuttgart
- Fuente de muchos Cuadros de este libro: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 5th Edition, Wiley-VCH, Weinheim
- Ruttloff H, Proll J, Leuchtenberger A (1997) Fermentierte Lebensmittel: Lebensmittel-Biotechnologie und Ernährung. Springer, Heidelberg
- Cómo se pueden explicar las diferencias culturales entre diferentes regiones: Diamond J (2000) Arm und Reich. Die Schicksale menschlicher Gesellschaften. Fischer, Frankfurt
- La interesante historia de la Microbiología: de Kruif P (1940) Mikrobenjäger. 8. Aufl. Orell Füssli, Zürich, Leipzig
- Todo sobre el vino: Ambrosi H (2002) Wein von A bis Z. Gondrom, Bindlach
- Dellweg H, Schmid RD, Trommer W (Hrsg.)(1992) Römpp Lexikon Biotechnologie. Thieme, Stuttgart

Enlaces de Web

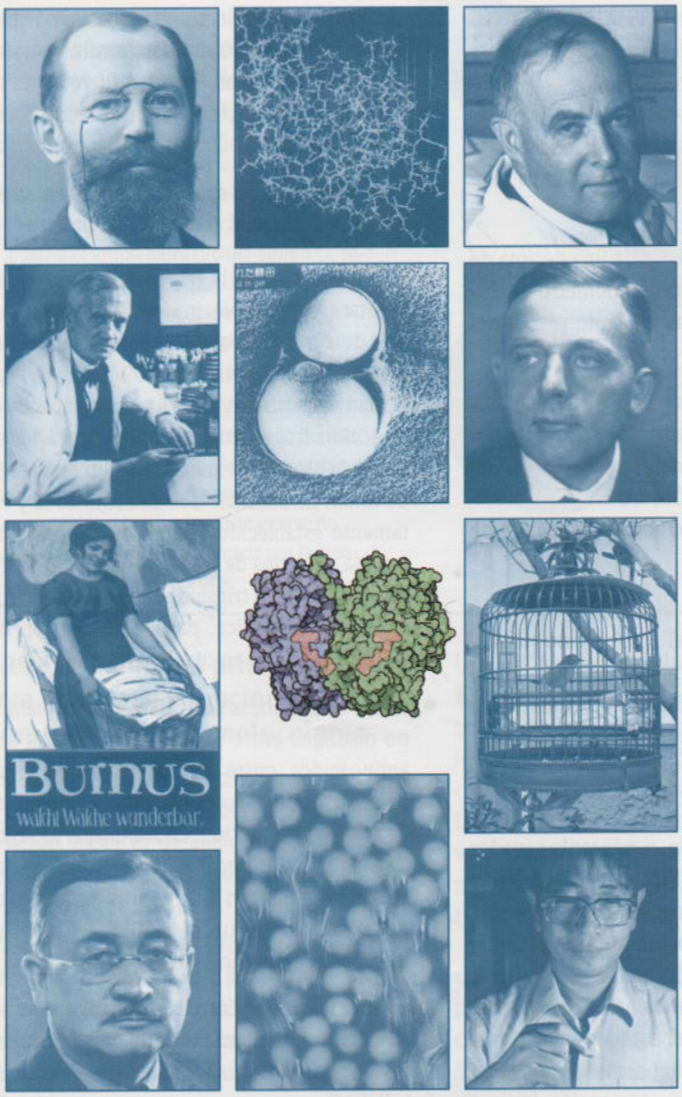
- Búscador de Biotecnología en Internet: *www.biotechfind.com*
- Todo sobre microorganismos: *www.microbes.info*
- Secretariado de Información de Biotecnología del BMBF: *www.i-s-b.org/*
- Pan: *http://de.wikipedia.org/wiki/Brot*
- Museo notable: *www.brotmuseum-ulm.de/*
- Cerveza: *http://de.wikipedia.org/wiki/Bier*
- Vino: *http://de.wikipedia.org/wiki/Wein*
- Queso: *http://de.wikipedia.org/wiki/Käse*
- Qué ocurre si se mira hoy a través del microscopio de Leeuwenhoek: *www.sciences.demon.co.uk/wav-spf.htm*
- Todo sobre la fermentación asiática y la fermentación en casa: *http://users.chariot.net.au/~dna/*

Ocho preguntas de autoevaluación

1. ¿En qué se diferencian las células procariotas de las eucariotas (por lo menos tres características)?
2. ¿Por qué el alcohol se denomina la leche materna de la civilización? ¿Quién descubrió el vino?
3. ¿Por qué motivos bioquímicos la fermentación libera grandes cantidades de producto en corto tiempo?
4. ¿En qué se diferencian las bacterias de las levaduras? Cite dos aplicaciones biotecnológicas para cada una.
5. ¿Qué estimulante se origina mediante fermentación?
6. ¿Por qué el alcohol inhibe el crecimiento de las bacterias?
7. Si las levaduras tuviesen "elección", ¿producirían alcohol?
8. ¿Qué puntos de vista defendió Justus von Liebig en la discusión sobre la fermentación y cuáles Pasteur? ¿Quién tenía razón finalmente?

Enzimas –

Supercatalizadores moleculares para el hogar y la industria



2.1 Las enzimas son biocatalizadores eficaces y específicos 26

2.2 La lisozima: la primera enzima cuya anatomía y función se entendieron en detalles moleculares 27

2.3 Los cofactores sirven como herramientas a las enzimas complejas 31

2.4 Las enzimas pueden obtenerse de animales, plantas y microorganismos 32

2.5 Las hidrolasas extracelulares degradan los biopolímeros en pequeñas unidades utilizables 34

2.6 Las amilasas mezclan, cuecen y trenzan 34

2.7 Las pectinasas prensan más zumo de fruta y verduras 36

2.8 Los biodetergentes son la aplicación más importante de las enzimas hidrolíticas 37

2.9 Las proteasas ablandan la carne y curten la piel 38

2.10 Inmovilizaciones: cuando se quiere reutilizar las enzimas 40

2.11 Glucosa isomerasa y jarabe de fructosa: azúcar con mayor fuerza edulcorante 40

2.12 Alimentos y forrajes con enzimas inmovilizadas 42

2.13 Los reactores de enzimas de membrana usan regeneración de cofactor 44

2.14 Células inmovilizadas 46

Capítulo **2**



Fig. 2.1 En 1926 el americano James B. Sumner (1887-1955) fue el primero en obtener la enzima ureasa cristalina y consiguió analizar las propiedades de la proteína.



Fig. 2.2 John H. Northrop (1891-1975) cristalizó entre 1930 y 1933 las enzimas de la digestión tripsina y pepsina, y demostró que constaban exclusivamente de proteína. Sólo entonces aceptaría el descubrimiento de Sumner. Ambos obtuvieron en 1946 el premio Nobel.



Fig. 2.3 Otto Heinrich Warburg (1883-1970) descubrió el cofactor nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) y las enzimas de la respiración que contienen hierro, como la citocromo-oxidasa (véase Fig. 1.14, Cap. 1). Fue distinguido con el premio Nobel en 1941.

2.1 Las enzimas son biocatalizadores eficaces y específicos

Las **enzimas** cambian, conducen y regulan casi todas las reacciones químicas de las células vivas.

Hasta ahora se han descrito en detalle más de 3000 enzimas diferentes. Se sospecha que en la naturaleza hay hasta 10 000 enzimas distintas. De algunos tipos de enzimas existen sólo unas pocas moléculas en una célula; de otros, en cambio, de 1000 a 100 000. Todas las enzimas actúan como **catalizadores biológicos**: convierten sustancias, a menudo en fracciones de segundo, en otros productos, sin cambiar ellas mismas al hacerlo.

Las enzimas aceleran la consecución del equilibrio de las reacciones químicas en un factor desde algunos millones hasta un billón. Posibilitan con ello, en primer lugar, los procesos de la vida. La formación de alcohol y dióxido de carbono a partir de azúcar –que realizan las enzimas en las células de levadura en unos pocos segundos– duraría sin enzimas miles de años, y por lo tanto sería prácticamente imposible. Las enzimas son biocatalizadores altamente efectivos y potentes.

En todas las células de alrededor de una décima de milímetro hasta una milésima de milímetro de diámetro transcurren ordenadas miles de reacciones enzimáticas por segundo.

Esto funciona sólo si cada uno de los catalizadores moleculares participantes, entre miles de sustancias diferentes en la célula, reconoce "su" **sustrato**, que convierte en "su" producto (Cuadro 2.1). La biocatalización se realiza en el **centro activo** (*active site*) de la enzima.

Casi todos los catalizadores biológicos son proteínas. Sin embargo, también el **RNA** (ácido ribonucleico) puede actuar biocatalíticamente (véase Cap. 3.2). A menudo se degrada mediante esta **ribozima** otros RNA. Pero se pueden construir **aptámeros** artificialmente, que se unen a las sustancias deseadas (véase Cap. 10).

Ya en 1894 el químico alemán, y más tarde ganador del premio Nobel, **Emil Fischer** (1852-1919) (Fig. 2.4), dijo que las enzimas reconocen sus sustratos "probando" según el **principio de la llave y la cerradura** (*lock and key*). Una hendidura en la superficie, el centro activo de la enzima, debe poseer una forma en la que, en el espacio, la molécula de sustrato entra exactamente, como una llave en la cerradura a que pertenece. Las moléculas con cambios insignificantes ya no entran en interacción con la enzima. El principio de la llave-cerradura sirve para explicar la primera regla de la elevada capacidad de selección, la especificidad de sustrato de la enzima. También explica por qué los **inhibidores de enzimas** (por ejemplo la penicilina) competitivos se parecen espacialmente al sustrato: bloquean el centro activo de la correspondiente enzima (inhibición competitiva) como una "ganzúa" que permanece colocada en la cerradura.

Un experimento bioquímico sencillo clarifica la **especificidad** de una enzima (Cuadro 2.1). Hay que tener en cuenta que enzimas como la glucosaoxidasa (Fig. 2.5), para los mecanismos finos de sintonización en la célula, deben poseer una alta especificidad de sustrato (comparable a la seguridad de las cerraduras). Tales enzimas actúan principalmente con alta especificidad.

Las enzimas extracelulares, como las que degradan proteínas (**proteasas**) o almidón (**amilasas**), son en cambio poco específicas. Trabajan fuera de las células y no sería rentable construir una enzima especial para cada proteína o polisacárido especial a degradar.

Veamos dos **proteasas extracelulares** que se segregan de las células al medio circundante:

- Una enzima como la **tripsina** debe poder fragmentar todas las proteínas del estómago del cerdo o del ser humano en trozos más pequeños. La tripsina tiene, por un lado, sólo una baja especificidad de sustrato, pero una alta especificidad de acción: fragmenta en concreto todos los enlaces de la proteína, exactamente en unos lugares de unión de aminoácidos determinados y exactamente establecidos (sobre el carboxilo de la cadena de restos de lisina o arginina en la cadena peptídica). La tripsina se utiliza también para la síntesis específica, para la conversión de la insulina de cerdo en insulina humana (Cap. 3).
- Por el contrario, la **subtilisina** microbiana casi no distingue entre las cadenas laterales de los aminoácidos, entre los cuales se fragmenta el enlace peptídico. Posee una amplia especificidad de sustrato y de acción. La subtilisina es segregada al medio por *Bacillus subtilis*, donde destruye las proteínas en fragmentos "aceptables" y por ello es una "rotura general ideal" –muy apropiada para su uso en biodetergentes (Fig. 2.17).

La especificidad de acción sirvió como base para una **clasificación** y **designación** uniforme de las enzimas (Cuadro 2.3), la nomenclatura de enzimas (EC) de la IUPAC.

Cuadro 2.1 Cómo reconoce la GOD un azúcar de forma altamente específica y lo transforma

En un vaso de reacción se encuentra una mezcla de hidratos de carbono: glucosa (azúcar de la uva), fructosa (azúcar de la fruta), sacarosa (azúcar de remolacha o de caña), maltosa (azúcar de malta) y almidón.

Si añadimos a la mezcla la enzima glucosa oxidasa (GOD) y tras algún tiempo analizamos la disolución químicamente: ¡la glucosa desaparece casi por completo! En su lugar se sustituye por otra sustancia –gluconolactona, un producto de oxidación de la glucosa. Los otros hidratos de carbono quedan inalterados. La glucosa se convierte, obviamente mediante la glucosa oxidasa, en gluconolactona. La glucosa es, pues, el sustrato de la glucosa oxidasa, y la gluconolactona el producto de oxidación de la reacción enzimática. A partir de cinco hidratos de carbono diferentes, la β-D-glucosa simplemente es seleccionada por la glucosa oxidasa como sustrato. Incluso la α-D-glucosa no es reconocida y por lo tanto no es convertida. β-D-Glucosa significa que el grupo hidroxilo (OH) se encuentra en el átomo C_1 en la mitad superior del plano del anillo, mientras que en la α-D-glucosa el grupo hidroxilo del átomo C_1 se encuentra en la mitad inferior del plano del anillo. Además de la glucosa, también el oxígeno se utiliza (se reduce) como segundo sustrato y por ello se origina peróxido de hidrógeno H_2O_2.

La maltosa, la sacarosa y sobre todo el almidón son sencillamente "una llave demasiado grande" para la glucosa oxidasa. La fructosa, indudablemente, entraría bien en la "cerradura enzimática", pero debido a la falta de ajuste exacto no cierra, y por ello no es transformada por la enzima. Sólo la β-D-glucosa se ajusta.

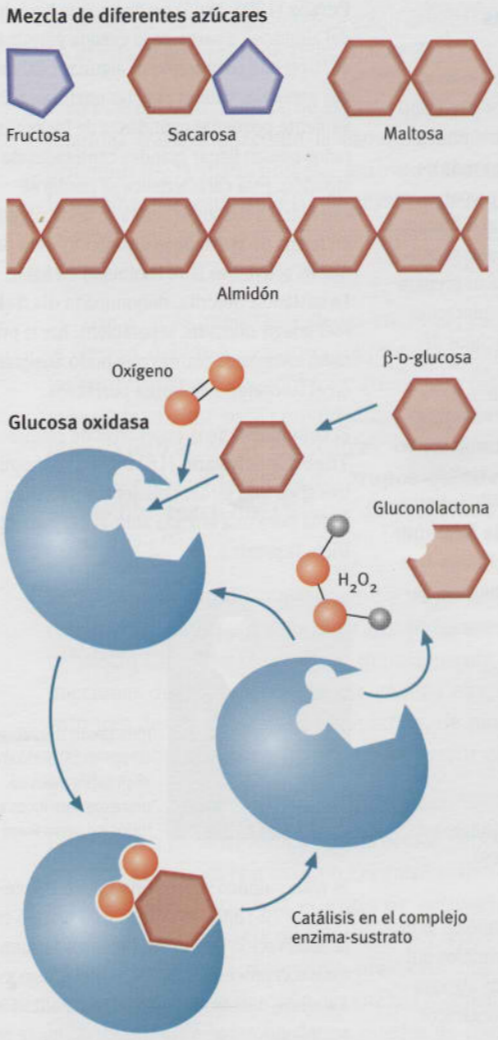




Fig. 2.4 Llave y cerradura: el ganador del premio Nobel Emil Fischer (1852-1919) propuso el principio de la llave y la cerradura en las enzimas. Este principio explica bien la complementariedad de la pareja de reacción.



Fig. 2.5 Estructura en el espacio de la glucosa oxidasa (GOD), que es un dímero. Es una oxidorreductasa que se aplica con mucho éxito en biosensores para medir el azúcar sanguíneo en los diabéticos (véase Cap. 10). El grupo prostético en el centro activo de la GOD, flavina adenina dinucleótido (FAD), se representa en rosa.

2.2 La lisozima: la primera enzima cuya anatomía y función se entendieron en detalles moleculares

La lisozima fue la primera enzima de la que se aclaró su estructura espacial y cuyas propiedades se entendieron hasta el detalle atómico. Alexander Fleming la descubrió algunos años antes que la penicilina (Cuadro 2.4).

La lisozima fue un modelo excelente para estudiar la **interacción de enzima y sustrato**. El de la llave y la cerradura fue indudable e inicialmente un buen modelo que, sin embargo, demostró ser demasiado rígido. Las proteínas son estructuras dinámicas y flexibles.

Una hipótesis formulada en 1958 por **Daniel Koshland** (nacido en 1920), 60 años tras el postulado de Fischer, encontró una confirmación brillante para la lisozima. Su teoría del "ajuste inducido" (en inglés *induced fit*) dice que el sustrato y la enzima, mejor que con el modelo rígido de llave y cerradura, deben compararse con una mano móvil y un guante arrugado, donde la mano (sustrato) y el guante (enzima) interaccionan.

Un guante no es un molde exacto de la mano, y puede existir en distintas formas, como puño o como guante abierto. Solamente cuando se introduce la mano se produce su ajuste espacial exacto (Fig. 2.6).

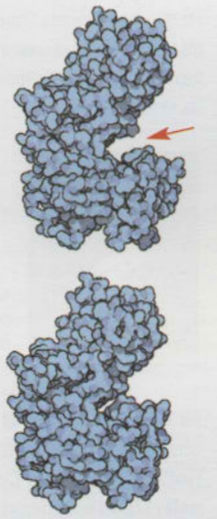


Fig. 2.6 La hexoquinasa, la primera enzima de la degradación de glucosa en las células, muestra tras la unión de glucosa (flecha) un cambio en su conformación (abajo).

Cuadro 2.2 Historia de la biotecnología: Cómo se descubrieron las enzimas

Las reacciones enzimáticas se observaron desde los tiempos más tempranos y se utilizaron en la práctica. Ya **Homero** describió la coagulación de la leche con la ayuda de zumo de higo (Fig. 2.7). Para la preparación del queso se usó el laboratorio del estómago de un ternero. Los animales salvajes sacrificados debían "colgarse" antes de su preparación para ser más gustosos. La exploración de las enzimas empezó ya a principios del siglo XVIII.

Como fermentación (en latín *fermentum*) se describe generalmente la descomposición de un sustrato en otro. En 1780, el italiano **Lazarro Spallanzani** (1729-1799) informó al francés **Antoine Ferchault de Réaumur** (1683-1757), el inventor de la primera escala de temperatura, de que la carne se licua con el jugo gástrico de las aves.



Lazarro Spallanzani (1729-1799)

A principios del siglo XIX se asumió en general que las fermentaciones son cambios químicos que se producen a partir de algunas formas especiales de materiales orgánicos, las enzimas.



Antoine Ferchault de Réaumur (1683-1757)

En 1814, el miembro de la Academia de Científicos de San Petersburgo, el alemán **Gottlieb Sigismund Constantin Kirchhoff** (1764-1833) demostró que existe una sustancia en las semillas de los granos germinados que causa la transformación del almidón en azúcar.

El director de una fábrica de azúcar parisina y más tarde descubridor de la celulosa, **Anselme Payen** (1795-1871), anunció en 1833 junto con su colega **Jean François Persoz** (1805-1865) un "principio licuado del almidón" a partir de la cebada germinada. Con ello se observaron algunas cualidades generales válidas para las enzimas: relativamente pequeñas cantidades de los preparados podían licuar grandes cantidades de almidón. Esta característica se perdía al calentar. La sustancia activa se pudo obtener en forma de polvo de la disolución y era de nuevo activa tras la redisolución en agua. La sustancia descrita, denominada **diastasa** (del griego *diastasis*, separación), fue la primera enzima de plantas que pudo analizarse en el laboratorio en forma purificada.

El cofundador de la enseñanza de células **Theodor Schwann** (1810-1882) consiguió, tres años más tarde, obtener y analizar en forma pura una enzima animal del jugo gástrico, la pepsina.



Jöns Jakob Berzelius (1779-1848) dudó en 1836 sobre miles de procesos catalíticos en todos los seres vivos

El gran químico sueco **Jöns Jakob Berzelius** (1779-1848) se avanzó a su tiempo con la observación de que los procesos fermentativos son procesos catalíticos (del griego *katalysis*, descomposición). Los catalizadores se definieron como cuerpos cuya simple presencia provoca actividades químicas, que no pueden tener lugar sin ellos.

Con una clara visión profética escribió en 1836:

"Llegamos a sospechar con motivos fundados que en las plantas y los animales vivos se producen miles de procesos catalíticos en tejidos y fluidos entre sí."

Mediante otros descubrimientos, sin embargo, el concepto "fermento" no está claro. En 1837, **Theodor Schwann** (1810-1882) descubrió concretamente que la putrefacción, o sea la descomposición de una sustancia y por lo tanto una fermentación, se produce con la intervención de microorganismos. Se originó una situación extraña. Se diferencia entre dos clases de fermentos, entre los "auténticamente organizados" (por ejemplo levaduras y otros microorganismos) y los solubles "no organizados" (por ejemplo diastasa). Los fermentos no organizados deberían poderse separar de los procesos vivos. Según una proposición de **Wilhelm Friedrich Kühne** (1837-1900), se describieron en 1878 como enzimas "para impedir malentendidos y evitar transferencias fatigosas".



Wilhelm Friedrich Kühne (1837-1900) denominó en 1878 enzimas a los "fermentos no organizados"

Los fermentos organizados fueron uno de los últimos bastiones del vitalismo, cuyos partidarios asumían un *vis vitalis* (fuerza vital) de origen divino. Al principio se pensó que los compuestos orgánicos no se generaban en el laboratorio, porque eran inherentes a una fuerza vital.

La síntesis de la urea a partir de materiales inorgánicos por **Friedrich Wöhler** (1800-1882) hizo fracasar esta hipótesis en 1828.



Friedrich Wöhler (1800-1882)

Escribió a Berzelius: "No puedo, por así decirlo, sostener mi agua química, y debo decirle a usted que he podido generar urea sin tener que precisar para ello riñones ni ningún tipo de animal, sea humano o perro".



Eduard Buchner (1860-1917), premio Nobel de química en 1907

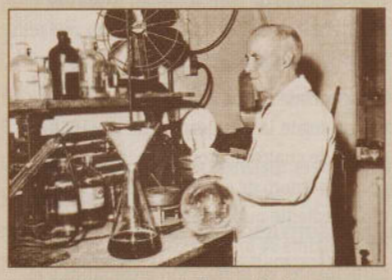
En 1897 **Eduard Buchner** (1860-1917) realizó el experimento decisivo que resolvió completamente la disputa entre Liebig y Pasteur. Él quería saber si la fermentación tam-

bién era posible sin células vivas y machacó las levaduras con un émbolo tras la adición de tierra de diatomeas (Kieselgur) en un gran mortero. Posteriormente presionó la masa conseguida y la envolvió en un fuerte lienzo, con una prensa hidráulica. El jugo de la presión de las levaduras, libre de células, puesto que no se descomponía, lo incorporó a una disolución de azúcar concentrada durante la noche. Tras un breve espacio de tiempo, sin embargo, en la disolución empezó a desarrollarse un gas activo: ¡se formaba dióxido de carbono!

¡Por primera vez se podía observar la fermentación alcohólica sin células vivas de levaduras, en una disolución libre de células! Por su descubrimiento revolucionario de la enzima "zimasa" Eduard Buchner obtuvo el premio Nobel de química en el año 1907.

Se demostró, dos años después de la muerte de Pasteur, que es posible una **fermentación también sin células vivas**.

Pasteur y Liebig, cada uno tenía razón a su manera: las fermentaciones eran causadas por microbios, pero en realidad en estas conversiones de los compuestos actuaban sus enzimas desde dentro (*in vivo*). Las enzimas son también capaces de actuar desde el exterior (*in vitro*) de las células vivas.



James B. Sumner en el laboratorio. A pesar de ser manco, fue un hábil experimentador: cristalizó ureasa

El siguiente resultado fue sensacional: ¡asombrosamente se pueden cristalizar enzimas! En 1926, el americano **James B. Sumner** (1887-1955) (Fig. 2.1) fue el primero que pudo obtener la enzima ureasa cristalizada a partir de habas de soja y analizar las propiedades de la proteína.

Su compatriota **John H. Northrop** (1891-1975) (Fig. 2.2) cristalizó entre 1930 y 1933 las enzimas de la digestión. Ahora era indiscutible, tras una larga lucha, que las enzimas son proteínas.

Sumner y Northrop obtuvieron juntos el premio Nobel en 1946.

Después de su interacción activa y tras **un estado de transición**, la enzima y el sustrato se combinan exactamente. Las enzimas no unen en su centro activo al sustrato en su configuración original sino en el estado de transición (Figs. 2.10 y 2.11).

Con el entusiasmo inicial se asumió que todas las enzimas trabajarían como la lisozima, según el principio de la distorsión del sustrato mediante la enzima –las causas de su alta capacidad catalítica son, sin embargo, mucho más complejas (Cuadro 2.5).

El "truco" más importante de las enzimas consiste en que, debido a su estructura proteica, unen a los sustratos en una hendidura o grieta en la molécula de la enzima para convertirlos a corto plazo. En el centro activo se encuentran, concentrados en el espacio más pequeño, los **grupos químicos altamente reactivos** ("efecto de proximidad", *proximity effect*).

El sustrato se introduce totalmente a través de las cargas en el centro –denominado algo poéticamente "efecto Circe"– y se convierte químicamente en fracciones de segundo. La propia enzima alcanza entonces de nuevo el estado de partida, de modo que tras repeler el producto pueda convertir otra molécula de sustrato.

Por el orden espacial compacto y la acción concentrada de los grupos reactivos en el centro activo de la molécula de enzima, la **energía de activación** requerida para causar la reacción química (entalpía de activación libre) disminuye drásticamente en comparación con la reacción sin enzima. Mediante la facilitación de la unión de los estados de transición, las enzimas aceleran esencialmente la consecución del equilibrio de las reacciones químicas (Cuadro 2.5).

En la zona de los lisozimas se podía estudiar de modo excelente cuáles son los grupos y fuerzas eficaces para constituir esta estructura en el espacio de un centro activo (Figs. 2.9 a 2.11):

La **estabilización de la molécula** se produce a través de los diferentes grupos laterales de los aminoácidos. Están ordenados en la cadena peptídica de tal modo que sobresalen, como las cerdas de un escobillón, hacia todos los lados. Con un estallido de la cadena pueden, por lo tanto, participar fácilmente en la interacción.

La molécula consigue una solidez especial mediante los enlaces químicos, que se forman juntos entre los grupos laterales que contienen azufre (S-H) coloca-

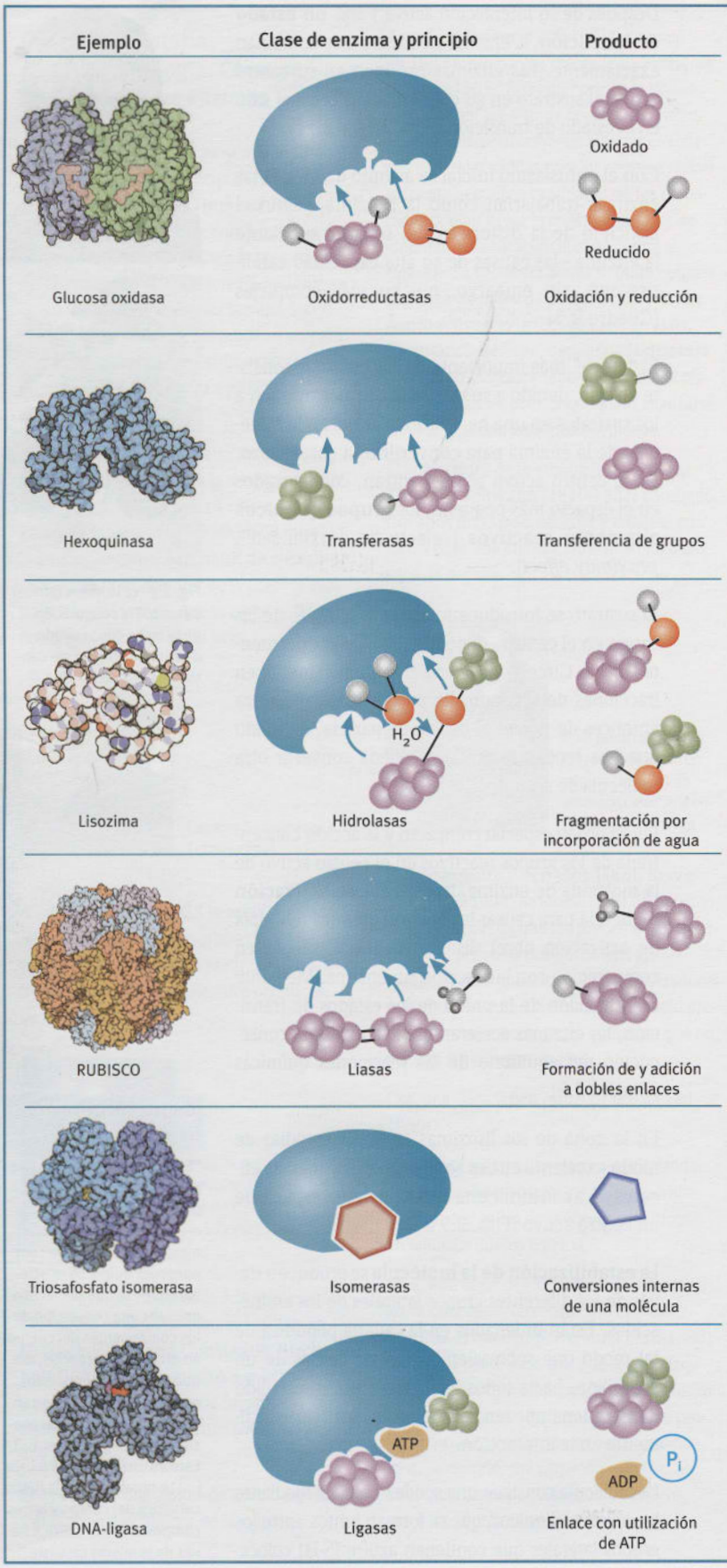




Fig. 2.7 Ya Homero (arriba) describió la coagulación de la leche con la ayuda de zumo de higo. Éste contiene la proteasa ficina.

Jöns Jacob Berzelius (1836):

"Está pues demostrado que muchos [...] cuerpos [...] poseen las propiedades de ejercer una influencia totalmente diferente sobre componentes químicos relacionados, en lo que respecta a producir una conversión de los componentes del cuerpo en otras circunstancias, sin que necesariamente estos componentes participen en ellas, en el caso de que ocasionalmente pueda ser. [...] Esto es una [...] nueva fuerza. [...] Lo nombraré [...] la fuerza catalítica del cuerpo y la descomposición se realiza a través de la misma catálisis."



Cuadro 2.3 Cómo se denominan y clasifican las enzimas

Émile Duclaux, un estudiante de Louis Pasteur, en 1883 había propuesto, para caracterizar una enzima, añadir al nombre del sustrato la terminación "asa". Así, por ejemplo, se nombraron las enzimas que degradaban éster como esterasas, las que fragmentaban celulosa como celulasas, las que fragmentaban proteínas como proteasas. Puesto que muchas sustancias pueden servir como sustratos de varias enzimas, pronto se incluyeron también los tipos de reacciones con los nombres, así por ejemplo glucosa oxidasa, glucosa isomerasa o glucosa deshidrogenasa.

Junto con ellos existieron también todos los nombres triviales posibles, en parte fantasiosos, como enzima de la respiración, enzima pH-5, enzima antiguo amarillo... Esto produjo muchos malentendidos; además, el número de enzimas conocidas crecía constantemente: en 1964 fueron 900, en 1968 había ya 1300, y hoy se describen detalladamente más de 3000 enzimas. A propuesta de la International Union of Biochemistry (IUB) se dividen todas las enzimas según su especificidad de actuación en seis clases principales. Después de todo, es asombroso que la gran variedad de reacciones en todos los seres vivos se pueda ordenar sólo en seis principios de actuación.

Cada enzima recibe además un número de código según la clasificación de la IUB, que consta de cuatro dígitos (clase, grupo, subgrupo, número de serie) separados uno de otro mediante puntos. El nombre exacto de la enzima se forma a partir de los sustratos participantes en la reacción enzimática y el nombre de la clase principal de la enzima.

Así, oficialmente, la glucosa oxidasa se llama:

β-D-glucosa: O_2 oxidorreductasa y tiene el número de código 1.1.3.4.

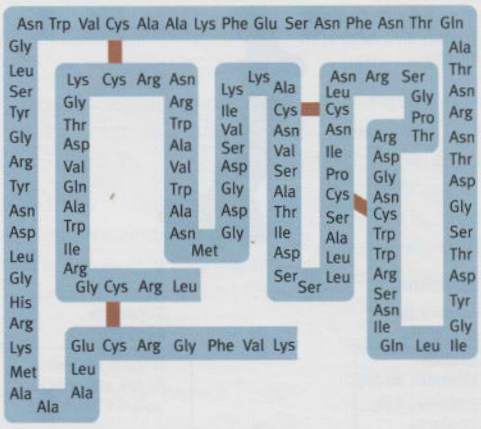
Puesto que muchos nombres de enzimas son exactos, pero inoportunos y trabalenguas, las principales enzimas se denominan todavía con sus "nombres de pila", o sea glucosa oxidasa, pepsina, etcétera. En las publicaciones científicas se debe mencionar adicionalmente el número de clasificación y el nombre oficial.



Émile Duclaux (1840-1904) propuso el sufijo "asa" para la nomenclatura de todas las enzimas

dos entre dos componentes de aminoácidos de cisteína. Los cuatro **puentes disulfuro (S-S)** así creados son el soporte crucial para la estructura espacial de la lisozima. Los iones metálicos pesados atacan, por otra parte, los puentes disulfuro de las proteínas, una razón para su toxicidad. Las enzimas son inhibidas de forma no competitiva por los metales pesados.

La **estructura espacial** en forma de esfera (Figs. 2.8 y 2.10) se estabiliza en un medio acuoso mediante grupos laterales polares y apolares de los aminoácidos. Los grupos polares son hidrófilos (afines al agua) y por ello se dirigen hacia fuera en el agua. Los grupos laterales apolares son en cambio hidrófobos (hostiles al agua) (Fig. 2.10). Intentan aislarse fuera del medio acuoso. Esto sólo lo consiguen colocándose juntos en el interior de la molécula enzimática y manteniéndola así unida, igual que las gotas de aceite se estabilizan en el agua. Además de las interacciones de los grupos laterales también se forman, sin embargo, fuertes enlaces entre átomos de oxígeno e hidrógeno cercanos del "esqueleto" de diferentes aminoácidos, los conocidos como puentes de hidrógeno.



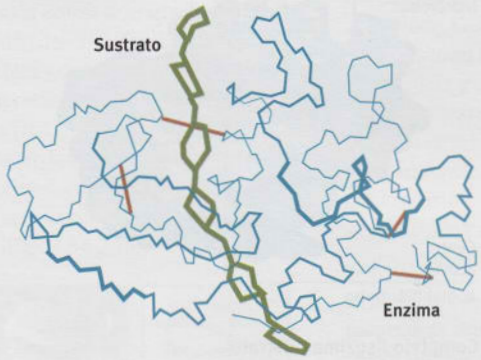


Fig. 2.8 Lisozima. Arriba: estructura primaria de la lisozima, serie (secuencia) de los aminoácidos en la molécula (están representados los 20 aminoácidos naturales; se abrevian según la nomenclatura internacional; los puentes disulfuro (SS) entre los restos de cisteína se destacan en color). Abajo: estructura terciaria de la lisozima, orden espacial de la cadena peptídica. De la enzima y del sustrato unidos al centro activo se representa, por claridad, sólo el "esqueleto central" de la cadena peptídica y del anillo de azúcar (los puentes disulfuro se destacan en color).

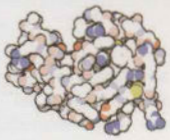


Imagen espacial de la lisozima de clara de huevo

2.3 Los cofactores sirven como herramientas a las enzimas complejas

No todas las enzimas son una molécula de proteína pura como la lisozima sino que utilizan una "herramienta", componentes químicos adicionales, conocidos como **cofactores**. Tales enzimas "cualificadas" tienen también un complicado mecanismo de reacción.

Los cofactores pueden consistir en uno o más **iones inorgánicos** (Fe^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} o Zn^{2+}) o complejas moléculas orgánicas, las **coenzimas**. Algunas enzimas necesitan al mismo tiempo ambos tipos de cofactores.

Las coenzimas son moléculas orgánicas que se unen en el centro activo de la enzima (o cerca de él); modifican la estructura del sustrato o transportan electrones, protones y grupos químicos entre enzima y sustrato, a menudo grandes distancias dentro de la molécula de la enzima, hasta que los liberan para utilizar de nuevo la enzima.

Muchas coenzimas se forman a partir de precursores de vitaminas. Por ello requerimos un suministro indudablemente bajo, pero ininterrumpido, de ciertas vitaminas. Por ejemplo, una de las coenzimas más importantes, la **NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido)**, se forma de la vitamina niacina. Las principales vitaminas solubles en agua del grupo B actúan de modo similar a la niacina como precursores de coenzimas.

Otto Heinrich Warburg (1883-1970, Fig. 2.3) descubrió la enzima de la respiración citocromo oxidasa (Cap. 1, Fig. 1.14) y el NAD. Su descubrimiento y la siguiente clarificación de su estructura fue un momento estelar de la bioquímica moderna. Si se carece de la vitamina niacina en la alimentación, determinadas enzimas (por ejemplo las deshidrogenasas) no pueden trabajar activamente en el cuerpo, y los afectados enferman de la avitaminosis pelagra. Warburg presentó la **prueba óptica de Warburg**, en la cual el NADH reducido puede ser cuantificado a la longitud de onda de 340 nm (el NAD^+ oxidado no absorbe la luz de longitud de onda 340 nm). Por ello se pueden medir importantes reacciones enzimáticas, tales como el análisis de glucosa con glucosa deshidrogenasa, aún utilizado hoy (véase Cap. 10).

Las **vitaminas** B_2 (riboflavina), B_{12} (cianocobalamina) y C (ácido ascórbico) se producen mundialmente a toneladas por procedimientos biotecnológicos (Cap. 4).

Los **grupos prostéticos** son cofactores unidos potentemente. El grupo prostético de la glucosa oxidasa es la flavina adenina dinucleótido (FAD). La peroxidasa y el citocromo P-450 tienen un grupo hemo, como ocurre en la mioglobina y la hemoglobina. El grupo hemo consta asimismo de un ani-

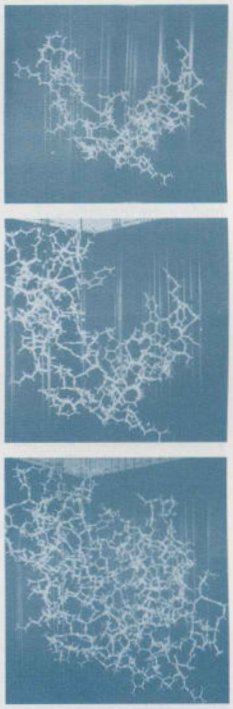


Fig. 2.9 El modelo espacial de la lisozima construido como lo hizo David Phillips. Arriba: los primeros 38 restos aminoácidos. En el centro: restos 1-86. Abajo: restos 1-129, la molécula completa

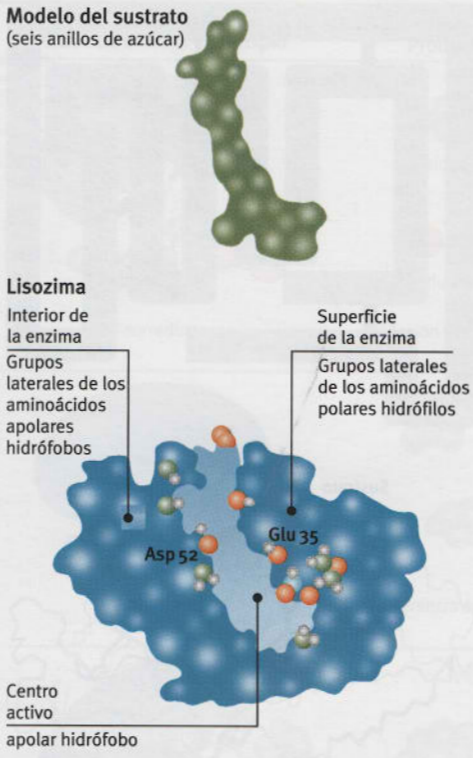


Fig. 2.10 Estructura terciaria de la lisozima y su sustrato. Se muestran todos los átomos de ambas moléculas; se destacan los grupos laterales de los aminoácidos del centro activo, que participan en la unión y conversión del sustrato. Asp 52 y Glu 35 significan ácido aspártico en la posición 52 de la cadena peptídica y glutámico en la 35. Posiciones de 129 aminoácidos.

Fig. 2.11 Abajo: mecanismo temporal de la rotura del sustrato –se muestran sólo los anillos 4 y 5 del azúcar– con los átomos más importantes de su "esqueleto central", entre los cuales se realiza la separación.

1. Unión del sustrato al centro activo.

2. Distorsión del anillo 4º del azúcar.

3. Un protón (H^+) del ácido glutámico (Glu) ataca la unión entre los anillos 4º y 5º del azúcar.

4. Se origina un ion carbonio (C^+) cargado positivamente en el anillo 4º del azúcar, que se estabiliza mediante un grupo cargado negativamente del ácido aspártico (Asp). La unión entre los anillos 4º y 5º se separa, el primer producto (anillos 5º y 6º) abandona el centro activo. El ion carbonio se libera con un ion hidroxilo (OH^-) de una molécula de agua. El protón de la molécula de agua completa de nuevo el lugar no ocupado del ácido aspártico en el centro activo.

5. El segundo producto a separar está, por lo tanto, unido (anillos 1º a 4º) y se repele.

6. La enzima se regenera completamente y puede unir la molécula de sustrato y convertirla. Se convierten dos moléculas de sustrato por segundo.

llo de porfirina, en cuyo centro está unido un ion de hierro.

En cambio, las coenzimas están enlazadas holgadamente, unen sustratos y los transforman, y por lo tanto también los utilizan. Al contrario que los sustratos, sin embargo, son usadas por una variedad de enzimas (por ejemplo NADH y NADPH en casi todas las deshidrogenasas), regeneradas en las células (véase 2.13) y de nuevo utilizadas. Las enzimas que utilizan la misma coenzima son, por regla general, similares mecanísticamente.

Los cofactores son las "herramientas" de muchas enzimas. La parte proteica de la enzima encarna al "artesano", del cual depende que trabaje efectivamente con las herramientas. Sin su herramienta, naturalmente, está indefenso incluso el mejor artesano, pero sin artesano la herramienta más bonita es inútil.

2.4 Las enzimas pueden obtenerse de animales, plantas y microorganismos

Con el descubrimiento de las **enzimas de la digestión** se desarrollaron en el siglo XIX los métodos de obtención de enzimas de animales (Cuadro 2.2). Aún hoy se producen preparados crudos, como la pepsina de la membrana de la mucosa gástrica del cerdo y del buey, enzimas de laboratorio a partir de estómagos de ternero y mezclas enzimáticas de tripsina, quimotripsina, lipasas y amilasas de la glándula de la digestión (páncreas) del cerdo. El vino de pepsina de la farmacia contiene principalmente pepsina de estómago de cerdo. Con fines analíticos y medicinales se pueden preparar enzimas altamente purificadas de órganos con alto rendimiento metabólico (carne muscular, hígado, bazo, riñón, corazón e intestino delgado).

Además de las enzimas de los animales se estudian también las **enzimas de las plantas** por sus posibilidades de aplicación en la industria. Los cereales liberan, tras el hinchado y la germinación de la malta, la enzima degradadora del almidón (amilasa) y las fragmentadoras de proteína proteasas, que se utilizan desde la antigüedad en la fabricación de cerveza y la destilación de licores.

Del jugo de las plantas tropicales se produjeron de modo más simple ya en el siglo pasado proteasas con alto rendimiento: papaína y quimopapaína del árbol de la papaya (Fig. 2.19), ficina del jugo de la higuera (Fig. 2.7) y bromelina de tallos de piña. Estas proteasas exóticas se utilizan aún hoy, por ejemplo para "ablandar" (*tenderizing*) la carne

Cuadro 2.4 Historia de la biotecnología: El resfriado de Fleming y sus consecuencias enzimológicas

A pesar de su resfriado, **Alexander Fleming** (1881-1955) trabajó en el año 1922 en su laboratorio microbiológico en Londres. Su creciente curiosidad por la investigación le llevó a incorporar algunas gotas de su mucosidad a un cultivo de bacterias. Grande fue su sorpresa al observar, unos días más tarde, que algo en la mucosidad había matado las bacterias. Puesto que la sustancia era claramente una enzima y desintegraba (lisaba) determinados microbios, la denominó **lisozima**. Posteriormente Fleming descubrió la lisozima en todas las secreciones del cuerpo, sobre todo en las **lágrimas**.



Alexander Fleming (1881-1955) descubrió primero la lisozima antes de que más tarde descubriera la penicilina.

Se cuenta que sus colaboradores, estudiantes y visitantes debían entregar a Fleming sus lágrimas. Especialmente rica en lisozima era también la **clara del huevo** (en inglés, *egg white*) de gallina. Aquí se pudo sospechar un mecanismo de protección frente al ataque bacteriano. Para Fleming la decepción fue muy grande, pues la lisozima, tan fuerte contra los microbios inofensivos, no tenía efecto contra las bacterias que provocaban enfermedades.

Transcurrieron dos años hasta que Fleming, en un experimento también aparentemente fortuito, descubrió un antibiótico sumamente efectivo: la **penicilina** (véase Cap. 4).

La lisozima debe ocupar, por lo tanto, un lugar de honor en la historia de la biología moderna. Fue la **primera enzima** de la cual se aclaró su estructura espacial y se entendieron al detalle atómico sus propiedades. El sustrato de la lisozima es una molécula compuesta de anillos de azúcar, de ácido acetilmurámico y de acetilglucosamina (Fig. 2.10), así llamado mucopolisacárido, que sirve como componente de las paredes celulares de las bacterias.

Cuando la lisozima fragmenta su sustrato, la célula se permeabiliza, toma líquido y estalla por la elevada presión osmótica en el interior de las células.

En 1963 se aclaró la secuencia de aminoácidos (estructura primaria) de la lisozima de la clara de huevo (Fig. 2.8).

Los 20 aminoácidos se diferencian por sus grupos laterales. Sin embargo, no estaba claro cómo este hilo largo de la proteína, con sus 129 aminoácidos y en conjunto 1950 átomos, puede formar un centro activo y unir y transformar un sustrato.

El **análisis estructural de rayos X** permitió establecer la estructura espacial de la lisozima. Tras la exitosa aclaración de la estructura espacial del colorante rojo de la sangre hemoglobina y de la proteína muscular mioglobina (premio Nobel 1962) por John C. Kendrew (1917-1997) y Max F. Perutz (1914-2004), la lisozima fue la tercera proteína y la primera enzima cuya estructura espacial se determinó con ayuda de este método (Figs. 2.8 a 2.10).



David Philipps (1924-1999) y los cristales de lisozima.

En 1960 **David Philipps** (1924-1999) y sus colegas de la Royal Institution, en Londres, empezaron con el trabajo. Primero se cristalizó la proteína. En la primavera del año 1965 se terminó la primera imagen espacial de la lisozima, que no mostró una molécula claramente estirada en hilo sino una estructura compacta con una hendidura. La sorprendente profundidad de la molécula de lisozima debía contener el centro activo. ¡Por primera vez se había hecho visible el centro activo de una enzima analizando la estructura por rayos X!

Pero con la imagen espacial no se podía mostrar cómo se une y fragmenta el sustrato en el lugar de donde viene la energía para la fragmentación. Philipps construyó, basándose en la imagen espacial, un **modelo espacial** de la lisozima pedazo a pedazo uniendo cintas y bolas (Fig. 2.9).

Al mismo tiempo construyó un modelo de cintas de una parte del sustrato, que interaccionaba con la lisozima. Consistía en seis anillos de azúcar encadenados, todos con forma de silla.

Tres anillos de azúcar encajaban exactamente bien, cumpliendo el principio de la llave-cerradura, en la mitad superior de la hendidura; el cuarto no entraba bien en la hendidura en su forma de silla normal. Algunos de sus átomos entraban en conflicto con los grupos laterales de los aminoácidos en el centro activo.

Philipps adaptó el modelo de cintas del cuarto anillo de azúcar de su forma de silla natural a una extendida fragmentada anormal "forma de bañera". ¡Ahora encajaba exactamente bien! Como en el modelo, la lisozima debía funcionar distorsionando el cuarto anillo de azúcar, y con ello encajaba bien. El quinto y sexto anillos se encontraban bien ajustados en la hendidura tras la distorsión del cuarto anillo, sin otra inflección adicional. Justo entre el cuarto anillo girado y enganchado y el quinto anillo normal se fragmenta el sustrato (Fig. 2.11).

La hendidura de la enzima se forma principalmente de aminoácidos apolares, cuyos grupos laterales no llevan ninguna carga eléctrica. Directamente junto al enlace fragmentado, entre el cuarto y el quinto anillos, se encontraron sin embargo los grupos laterales polares del ácido aspártico (Asp) con una fuerte carga negativa. Contrariamente, por el otro lado la hendidura contiene los grupos laterales del ácido glutámico (aminoácido Nº 35) (Fig 2.11). Ambos grupos laterales tomaron "en las tenazas" las uniones formalmente de rotura. Por primera vez se aclaró el **mecanismo** de una **reacción enzimática** hasta los detalles atómicos. En el modelo de la lisozima se pudieron estudiar además de modo excelente las leyes generales de la formación de las enzimas.

También el modelo de la lisozima proporcionó otra explicación: en realidad se esperaba, según el **principio de llave-cerradura** de Emil Fischer, que el sustrato entrase exactamente en el centro activo, y sin embargo el sustrato se adaptaba sólo tras la distorsión mediante la enzima en el centro activo. No obstante, esto no era suficiente. No sólo se modificaba el sustrato; como demostró el análisis estructural de rayos X, se estrechaba y profundizaba también la hendidura de la lisozima mediante la unión del sustrato. Era, por así decirlo, una cerradura de goma con una llave de goma, o mejor un **ajuste inducido**, como el de una mano y un guante.



Fig. 2.12 La araña zancuda *Pholcus* pica a un mosquito con su aguijón en una de las largas patas de éste. El jugo digestivo se inyecta para digerir a la víctima desde dentro, y a través de esta "pajita" sorber hasta vaciar el cuerpo del mosquito por completo. Esto dura hasta 16 horas, porque primero el jugo de la enzima digestiva debe ser inyectado a través de la estrecha patita del mosquito en el cuerpo, y también en las otras cinco largas y estrechas patas, antes de que la araña zancuda pueda sorber el "cocktail mosquito" en dirección contraria.





Fig. 2.13 Jokichi Takamine (1854-1922), arriba, usó como empresario una de las primeras enzimas microbianas; abajo: su medio de ayuda para la digestión Taka-Diastase.

como ayuda en la digestión o para la limpieza de lentes de contacto (Fig. 2.18).

En Europa, por otro lado, la producción de enzimas de plantas es difícil. La producción y el contenido de la enzima dependen mucho de la temporada del año, y la renovación de una gran cantidad de plantas es muy compleja. Las enzimas de animales se acumulan principalmente como subproductos en la producción de carne; las enzimas de plantas requieren un uso elevado de material de partida. Ambas fuentes enzimáticas no pueden cubrir la demanda constantemente creciente de enzimas. Los **microorganismos** fácilmente cultivables se consideraron, por lo tanto, como nuevas fuentes enzimáticas.

En 1894 empezó la utilización industrial con una patente del japonés Jokichi Takamine (1854-1922) (Fig. 2.13), que fue a Peoria, Estados Unidos, para trabajar allí. Peoria desempeñó más tarde un importante papel en la producción de penicilina (véase Cap. 4). El método patentado por Takamine del **cultivo en superficie (cultivo de Emmer)** fue sencillo y genial: de la paja de trigo se generan alimentos y sales de nutrientes. Tras la inyección con esporas de *Aspergillus oryzae*, almacenó la paja impregnada en jaulas dentro de cámaras incubadoras. Después de que el moho hubiera crecido, la paja se lavó en una disolución salina para extraer las enzimas eliminadas de las células (amilasas, proteasas). Hasta el final de la Segunda Guerra Mundial había en Estados Unidos fábricas de enzimas, que diariamente generaban hasta 10 t de "paja con moho". Ya hacia finales de los años 1950 se aplicaron mediante los **cultivos sumergidos**, en los cuales se "sumergieron" los mohos.

Evidentemente, las ventajas de la **utilización de microorganismos** como fuentes de enzimas son obvias: pueden producirse rápidamente, en cantidades grandes, relativamente baratas y con independencia de la ubicación y la temporada del año. Aplicando mutantes apropiados es posible la inducción y selección, para alcanzar rendimientos extremadamente elevados de enzimas. Finalmente se pueden producir mediante ingeniería genética "enzimas al gusto" a partir de microorganismos manipulados y mediante el diseño de proteínas.

Junto a los altos rendimientos de enzimas, se exige una alta estabilidad de éstas para su aplicación industrial. En la naturaleza existen muchos microorganismos en condiciones extremas, de modo que existen también enzimas especialmente estables en sus células. Los **microorganismos termófilos** (afines al calor) de las fuentes calientes del parque nacional americano de Yellowstone o de Kamtschatka poseen inevitablemente también enzimas estables al calor, pues de lo contrario no podrían existir. Un ejemplo es la Taq-polimerasa de *Thermus aquaticus* (Cap. 10), que sin la ingeniería genética hoy sería impensable. Tales enzimas termoestables se encuentran incluso en microorganismos de los habituales montones de abono vegetal, en los que se originan altas temperaturas. En los mares de agua salada se encuentran las **bacterias halófilas** (afines a la sal). Las **enzimas psicrófilas** (afines al frío) se aíslan de microorganismos de la Antártida.

2.5 Las hidrolasas extracelulares degradan los biopolímeros en pequeñas unidades utilizables

El enfoque principal de la producción de enzimas microbianas se encuentra en las enzimas hidrolíticas simples (proteasas, amilasas, pectinasas), que degradan polímeros naturales, como proteínas, almidón o pectinas. Las enzimas se extraen de los microorganismos al medio para ampliar las fuentes de alimento. Estas **enzimas extracelulares** fragmentan las enormes moléculas del sustrato fuera de la célula en trozos pequeños, y así los hacen disponibles para los microorganismos. En el reino animal esto se denomina digestión extraintestinal, y ocurre por ejemplo en las arañas (Fig. 2.12).

No es de extrañar que hasta ahora las enzimas extracelulares se produzcan preferiblemente de forma industrial, porque pueden obtenerse de modo simple y barato del medio y no son necesarios una extracción celular inoportuna y cara ni procesos de purificación. Puesto que una célula bacteriana contiene mil enzimas diferentes, una **enzima intracelular** (o sea, una enzima que permanece en la célula) debe separarse de todas las otras enzimas y estructuras celulares. Las proteínas se diferencian tanto, en dos características, que se pueden usar estas diferencias para separarlas: el peso molecular y la carga eléctrica.

Todos los procesos de separación de proteínas conocidos se basan en estas diferencias: precipitación con sales, recorrido en un campo eléctrico (electroforesis), unión a portadores cargados o descargados (cromatografía), espectrometría de masas y otros métodos (Cap. 10).

2.6 Las amilasas mezclan, cuecen y trenzan

El duque bávaro Guillermo IV (Fig. 1.28, pág. 21) promulgó en 1516 la **ley de pureza**. Dice que "[...] no se deben usar ni utilizar en ninguna cerveza más materiales que cebada, lúpulo y agua", y sigue en vigor en Alemania. En los principales países, sin embargo, ha cambiado por motivos económicos y la malta se ha reemplazado total o parcial-

Cuadro 2.5 El truco de las enzimas

Las enzimas aceleran las reacciones químicas en un factor de 100 millones a un billón (10^8–10^{12}). Asumamos que una reacción catalizada por enzimas se acabe completamente en un segundo; la misma reacción, con un factor teórico de 10^{10}, requiere para acabarse ¡3000 años a una velocidad de caracol! Su velocidad sería apenas medible. La variedad de reacciones metabólicas en el organismo sería tan lenta sin enzimas que no tendrían ninguna utilidad. Las enzimas hacen posible la vida.

Para que los materiales puedan reaccionar unos con otros se deben activar, lo que significa que necesitan un estado capaz de reaccionar. La energía que debe utilizarse para ello se denomina **energía de activación**. Se puede ilustrar el recorrido energético de una reacción química con una gráfica con apariencia de montaña (véase Fig. abajo). Los **materiales de partida** son, pues, comparables a piedras que se encuentran en un desfiladero en una vertiente de la montaña, evitando el valle, y sólo pueden rodar hacia el valle (o sea, pueden transformarse en **productos**) si se alcanza la correspondiente energía de activación para resbalar atravesando el pico de la montaña. En las reacciones químicas, esta energía de los materiales se puede proporcionar, por ejemplo, mediante aumentos de temperatura o presión. ¡Eso por supuesto sería mortal para una célula viva!

Generalmente todos los catalizadores rebajan la energía de activación (entalpía de activación libre o de Gibbs). Llegan ahora, volviendo a la imagen, hasta el pico de la montaña, y necesitan solamente una energía baja para vencerlo. Esta menor energía requerida puede alcanzarse fácilmente y a menudo. Se pueden comparar los catalizadores también con un guía de montaña, que en lugar de a través del pico conduce por pasos de montaña, con un gasto considerablemente menor. Los estados de equilibrio de la reacción se simbolizan con el desfiladero (estado de partida) y el valle (estado final); en medio hay un estado de **transición** de los complejos activados.

Las enzimas no modifican la situación del equilibrio de la reacción (esto es significativo para cambiar la profundidad del desfiladero o del valle), sino que simplemente posibilitan una **consecución** considerablemente **más rápida** de este **equilibrio**. Con ello aceleran un proceso que, incluso sin ellas, transcurriría más lentamente (en muchos casos sería desmesuradamente lento).

Cómo ocurre esto, sin embargo, es polémico para el enzimólogo. No hay, obviamente, un esquema válido en general para todas las enzimas.

Una posibilidad la hemos visto con la lisozima (Figs. 2.8 a 2.11): el sustrato se deforma mediante la enzima, utilizada en un lugar tenso (estado de transición), a partir del cual puede escapar mediante la formación del producto.

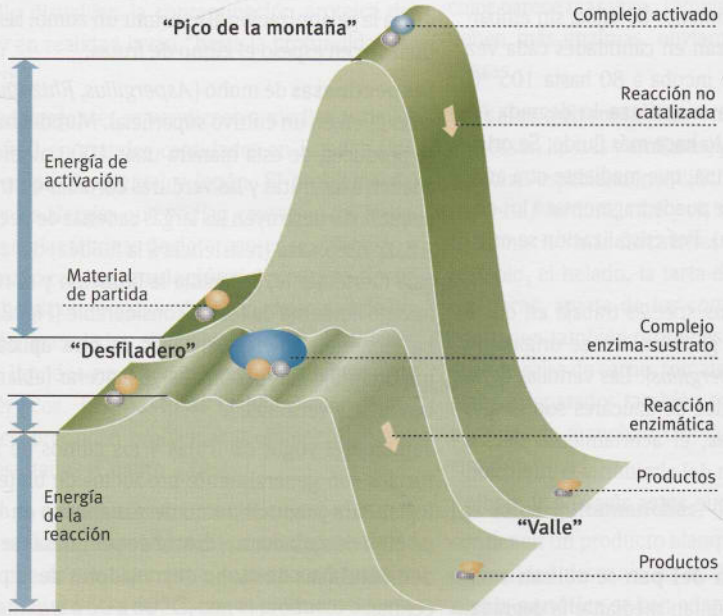


Unión del sustrato (rojo) al centro activo de la lisozima (azul)

Una mayor cantidad de energía para la reacción se obtiene seguramente con la unión del sustrato al centro activo. Las sustancias, que deben encontrarse primero por casualidad en una disolución, se conducen por la enzima al centro activo en una **estrecha vecindad**. Su oportunidad de reaccionar unos con otros es entonces mucho mayor.

En los centros activos están concentrados en un pequeño espacio los **grupos químicos altamente reactivos** de la enzima, ordenados espacialmente, de modo que tienen un contacto directo con los enlaces del sustrato que se deben cambiar. Éstos sufren así un "bombardeo" masivo dirigido y coordinado. Debido a que el centro activo está formado principalmente por grupos apolares, esta zona de la enzima es comparable con un disolvente orgánico (apolar). Las reacciones orgánicas transcurren en medios de disolución orgánicos apolares generalmente más rápido que en el agua polar. En el entorno orgánico del centro activo, por lo tanto, hay unos pocos grupos laterales de aminoácidos polares cargados "superreactivos" en comparación con su comportamiento en disolución acuosa.

De dónde parte la superioridad de las reacciones de las enzimas frente a las reacciones químicas "normales" no catalizadas, y también respecto a aquéllas con catalizadores técnicos, está claro a partir de los denominados factores. De ellos resulta que la enzima debe ser una **molécula encadenada enorme**. Sólo así, mediante el plegamiento de los grupos reactivos requeridos, pueden concentrarse en un lugar, de modo que sean eficaces en el mismo tiempo y en el mismo sitio. Por ello, una molécula de enzima no es una estructura formal sino una estructura factible de flexibilidad y elasticidad.



Comportamiento energético en una reacción no catalizada químicamente (detrás) y una catálisis enzimática (delante). La energía de activación para ambas reacciones se diferencia considerablemente.



Fig. 2.14 Al empresario alemán e inventor de la baquelita Otto Röhm (1876-1939), de Darmstadt, alumno de Eduard Buchner, se le ocurrió a principios del siglo XX purificar agua sucia lavándola con un extracto de enzimas de páncreas (glándula de la digestión). Con su empresa produjo en 1914 el detergente "Burnus", que contiene proteasas pancreáticas de cerdo.



Fig. 2.15 El detergente "Burnus" del año 1914, que contenía proteasas de páncreas.



Fig. 2.16 Las pectinasas licuan la fruta.

mente por cereales no germinados, maíz o arroz. Puesto que la materia sustituta apenas posee amilasas, los preparados enzimáticos deben contener amilasas, glucanasas y proteasas de moho o bacterias, añadidos como "enzimas para la fabricación de cerveza".

Los alemanes han llegado mientras tanto al tercer lugar en producción de cerveza (114 millones hL en 1998), por delante de Estados Unidos (236 millones hL) y China (178 millones hL). A la vuelta del milenio, los fabricantes de cerveza de todo el mundo producían por año aproximadamente 1500 millones de hectolitros de cerveza, con un valor de producción de 50 000 millones de euros. Los procesos básicos enzimáticos siguen siendo, sin embargo, los mismos que hace 2000 años en el antiguo Egipto.

El **almidón** de los cereales se degrada enzimáticamente a azúcar, que entonces se fermenta alcohólicamente mediante las levaduras. El almidón es un material de reserva de las plantas y se encuentra en los alimentos más importantes de humanos y animales. Es un polisacárido y consta exclusivamente de eslabones de glucosa. Diferentes amilasas degradadoras de almidones en la **malta** fragmentan de distintos modos los enlaces entre moléculas de glucosa y liberan fragmentos de almidón de diversos tamaños. La malta contiene sólo un 0,5 a 1 % de amilasas, pero es con diferencia en todo el mundo la mayor enzima cuantitativamente hablando. Para obtener la energética **glucosa** (azúcar de uva) se debe degradar por completo, si es posible, el almidón de patatas o de maíz. Anteriormente esto se hacía con ácidos a altas temperaturas sobre el almidón (hidrólisis ácida).

Desde hace aproximadamente 20 años, sin embargo, las amilasas se utilizan en cantidades cada vez mayores. El almidón se incuba a 80 hasta 105 °C durante tres horas y la **α-amilasa** lo degrada en pequeños fragmentos y lo hace más fluido. Se origina una mezcla de dextrina, que mediante otra amilasa, la **glucoamilasa**, se puede fragmentar a los elementos básicos (glucosa). Por cristalización se origina glucosa pura.

La α-amilasa de *Bacillus species* trabaja en dos a tres horas a 95 °C. La glucoamilasa se origina de mohos (de la línea *Aspergillus*). Las ventajas de la fragmentación enzimática de azúcares son el alto rendimiento en glucosa, el acortamiento de los tiempos de degradación del almidón y la supresión del tratamiento ácido que antes afectaba al medio ambiente.

También en la **cocción del pan** se utilizan enzimas. Las amilasas aumentan mediante la degradación de almidón el contenido de azúcar en la masa y aceleran con ello la fermentación. Las proteasas, sin embargo, suelen degradar la proteína "pegamento" (gluten) en la masa. El gluten une una parte de agua y forma un esqueleto en forma de gel. Las proteasas de mohos degradan el gluten, la masa puede alargarse y mantiene mejor las burbujas de dióxido de carbono dentro. El volumen de los "panecillos enzimáticos" es mayor que si no tuvieran enzimas.

En la **industria textil** (por ejemplo en la fabricación de pantalones vaqueros) se trata el hilo de algodón con almidón como medio de alisado; con ello se pegan las fibras y se hace más resistente a los esfuerzos mecánicos al tejer.

Sin embargo, el almidón debe retirarse del tejido. Para el **trenzado** se utilizó al principio amilasas de malta y páncreas, pero hoy se usan amilasas de bacterias, que son relativamente estables al calor, de modo que pueden trabajar a temperaturas más altas y el proceso transcurre muy rápido. Al mismo tiempo puede blanquearse eficientemente a estas temperaturas con un proceso de baño.

2.7 Las pectinasas prensan más zumo de fruta y verduras

Los zumos de frutas y verduras son el "caballo de carreras" de la vida sana. Al exprimir frutas y verduras, sin embargo, el rendimiento en el zumo prensado disminuye debido a la pectina de alto peso molecular. La **pectina** –obtenida del corazón de la manzana– es conocida por las amas de casa por ser un método gelatinizante de ayuda para la fabricación de confituras. Sin embargo, precisamente no se desea la gelatinización al exprimir un zumo: las pectinas hacen espeso el zumo de frutas.

Las **pectinasas** de moho (*Aspergillus, Rhizopus*) se consiguen en un cultivo superficial. Mundialmente se producen de esta manera unas 100 t al año. Se añaden a las frutas y las verduras cortadas en trozos pequeños y destruyen las largas cadenas de pectina. Así, la viscosidad (resistencia a la fluidez) del zumo baja fuertemente, se facilita la filtración y el rendimiento aumenta de forma considerable (Fig. 2.16). La alimentación de los bebés es otra aplicación importante de las pectinasas, al macerar (ablandar) las frutas y verduras.

También el yogur de frutas y los zumos de fruta turbios son generalmente productos de biotecnología. Para producir zumo de zanahorias en lugar de puré de zanahorias, aparte de pectinasas se añaden **celulasas** de moho degradadoras de la pared celular.

2.8 Los biodetergentes son la aplicación más importante de las enzimas hidrolíticas

La eliminación del contenido proteico de las manchas (por ejemplo de leche, yema de huevo, sangre o cacao) es difícil. Las **contaminaciones proteicas** son muy difícilmente solubles en agua, y a altas temperaturas las proteínas coagulan sobre las fibras del tejido y se mantienen aún más firmemente. La ropa sucia contiene polvo, hollín y materia orgánica, como grasas, proteínas, hidratos de carbono y colorantes, juntos. En especial la suciedad se pega a la ropa de cama y la ropa interior. Las grasas y las proteínas actúan como un pegamento para la suciedad.

Con el lavado se elimina de los tejidos la contaminación grasa mediante productos activos de superficie (**detergentes**), pero las proteínas permanecen pegadas. Otto Röhm (1876-1939) (Fig. 2.14), alumno de Eduard Buchner, fue el primero en utilizar una enzima para el lavado (Fig. 2.15).

Sin embargo, las enzimas pancreáticas usadas no eran muy estables y además resultaban demasiado caras. Los biodetergentes no podían producirse masivamente. Esto cambió cuando en 1960 se encontró en *Bacillus licheniformis* la **subtilisina**, que actúa en medios alcalinos.

Hoy los biodetergentes están muy extendidos. Las **proteasas alcalinas**, de las cuales se añade aproximadamente 200 mg por kg de polvos de lavado, actuan óptimamente en la colada. Tienen una **baja especificidad de sustrato** y por ello son un "reducelotodo" que degradan el pegamento proteico a aminoácidos y péptidos de cadena corta (Fig. 2.17). Con ello disuelven la contaminación proteica del tejido y en realidad lavan "hasta la profundidad de los poros".

Los biodetergentes se vendieron a mediados de los años 1960 en grandes cantidades en Estados Unidos, Europa Occidental y Japón. El problema del polvo y las alergias que podían causar en los trabajadores en las fábricas de detergentes se solucionó a corto plazo con la **granulación** del producto. Se utilizan ahora comercialmente y con capacidad de floculación granulados sin polvo (perlas). Los detergentes líquidos no ofrecen ningún problema para los alérgicos. Las **pastillas** (tabletas) compactas tampoco producen problemas y obtienen los mismos resultados (Cuadro 2.6).

Debido al creciente gasto energético cobró importancia en los últimos años una propiedad del detergente: puesto que las enzimas participantes trabajan óptimamente a 50 a 60 °C, con el producto de lavado enzimático se obtiene el máximo efecto de lavado también a 50 a 60 °C (sin que el agua hierva) (Fig. 2.17). Con este método se ahorra una valiosa energía. Junto a las proteasas a menudo también se añaden **amilasas** para degradar restos de almidón y **lipasas** para degradar lípidos.

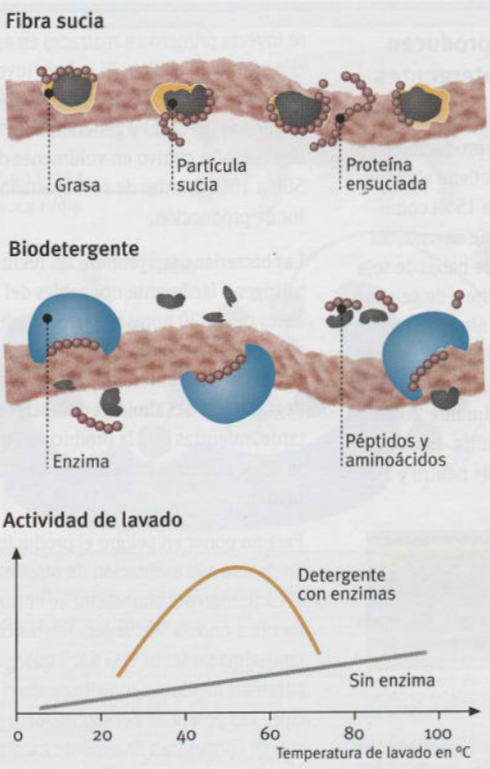


Fig. 2.17
Biodetergente y su principio de acción.

Las **celulasas** en los detergentes completos degradan las microfibras que sobresalen de las fibras, de modo que el algodón tiene un tacto más suave y el color parece más vivo. También los lavavajillas contienen más enzimas, obviamente más amilasas y lipasas.

Las **sales quitamanchas enzimáticas** contienen proteasas, lipasas y amilasas, y no disuelven sólo las manchas especialmente difíciles de vino tinto, hierba, fruta, verdura, café y té, sino también las manchas mucho más frecuentes de mezclas. Así, por ejemplo, el helado, la tarta de fruta y la crema de espinacas, aparte de los componentes coloreados contienen también proteínas y grasas. En las manchas de salsa de carne, tomate "ketchup" y muchos platos preparados también se encuentran los cuatro tipos de manchas: colorante, proteína, grasa y almidón.

Las **sales quitamanchas**, como los detergentes, contienen un producto blanqueador oxidativo, que en realidad destruye las enzimas. Mediante **ingeniería genética** se han adaptado óptimamente las



Fig. 2.18 Limpiador enzimático para lentes de contacto (arriba); la papaína de la papaya ayuda en la digestión (abajo).



Fig. 2.19 Árbol de la papaya (*Carica papaya*).

Cuadro 2.6 Cómo se producen las enzimas de los detergentes

En grandes tanques de 10 000 a 100 000 L de capacidad se cultivan los productores de enzimas. El nutriente contiene almidón degradado de antemano (5 a 15%) como fuente de carbono y fuente de energía, así como un 2 a 3% de harina de habas de soja y un 2% de albúmina de leche o de gelatina como fuentes de proteína y nitrógeno baratas, además de fosfato para la estabilización del grado de acidez (pH). Se estabiliza el medio a 121 °C con vapor durante 20 a 30 minutos y entonces se enfría. El cultivo sigue a 30 a 40 °C con un pH neutro y buena ventilación.



Principio de actuación de los biodetergentes

Se genera un cultivo puro de una línea seleccionada especial de *Bacillus licheniformis* y se inyecta primero en matraces en agitación con medio de cultivo. El cultivo inyectado (*inóculo*) se coloca en un biorreactor más pequeño (10-50 L) y generalmente se almacena en otro cultivo en volúmenes de unos 500 a 1000 L antes de ser inyectado al reactor de producción.

Las bacterias usan primero las fuentes de nitrógeno fácilmente utilizables del medio; antes de 10-20 horas se puede analizar en el medio la proteasa subtilisina. La α-amilasa colocada de antemano para la posterior degradación del almidón desaparece más tarde, mientras que la producción de proteasa sigue mientras haya proteínas en el medio.

Para no poner en peligro el producto deseado debido a la asentación de otros microbios, el contenido del biorreactor se enfría rápidamente a unos 5 °C. Se separan las células (aproximadamente 100 g L^{-1}) tras unos preparativos mediante centrifugación o filtración. Las proteasas del sobrenadante del cultivo se concentran finalmente mediante ultrafiltración. En ésta, las membranas sirven de unidades de separación, pues tienen poros tan finos que no pueden pasar las moléculas disueltas, como las proteasas, a pesar de poder pasar agua y las sales disueltas y otras pequeñas moléculas. Con ello la proteasa se concentra diez veces.



Las lavadoras japonesas no tienen en principio un programa caliente: ¡utilizan desde hace diez años biodetergentes!

Los preparados enzimáticos secos pueden separarse por precipitación, pero preferentemente se hace por evaporación. Para ello se coloca la disolución que contiene las enzimas en un flujo de aire caliente, de modo que el agua se evapore rápidamente. Se originan partículas de 0,5 a 2 mm de tamaño. Para conseguir un preparado libre de polvo se añade material inerte y materiales céreos para, por ejemplo, incorporar polietilenglicol y arraigar la enzima seca sobre ellos (perlas) o cubrirla (procedimiento de Marumerizer).



Fig. 2.20 Otto Röhm (derecha) con un curtidor de cuero.



Fig. 2.21 Oropon® fue el primer medio de curtido de cuero industrial. Contenía extracto de páncreas.



Fig. 2.22 Pollo y cerdo se aprovechan de la adición de fitasa. Los campesinos ya no añaden tanto fosfato y disminuyen su eliminación y la destrucción del medio ambiente (Cuadro 2.7).

proteasas de *Bacillus* al proceso de lavado. Por ingeniería genética se generan 1000 toneladas anuales de proteasas modificadas, sobre todo subtilisinas, en las cuales se reemplaza un aminoácido que puede ser oxidado (metionina de la posición 222) por un aminoácido estable.

Estas subtilisinas son suficientemente estables a pH 10 y a 60 °C, incluso contra tensoactivos, formadores de complejos para endurecer el agua y productos de oxidación.

2.9 Las proteasas ablandan la carne y curten la piel

En la conquista de México los españoles observaron que antes de cocer o asar la carne la envolvían con hojas de papaya (*Carica papaya*) (Fig. 2.19) o la untaban con la piel de la papaya. Este antiguo procedimiento posee las siguientes bases: las proteasas **papaína** y **quimopapaína**, que se encuentran a gran concentración en el árbol de la papaya y en esta fruta, degradan el tejido conectivo de la carne y con ello la hacen tierna.

En Estados Unidos se utilizan anualmente cientos de toneladas de papaína para "ablandar" (en inglés, *tenderizing*) la carne. Otras proteasas de plantas para esta finalidad son la **ficina** de los higos (Fig. 2.7) y la **bromelina** de las piñas. En muchos países se venden **ablandadores de carne** en forma de polvo que contienen proteasas. Antes de prepararla, la carne se frota o espolvorea y se deja algunas horas a temperatura ambiente. En este tiempo las proteasas vegetales degradan las proteinas del tejido conectivo, como el colágeno y la elastina. El ablandamiento acelera procesos que ocurren de forma natural en la maduración de la carne. Todos saben que la carne debe "depender" primero de la naturaleza para que sea sabrosa. En la **maduración de la carne**, las proteasas (catepsinas) propias del animal muerto tienen un papel decisivo.

También en el **curtido** las proteasas microbianas actúan de modo altamente efectivo en el depilado y curtido de pieles. La calidad y el rendimiento de la piel aumentan.

La patente alemana más antigua para la utilización de enzimas la hizo **Otto Röhm** (Fig. 2.14) en 1911: la aplicación de extracto de pancreasa de animales para dar elasticidad al cuero curtido (Figs. 2.20 y 2.21).

Las enzimas reemplazaron a las heces de perro, que se habían utilizado hasta entonces "con mala fama" en el trabajo de curtido. A propósito, hoy también se sabe por qué las heces de perro actúan como fragmentadoras de proteínas (y por ello curten la piel): sobre ellas crecen bacterias que producen proteasas.

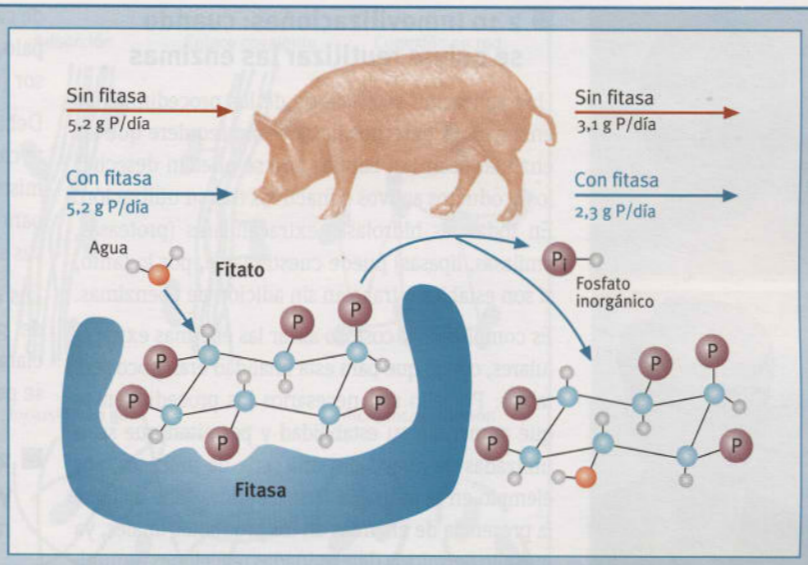
Cuadro 2.7 Opinión de los expertos: Fitasa – El jefe número uno de la empresa del fósforo

¡El fósforo es interesante! El fósforo no es ya una materia prima que se encuentra en exceso, sino que cada vez es más caro y requiere un trato cuidadoso que lo conserve.

Durante décadas, la agricultura industrial causó una carga masiva al medio ambiente con la utilización excesiva de fósforo como abono y de fosfato como forraje (fosfatos inorgánicos). Tanto los animales como las plantas precisan fósforo: sirve como componente de los huesos y es muy importante en el DNA y en la "moneda de energía" de la célula, la adenosina trifosfato. Cantidades de fosfato y nitrato demasiado altas en agricultura han conducido a una masiva eutrofia (exceso de abono) en las aguas fluviales. Se origina finalmente una apestosa cloaca mediante el exceso de abono con fosfato/nitrato. Las "mareas de algas rojas" (*red tide*) en los mares del sur, como en Hong Kong, tiene los mismos motivos. La coloración marrón-roja de las aguas, sin embargo, no se observó hace dos años en el fiordo de Kiel. Las algas microscópicas pertenecen al grupo de los dinoflagelados (algas ramificadas acorazadas). Precisan agua caliente y alimentos, y producen toxinas.

El segundo problema del fósforo global se originó repentinamente a través del crecimiento dinámico de China e India. Los precios de la materia prima empezaron a subir descontroladamente y a fluctuar. Mientras tanto, sin embargo, empezó a crearse una contratendencia, la "empresa del fósforo". El jefe número uno de la empresa es una enzima: la fitasa.

Los animales no rumiantes, como los pollos, los cerdos (Fig. 2.22) y también nosotros los humanos, eliminamos una gran parte del fosfato recogido y de nuevo es desperdiciado. La razón es la forma de reserva del fosfato (mio-inositolhexaquisfosfato) en las semillas de las plantas, que se llama también fitato. Éste no puede ser hidrolizado por los estómagos de los animales "monogástricos", porque las actividades enzimáticas necesarias no existen en absoluto o existen de forma insuficiente. En los rumiantes, sin embargo, los microorganismos en la flora de los diferentes estómagos se encargan de la actividad fitasa. Las fitasas microbianas fragmentan hidrolíticamente los grupos fosfato del fitato y lo hacen biodegradable. Muchos microbios, también hongos, producen fitasa y la eliminan extracelularmente.



Los biotecnólogos y los nutridores de animales tuvieron entonces la idea de producir fitasas microbianas (de hongos o bacterias) en biorreactores en grandes proporciones, para añadirlas al forraje de cerdos y pollos. Al mismo tiempo, se redujo la cantidad añadida de fosfato inorgánico. Los cerdos son temibles productores de purinas y las granjas de cerdos son el terror del medio ambiente. Asombrosamente ocurrió: ¡mediante la hidrólisis del fitato catalizada por fitasas se pudo reducir, con menos aporte de fosfato, la excreción de fosfato por el cerdo alrededor de un 25 a 30%! Dicho de otra manera, con el uso de la fitasa se pudo disminuir drásticamente la adición de fosfato inorgánico al forraje de los animales, que luego se liberó de los mismos cereales. En países con una gran producción de animales, como Holanda, Dinamarca y Alemania, se "calculó" el uso de la fitasa con una disminución clara de la carga de fosfato en más de mil toneladas por año y con un ahorro en el fosfato del forraje. Los legisladores de Holanda y Dinamarca promueven el uso de fitasa, así como algunos estados federales de Estados Unidos. Otros países, como por ejemplo China, han restringido la minería de fosfato por razones de regulación de recursos y han descendido la normalización nacional para el fosfato en el forraje. Todo ello ha hecho de la fitasa un producto enzimático extraordinario y próspero en todo el mundo. Así, la compañía danesa Novozymes pudo lograr, como una de las productoras de fitasa mayores del mundo, una facturación en 2003 de alrededor de 100 millones de dólares americanos con enzimas para el forraje –la mayoría con la fitasa de hongos *Peniophora lycii*, que bajo el nombre comercial RONOZYME® P se vendió a través de su grupo colaborador DSM Nutritional Products. El mayor éxito es la forma granulada del producto con estabilidad térmica CT (*coated thermostable*).

RONOZYME® P (CT) es hasta ahora el único producto de fitasa que puede soportar las altas temperaturas de 80 a 85 °C que se utilizan durante la fabricación de forraje de animales. Al mismo tiempo, con la tremenda expansión de los productos de fitasa microbianos se realizó también el avance a la "biotecnología verde" mediante la incorporación del gen de la fitasa microbiano al maíz, el arroz y las habas de soja. Aparte de esto, las plantas se cultivan con un contenido inferior en fitato y más fósforo biodegradable mediante un perfeccionamiento con mutaciones seleccionadas. Aunque la "biotecnología verde" aún lucha con algunos problemas tecnológicos, y sobre todo con los problemas de aceptación en Europa, la fitasa probablemente saldrá vencedora en la carrera.



El Dr. Frank Hatzack es director de Novozymes, en Dinamarca.





Fig. 2.23 Ichiro Chibata (arriba) y Tetsuya Tosa (abajo) desarrollaron en la Tanabe Seiyaku Co. Ltd (Osaka), en los años 1970, el primer proceso mundial con acilasa inmovilizada.



Fig. 2.24 Atsuo Tanaka (Kyoto) inmovilizó microbios en geles de igual medida. El autor de este libro fue introducido por él en la biotecnología japonesa.



Fig.2.25 Minero con un canario "inmovilizado". Los últimos canarios de las minas británicas se "jubilaron" en 1996.

2.10 Inmovilizaciones: cuando se quiere reutilizar las enzimas

Una aplicación satisfactoria de los procedimientos enzimáticos descritos hasta ahora requiere que las enzimas sean tan baratas que se puedan desechar los productos activos o inactivos tras su utilización. En todas las hidrolasas extracelulares (proteasas, amilasas, lipasas) puede cuestionarse, por lo tanto, si son estables o trabajan sin adición de coenzimas.

Es complicado y costoso aislar las enzimas extracelulares, con lo que para esta finalidad eran poco rentables. Por ello son necesarios los procedimientos que aumentan su estabilidad y permiten que sean utilizadas de nuevo. En una serie de procesos, por ejemplo en la industria farmacéutica, debe evitarse la presencia de enzimas en los productos finales, ya que ello permitiría determinadas reacciones inmunitarias. Un método para que las enzimas puedan separarse consiste en **fijarlas en material portador**: la **inmovilización** (Cuadro 2.8).

Si se aísla una enzima intracelular de las células, se libera de todas las impurezas mediante pasos complejos y se estudian sus propiedades y su comportamiento en un vaso de precipitados, olvidándose a menudo de que la enzima se investiga en un "entorno anormal" y puede comportarse conforme a su anormalidad. "Normales" son las condiciones del vaso de precipitados sólo para pocas, las principales enzimas extracelulares, que son aisladas al medio del entorno. Las principales enzimas de la célula se unen a los componentes celulares o se integran en las membranas. Forman complejos con otras proteínas o con materiales grasos (lípidos). Por ello, se intentó conseguir modelos para enzimas en la célula; se unieron artificialmente a materiales portadores y a membranas o se incluyeron en geles. Tales enzimas unidas más o menos fuertemente, que se fijan para inmovilizarlas, se denominan enzimas inmovilizadas o portadores fijados.

Una imagen simbólica para una enzima inmovilizada (Fig. 2.27) son los "ruiseñores inmovilizados" en un mercado de pájaros en Hong Kong. Están encerrados en estrechas jaulas (gel polímero) (en inglés, *gel entrapment*)y no pueden escapar (*leakage*), pero están protegidos de los gatos (¡proteasas, microbios!). La comida, el agua y el oxígeno (sustratos) difunden bien hacia dentro y los productos del metabolismo alcanzan fácilmente el exterior. Su actividad es visible y audible. Son más duraderos, o sea "reutilizables". Por cierto, en Europa se colocaban jaulas de canarios en las minas para evitar envenenamientos por monóxido de carbono (Fig. 2.25). Si el pájaro caía muerto del palo, eso era una señal de advertencia del biosensor (véase también Cap. 10, Biosensores).

Debido a que las enzimas todavía son relativamente caras, es obvio para los biotecnólogos utilizar los mismos procesos racionales que las células vivas para estabilizar enzimas y repetir la conversión con sus sustratos.

Los ejemplos que siguen de formas inmovilizadas de glucosa isomerasa y aminoacilasa muestran claramente qué requisitos esenciales deben lograrse para poder empezar a inmovilizar enzimas.

2.11 Glucosa isomerasa y jarabe de fructosa: azúcar con mayor fuerza edulcorante

El consumo de azúcar en el mundo aumenta cada vez más. La remolacha azucarera y la caña de azúcar requieren, sin embargo, las correspondientes condiciones climáticas y una buena calidad del suelo para su desarrollo, y debe añadirse la materia prima de inmediato a la cosecha, para evitar pérdidas. El **almidón**, el producto de almacenamiento natural de las plantas, puede obtenerse de diferentes plantas (patatas, cereales, mandioca, batatas), incluso en áreas agrícolamente desfavorables, y se almacena perfectamente bien. A partir del almidón se puede obtener azúcar (glucosa) con facilidad.

En Alemania se utiliza cada vez más almidón obtenido de plantas como **materia prima para la reproducción** en 125000 ha. En todo el mundo se aísla casi la mitad del almidón anual, casi 20 millones de toneladas, con enzimas fragmentadoras de azúcar.

Como hemos visto en la fabricación de la cerveza, el almidón industrial se degrada con amilasas. El producto final, la glucosa, presenta sin embargo una deficiencia: tiene sólo tres cuartas partes de la fuerza edulcorante de la sacarosa. Para alcanzar el mismo efecto como edulcorante que la sacarosa, se necesita más glucosa.

La **fructosa** (azúcar de la fruta) tiene alrededor de un 80% de efecto edulcorante superior al de la sacarosa, y es el doble de dulce que la glucosa. Ya que la fructosa es un isómero de la glucosa, es decir, tiene la misma fórmula molecular ($C_6H_{12}O_6$) y consta de los mismos átomos, la glucosa debería convertirse en fructosa "sólo" químicamente y así podría doblarse el efecto edulcorante. El Cuadro 2.9 refiere la historia del jarabe de fructosa (HFCS, *high-fructose corn syrup*).

Cuadro 2.8 Enzimas inmovilizadas

Las enzimas inmovilizadas deben ser reutilizables varias veces. Mediante la unión con materiales portadores grandes, visibles a simple vista, pueden separarse fácilmente por medios mecánicos de la disolución de reacción (por ejemplo por filtración). Se ha desarrollado un gran número de técnicas de inmovilización. Las enzimas pueden unirse al portador directamente mediante enlace químico (covalente) o físicamente por adsorpción o fuerzas electrostáticas. Las moléculas enzimáticas se unen unas con otras mediante reactivos especiales (conexiones en red), pero también por inclusión mecánica en geles o entre fibras.

Para que el proceso industrial sea óptimamente útil, las enzimas inmovilizadas deben producirse de modo sencillo y relativamente barato; una gran actividad enzimática ocupa la masa del portador y funciona con una alta estabilidad de trabajo. Se empieza en diferentes reactores enzimáticos cuyos tipos básicos son reactores en columna y reactores con equipos de agitación. Las ventajas tecnológicas y económicas de las enzimas inmovilizadas frente a las enzimas solubles son obvias. Son reutilizables de nuevo, presentan las mismas propiedades químicas y físicas, a menudo una estabilidad mejorada en un rango amplio de pH (zona ácida), así como frente a elevadas temperaturas, y los productos finales del proceso permanecen libres de enzimas.

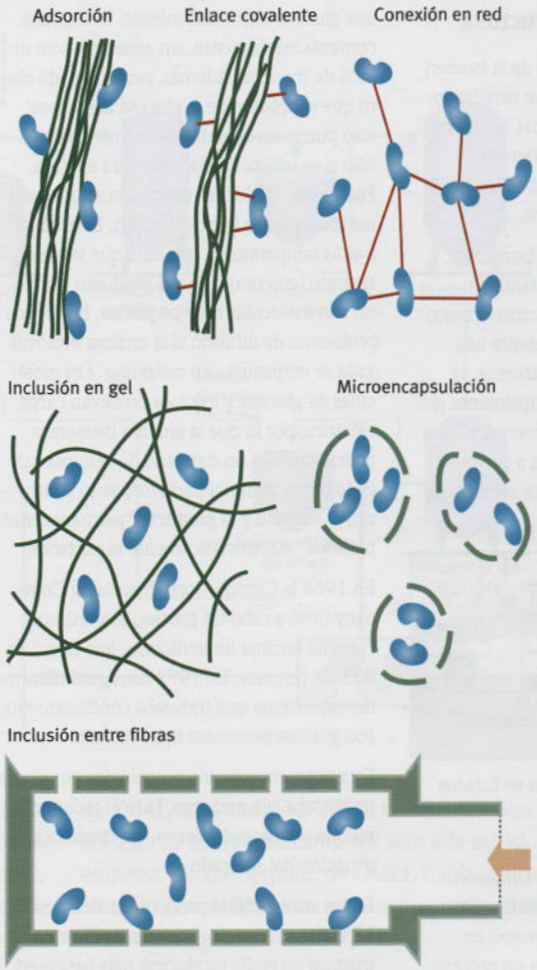




Fig. 2.26 La fructosa se utiliza como edulcorante para diabéticos.



Fig. 2.27 El símbolo de las enzimas inmovilizadas: el pájaro en la jaula en el mercado de pájaros en Hong Kong. El sustrato (oxígeno, pienso) se encuentra en la jaula. Los productos (CO_2 y excrementos) son eliminados. El pajarito no puede alejarse volando y está protegido del gato.

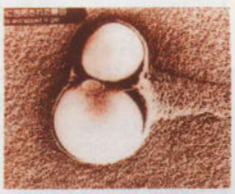


Fig. 2.28 Las células de levadura encerradas en polímeros (inmovilizadas) mantienen su actividad y ni siquiera germinan.



Fig. 2.29 Bolas de alginato en un reactor de columna con levaduras inmovilizadas, que son atravesadas por la disolución de azúcar.

Actualmente, la producción mundial asciende a aproximadamente 100 000 toneladas de glucosa isomerasa al año. Se producen nueve a diez millones de toneladas de jarabe de fructosa. En Estados Unidos se prefiere utilizar **jarabe de fructosa** en las bebidas. La glucosa isomerasa hoy se obtiene e inmoviliza sobre todo a partir de *Streptomyces*. Para ello se presentan principalmente las celulas bacterianas muertas, fragmentadas, para el uso de su glucosa isomerasa, que aún está completamente intacta. A menudo se conectan unas con otras en una red mediante glutaraldialdehído y así se estabilizan.

Enormemente interesante es la fructosa para productores de alimentos: se capta más rápido que otros azúcares y por tanto es ideal para bebidas deportivas. Aumenta el sabor a fruta y también a chocolate, y enmascara el gusto amargo de las sustancias sustitutas del azúcar (Fig. 2.26). La fructosa reduce el punto de congelación en los helados y así los hace más blandos, más cremosos y agradablemente "sabrosos". De acuerdo con las pruebas clínicas, los diabéticos pueden controlar su nivel de glucosa mucho mejor con alimentos que contienen fructosa que con los que contienen sacarosa o almidón.

La fructosa la usa el hígado en su mayor parte independientemente de la insulina. La fructosa es, pues, un importante **alimento dietético** (Fig. 2.26). Debido a su elevada fuerza edulcorante aporta menos calorías que el azúcar (sacarosa).

El azúcar de la fruta enriquecido se produce en Europa a partir del almidón mediante degradación con amilasas y una conversión final con glucosa isomerasa. Alternativamente, se puede partir de la sacarosa: por hidrólisis ácida o fragmentación con la enzima **invertasa** origina azúcar invertido, o sea fructosa más glucosa. La glucosa menos dulce e indeseada para los diabéticos se separa por cromatografía.

Cuadro 2.9 Jarabe de fructosa

El proceso puramente químico de la isomerización de glucosa a fructosa con catalizadores técnicos a altos valores de pH fue un fracaso. Se forman productos colaterales coloreados oscuros y de mal sabor, cuya separación sería demasiado cara.

En 1957 se descubrió la xilosa isomerasa, que aparte de xilosa a xilulosa también puede isomerizar glucosa a fructosa. Puesto que la actividad colateral representa una variante interesante económicamente, la enzima se denomina hoy principalmente glucosa isomerasa. La glucosa isomerasa es una enzima intracelular y se origina a partir de microorganismos diferentes, por ejemplo de *Streptomyces*.



Transporte del jarabe de fructosa en Estados Unidos.

En 1960 se patentó en Estados Unidos el correspondiente proceso enzimático. En 1966, unos investigadores japoneses en la ciudad de Chiba describieron un proceso industrial que utiliza la glucosa isomerasa soluble. En el proceso de isomerización de la glucosa se obtiene como producto una mezcla de glucosa y fructosa. Esta mezcla puede usarse en lugar de la sacarosa cristalina como jarabe, puesto que su capacidad edulcorante es muy grande.

En Estados Unidos, la Clinton Corn Processing Company empezó en 1967 la producción de jarabe de glucosa-fructosa mediante una glucosa isomerasa soluble. Este jarabe contenía inicialmente, sin embargo, sólo un 15% de fructosa. Además, pronto quedó claro que el proceso de la glucosa isomerasa sólo puede ser rentable económicamente sólo si se utiliza de nuevo la cara enzima. Por suerte, la glucosa isomerasa es una enzima ideal para la inmovilización. Es estable a altas temperaturas, y puesto que tanto el sustrato (glucosa) como el producto (fructosa) son moléculas muy pequeñas, hay pocos problemas de difusión si la enzima inmovilizada se empaqueta en columnas. Las moléculas de glucosa y fructosa no llevan carga eléctrica, por lo que la glucosa isomerasa podría unirse a un derivado de celulosa cargado como material portador; de lo contrario, el sustrato y el producto "permanecerían pegados" electrostáticamente al portador.

En 1968 la Clinton Corn Processing Company llevó a cabo un proceso discontinuo con una enzima inmovilizada, que liberó un 42% de fructosa. En 1972 consiguió desarrollar un sistema que trabajaba continuamente con glucosa isomerasa inmovilizada.

Esta próspera solución tecnológica por sí sola no bastaba, sin embargo, para el reconocimiento del procedimiento; era decisiva la situación del mercado.

En los años 1960 el precio del azúcar era de 15 a 20 centavos por kilogramo. El jarabe de fructosa no podía producirse más barato en ningún caso. En ese momento prevalecían también las desventajas del proceso enzimático. Además de la fuerza de los prejuicios, era importante un acercamiento a la industria: se tuvo que desarrollar un sistema complicado de filtros de presión y un aparato para la separación del metal pesado cobalto, que se utilizó como estabilizador de la enzima.

Pero en noviembre de 1974 aumentó el precio del azúcar a 1 dólar y 25 centavos el kilogramo. El proceso de la isomerasa se hizo muy atractivo de la noche a la mañana. Al mismo tiempo, la compañía danesa Novo Industry A/S inmovilizó un preparado de glucosa isomerasa que era más barato, sin adición de cobalto y soportando la presión en grandes reactores industriales, por lo que no era nada raro encontrarlos en columnas de siete metros de altura.



En 1976, solamente en Estados Unidos se produjeron 750 t de glucosa isomerasa y con ellas 800 000 t de jarabe de fructosa al 42%. Puesto que el precio del azúcar a finales de 1976 cayó de nuevo a 15 centavos por kilogramo, se estableció y se impulsó el nuevo proceso ya exitoso. El jarabe de fructosa al 42% se produjo a precios menores que la sacarosa. En 1978 se dio otro paso adelante. Mediante los nuevos procedimientos de separación se obtuvo un jarabe de fructosa al 55%. Era solamente un 15 a 25% más caro que el jarabe al 42%. Para bebidas ácidas, como la Coca-Cola (valor de pH de 4,0), fue necesario un jarabe con al menos un 55% de fructosa para remplazar a la sacarosa. Con ello tuvo éxito en un mercado importante el aumento masivo del jarabe de fructosa.

Precio del azúcar desde 1901 hasta 2001 (en centavos/libra)

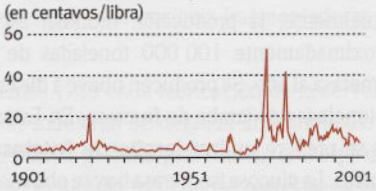




Fig. 2.30 En Japón se añaden aminoácidos a las bebidas saludables.

Los **gastos totales** de la aplicación de la glucosa isomerasa inmovilizada son un 40% menores que con la enzima soluble (Fig. 2.32).

2.12 Alimentos y forrajes con enzimas inmovilizadas

El ejemplo de la glucosa isomerasa ha mostrado que mediante enzimas inmovilizadas se pueden producir grandes cantidades de productos a bajo coste. Otra posibilidad para las enzimas inmovilizadas, la producción eficaz de productos de alta calidad en pequeñas cantidades, la presenta la **penicilina acilasa**, que cataliza los cambios adecuados en la molécula de penicilina (Cap. 4).

Los **aminoácidos** como la **lisina** y la **metionina** no pueden sintetizarse en los no rumiantes, por ejemplo humanos, pollos y cerdos, o sólo puede hacerse con insuficiente velocidad, y deben proporcionarse con la alimentación; por ello se denominan **esenciales** (indispensables). La necesidad de aminoácidos esenciales como adición al forraje y para fines médicos (soluciones de inyección) aumenta rápidamente. Hoy se empiezan a utilizar los métodos fermentativos y químicos para la fabricación

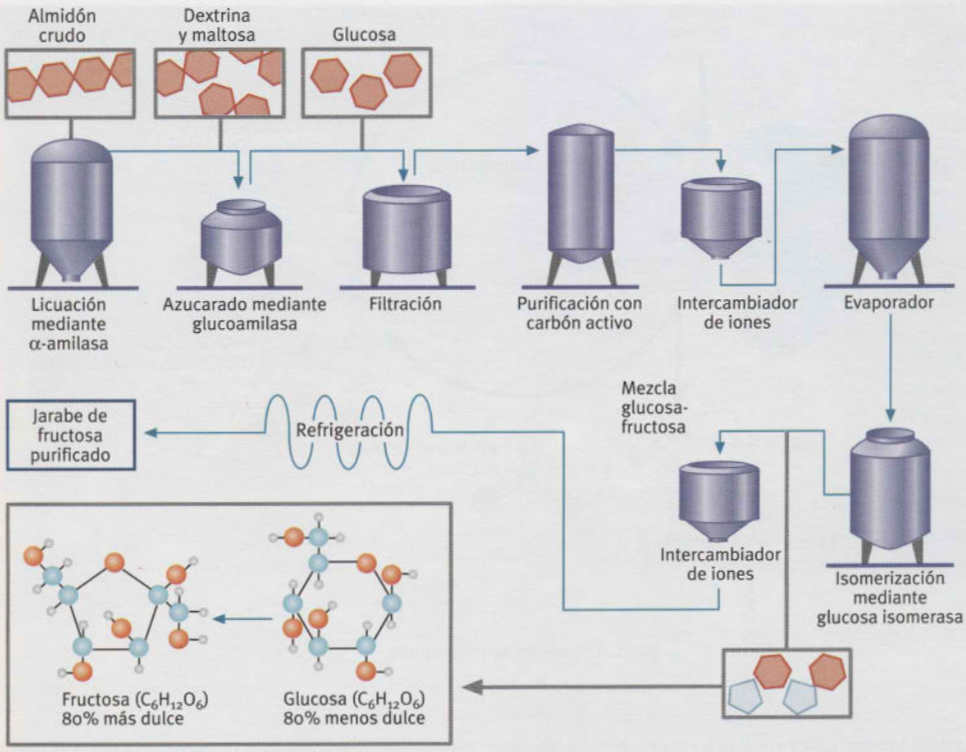


Fig. 2.31 Cómo se obtiene jarabe de fructosa a partir de almidón.

industrial de L-aminoácidos (véase Cap. 4), en lugar del aislamiento convencional de hidrolizados de proteína. Los aminoácidos sintetizados químicamente son, sin embargo, mezclas ópticas inactivas (**racematos**) de isómeros D y L. Sólo la forma L óptica (excepción: metionina) es fisiológicamente activa, y sólo ésta es útil en medicina, para deportistas (Fig. 2.30) y para forraje.

Ichiro Chibata (Fig. 2.23) y su grupo desarrollaron en Japón un proceso en el cual el racemato de acetil-D,L-aminoácidos producido químicamente se separa enzimáticamente en los L-aminoácidos y los acetil-D-aminoácidos no hidrolizados (Fig. 2.34). Los L-aminoácidos deseados se separaron fácilmente, debido a su solubilidad reducida, de los D-aminoácidos acetilados. Los D-aminoácidos no deseados se utilizaron de nuevo para la síntesis química del racemato. Al principio, este proceso se realizó con **aminoacilasa** soluble de riñón o de *Aspergillus oryzae*, pero no podía recuperarse la enzima.

Para determinados fines (por ejemplo para soluciones de inyección que contienen aminoácidos) las "impurezas enzimáticas" se tuvieron que separar de nuevo, con dificultad, para evitar las reacciones inmunitarias de defensa en los pacientes. Esto condujo a pérdidas del rendimiento y gastos adicionales. La inmovilización se ofreció como una salida. Se une entonces la enzima de modo sencillo y barato mediante **adsorción** (fijación) a un portador (bolas de DEAE-celulosa) (Fig. 2.33). Es muy estable, en 65 días su actividad disminuye sólo a la mitad. La empresa Tanabe Seiyaku, de Osaka, había utilizado con ello por primera vez una enzima inmovilizada industrialmente.

Desde 1969 se produjeron industrialmente con este procedimiento los aminoácidos L-fenilalanina, L-valina y L-alanina (Fig. 2.33 y Cap. 4).

Los gastos totales del proceso inmovilizando la aminoacilasa se encuentran aproximadamente un 40% por debajo que con la enzima soluble (Fig. 2.34). Puesto que el proceso está ampliamente automatizado se ahorran los gastos de personal, los gastos del

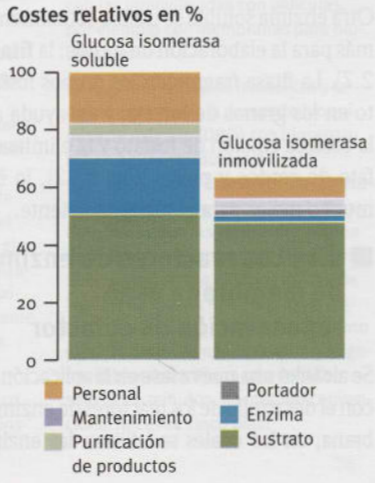


Fig. 2.32 Comparación de los costes de producción para el jarabe de fructosa mediante glucosa isomerasa soluble e inmovilizada (según Kyowa Hakko Kogyo Co., Japón).

Nota práctica: fructosa contra la "resaca"

Algunos expertos recomiendan una cucharada de fructosa tras una noche alegre. Sin embargo, hay que tener cuidado con la imposibilidad de tomar fructosa (intolerancia a la fructosa) en algunas personas, que puede conducir a la muerte. Es inofensivo tomar fructosa con la miel o la mermelada, que ambas la contienen y también la fruta fresca. En el hígado, la fructoquinasa forma fructosa diez veces más rápido que la hexoquinasa la glucosa en el cuerpo. Este proceso forma el cofactor NAD^+, que se requiere urgentemente en la degradación de alcohol (mediante la alcohol deshidrogenasa y la acetaldehído deshidrogenasa). El alcohol y la "sustancia de la resaca" acetaldehído se degradan más rápido.

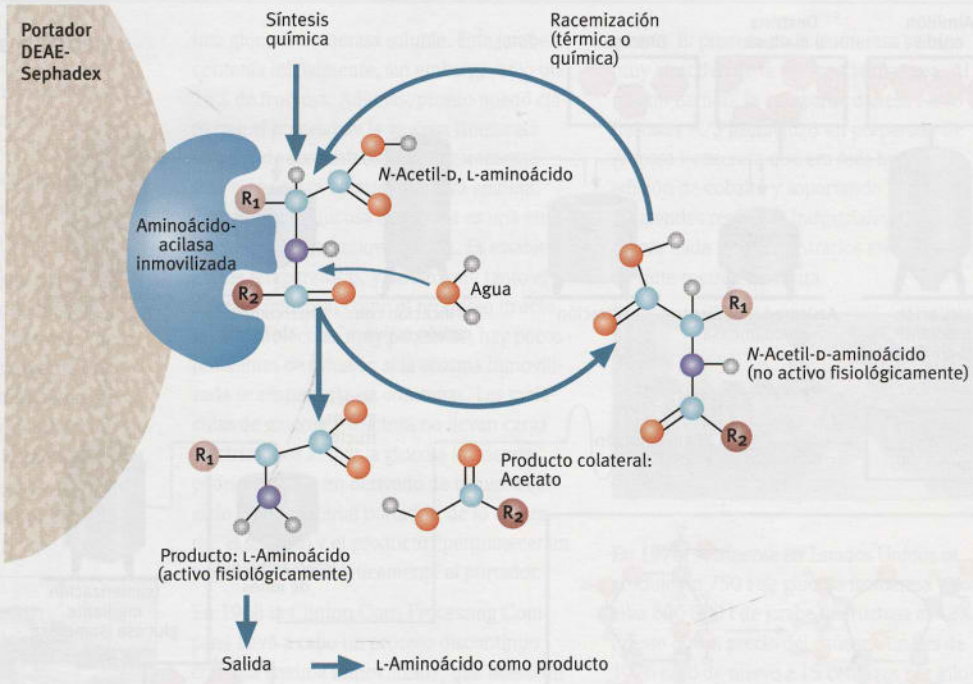


Fig. 2.33 El primer proceso industrial (1969, Tanabe Seiyaku, Japón) con enzimas inmovilizadas: conversión química de acetil-D,L-aminoácido, mediante aminoacilasa, en el fisiológicamente activo L-aminoácido (difícilmente soluble, cristalizado) y el inactivo acetil-D-aminoácido, que puede transferirse de nuevo térmica o químicamente a la forma de partida (mezcla de forma D y L). En el correspondiente proceso se utiliza el material crudo completo.

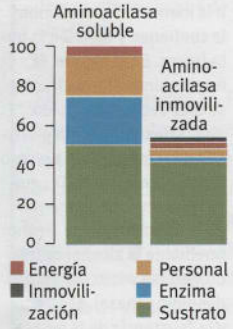


Fig. 2.34 Comparación de los costes de producción con el uso de aminoacilasa soluble e inmovilizada (según Tanabe Seiyaku, Japón).



Fig. 2.35 El gatito Fortuna disfruta de la leche libre de lactosa, que se produce mediante el tratamiento enzimático con lactasa (β-galactosidasa) inmovilizada. La lactasa rompe la lactosa en glucosa y galactosa.

catalizador son menores y el rendimiento de la producción es superior. Con ello se muestra claramente la superioridad del uso de la forma inmovilizada.

Esta superioridad no se pudo lograr con el uso de otras enzimas. Así, desde hace ya más de 20 años se utiliza la **glucoamilasa soluble** industrialmente. Hubo muchos intentos satisfactorios para inmovilizar glucoamilasa. Finalmente, sin embargo –a pesar de las ventajas que tiene técnicamente una enzima inmovilizada– la forma inmovilizada no compitió con la soluble, porque es fácil obtener glucoamilasa soluble y, por lo tanto, es barata, puede utilizarse sin problemas técnicos y el proceso se puede optimizar al máximo. Con lactasa soluble o inmovilizada (Fig. 2.35) se produce leche exenta de lactosa, fácilmente digerible.

Otra enzima soluble se utiliza actualmente cada vez más para la elaboración de forraje: la **fitasa** (Cuadro 2.7). La fitasa fragmenta los grupos fosfato del fitato en los granos de forraje, y así ayuda a disminuir la costosa adición de fosfato y la eliminación de fosfato de cerdos y pollos (Fig. 2.22), lo cual resulta mucho mejor para el medio ambiente.

2.13 Los reactores de enzimas de membrana usan regeneración de cofactor

Se alcanzó una nueva fase en la aplicación de enzimas con el desarrollo de los reactores de enzimas de membrana, en los cuales se utilizan las enzimas dependientes de cofactores, que constantemente regeneran los muy caros cofactores enzimáticos utilizados.

En los **reactores de membrana**, los cofactores dependientes (NADH) aminoácido-deshidrogenasas y formiato-deshidrogenasa (FDH, para la regeneración de cofactores utilizados) se colocan juntos entre membranas de ultrafiltración. Esto se consigue mediante la corriente de disolución de sustrato. Las enzimas no pueden penetrar a través de las membranas. Para que el cofactor de bajo peso molecular no abandone la cámara de reacción junto con los productos, se une a un **polímero portador** (polietilenglicol, PEG) y se mantiene así a pesar de su tamaño cien veces menor. La aminoácido-deshidrogenasa transforma, con la participación del cofactor, el oxoácido en L-aminoácido (Fig. 2.37), que se difunde hacia fuera a través de las membranas. El cofactor NADH, en ese momento costoso, se oxida a NAD^+ y se hace "inútil" para la enzima. La segunda enzima "atrapada" en la cámara del reactor, la formiato-deshidrogenasa, puede transformar el barato ácido fórmico (formiato) en CO_2 no contaminante, y reduce entonces NAD^+ a NADH. Por consiguiente, el caro cofactor se regenera y se utiliza de nuevo. El concepto de **regeneración del cofactor** en el **reactor de enzimas de membrana** de Christian Wandrey (Fig. 2.38), María-Regina Kula y Andreas F. Bückmann, de Jülich y Braunschweig, supuso un considerable avance: ¡durante más de 90 años cada molécula regenera en el biorreactor de 700 000 a 900 000 veces el NAD^+ utilizado!

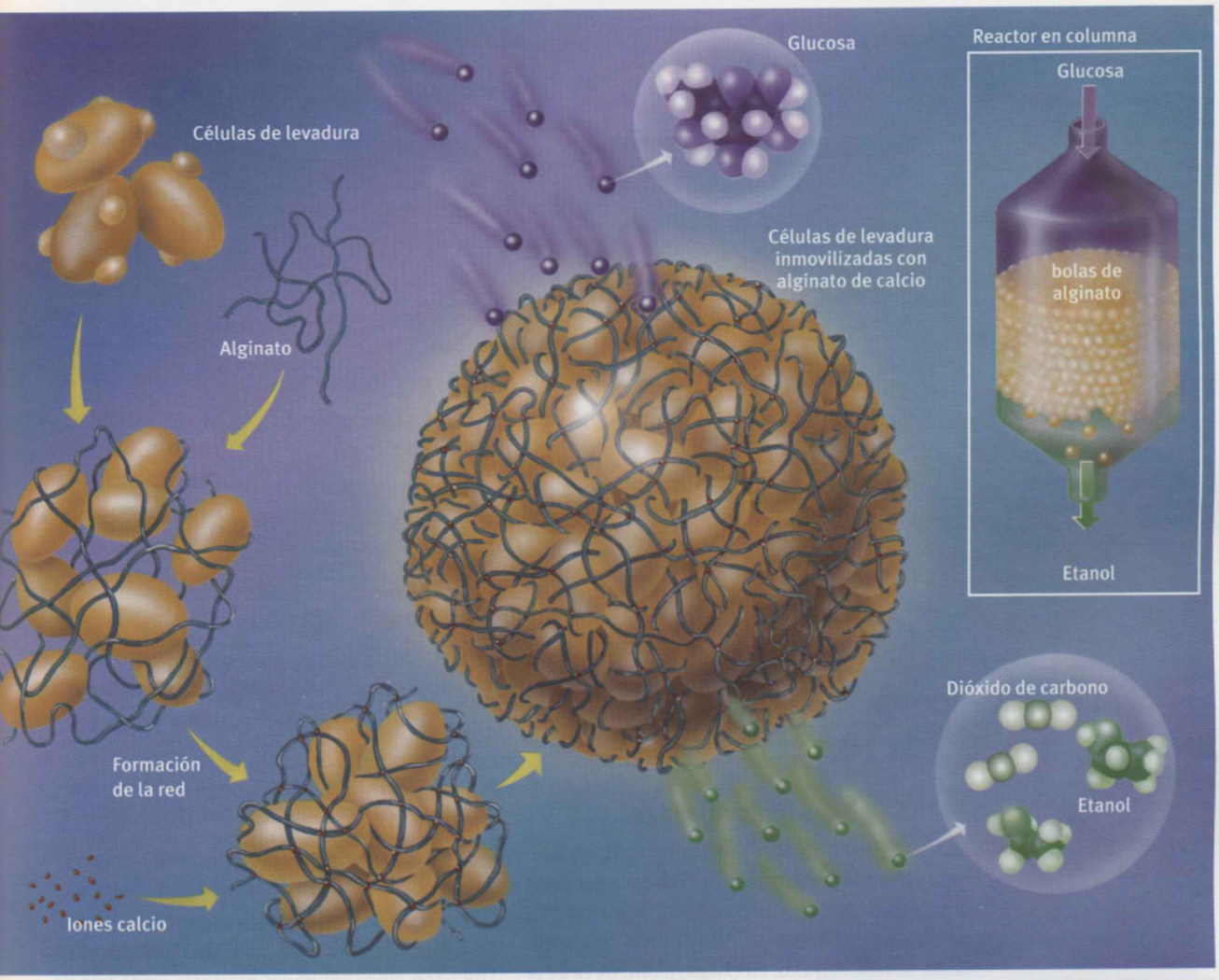


Fig. 2.36. Las levaduras inmovilizadas producen etanol.

La inmovilización (fijación a un portador) de las células ofrece varias ventajas productivas: las células se pueden usar de nuevo y tienen una larga vida. El producto final deseado permanece exento de sustancias biológicas y células, y por lo tanto se eliminan algunas etapas de purificación.

Con una de las técnicas más utilizadas, la inclusión de células en geles, se mezcla una suspensión celular con las sustancias unidas al gel.

El alginato, un producto de algas marinas que se usa en la industria alimentaria para la elaboración de jaleas, construye con los iones calcio una espesa red y forma una estructura de gel estable.

Se producen las bolas o perlas de gel de alginato, en las cuales una mezcla de células-alginato se hace gotear en una disolución de cloruro de calcio. Tras la penetración de los iones calcio cuajan las perlas de alginato y cierran, por ejemplo, las células de levadura fuertemente.

Las pequeñas moléculas, como la glucosa, pueden alcanzar los poros en las células; los productos (alcohol y dióxido de carbono) abandonan las bolas. Las células de levadura vivas permanecen intactas.

Para empaquetar densamente las perlas de alginato con células se promueve, en primer lugar, el aumento de células mediante la adición de alimentos y oxígeno. Si el espacio disponible en el gel se llena con las células, las perlas se apilan en un biorreactor de columna. El biorreactor se ocupa del paso a través de una disolución de glucosa, que utiliza las células inmovilizadas como sustrato. Puesto que el oxígeno no se encuentra abundantemente para su uso, las células de levadura fermentan glucosa a alcohol.

El alcohol producido y el CO_2 gaseoso formado abandonan las bolas. Las instalaciones piloto producen durante meses continuamente alcohol a partir de glucosa con la ayuda de células inmovilizadas.

De modo similar a las células de levadura, también se inmovilizan células de plantas y de animales.

En lugar de bolas pueden prepararse células inmovilizadas con películas, por ejemplo con membranas para biosensores.

La levadura *Arxula* se inmoviliza y se aplica para medir la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) con biosensores en aguas residuales (véase Cap. 10): se mide la respiración (consumo de oxígeno) de las células de levadura inmovilizadas en una membrana de polímero con un sensor de oxígeno. Si no se encuentra ninguna sustancia biodegradable en el agua ("agua limpia"), las levaduras no toman alimento y, por lo tanto, tampoco respiran oxígeno. El biosensor libera una señal en sólo cinco minutos. ¡El método convencional necesita cinco días!



Células inmovilizadas de la levadura *Arxula*

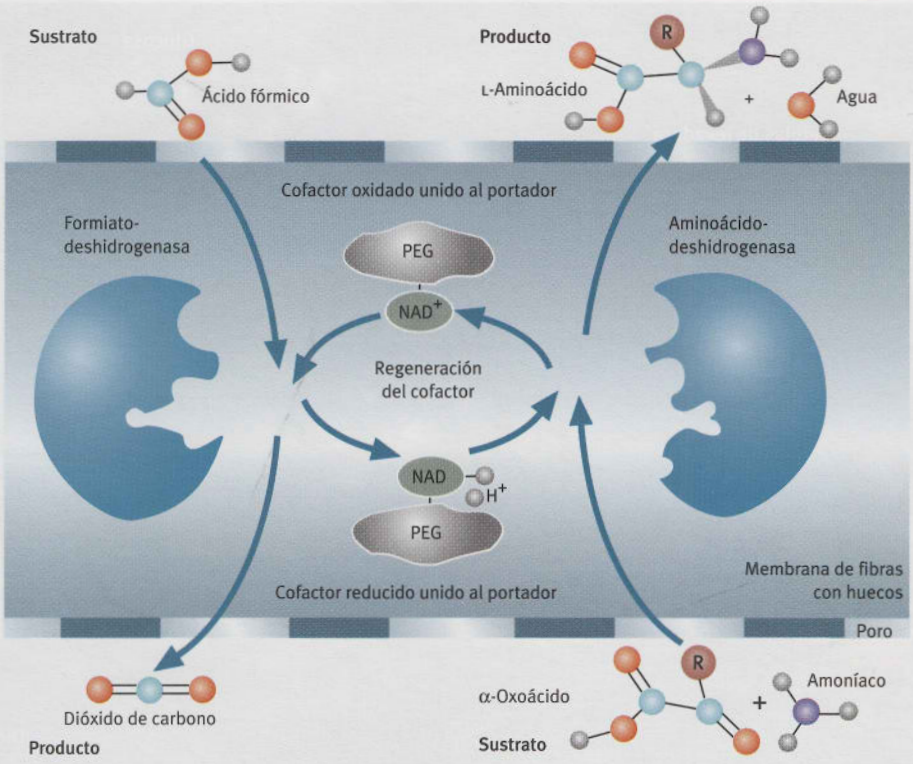


Fig. 2.37 Principio del reactor de enzimas de membrana para la producción de L-aminoácidos (por ejmplo L-alanina). El cofactor NAD^+ está unido al polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular y se sostiene dentro, junto al reactor, con las enzimas. Se reduce constantemente por la formiato-deshidrogenasa y con ello se regenera para su utilización mediante la L-aminoácido-deshidrogenasa (según Wandrey 1986, modificado).



Fig. 2.38 Christian Wandrey consiguió, con Regina-María Kula y Andreas Frits Bückmann, el primer reactor de enzimas de membrana con regeneración de cofactor en Jülich y Braunschweig.



Fig. 2.39 Una destilería de alcohol en 1900. Las amilasas se utilizan para descomponer el almidón.



Fig. 2.40 Instalación moderna en Japón con levaduras inmovilizadas.

2.14 Células inmovilizadas

Aparte de las enzimas se pueden inmovilizar también las células enteras. Japón está especialmente muy avanzado en el campo de las células inmovilizadas. Ichiro Chibata y Tetsuya Tosa, de la compañía Tanabe Seiyaku, en Osaka, pioneros ya de la inmovilización de enzimas, desarrollaron en 1973 un proceso en el cual sintetizaron anualmente 600 t del aminoácido **aspartato** a partir de **ácido fumárico** en las células destruidas de *Escherichia coli* atrapadas en gel (véase también Cap. 4). Después de 120 días, la actividad aspartasa de las bacterias cólicas bajó a la mitad. Las células libres tenían, sin embargo, sólo diez días de vida media. En el proceso con células inmovilizadas se origina un 60% de los gastos de producción en comparación con la utilización de células libres: los gastos del catalizador bajan un 3% del aproximadamente 30% en las células libres, los gastos en personal de servicio y la energía un 15%. Un reactor en columna de 1000 L de capacidad libera cerca de dos toneladas (!) de L-aspartato por día. Los microorganismos se ofrecen enseguida y de modo natural en los **procesos de varias etapas**, como la producción de alcohol con levaduras inmovilizadas. El etanol se produce anaeróbicamente (en ausencia de aire) a partir de glucosa mediante una reacción de varias etapas, utilizando el sistema regenerador del cofactor (en las células de levadura).

Una **instalación piloto para etanol** de la compañía Kyowa Hakko Kogyo Co. (Fig. 2.40) trabajó en 1982 con cinco columnas reactoras (cada una de cuatro metros cúbicos de capacidad) durante más de seis meses y produjo continuadamente alcohol al 8,5% a partir de melaza de caña de azúcar. El reactor utilizó células vivas de levadura, que se encerraron en bolas de alginato en forma de gel (Fig. 2.36). El alginato se obtiene de las algas marinas (Cap. 7) y se utiliza como espesante en la industria alimentaria. La instalación piloto generaba cada día aproximadamente 2400 litros de alcohol puro.

Las ventajas de la inmovilización de células son claras si se compara la **productividad** con la de los procedimientos convencionales: es aproximadamente 20 veces más alta y los gastos bajan drásticamente. Puesto que el proceso transcurre de forma continua, se puede controlar automáticamente por ordenador y con ello se evitan recursos humanos. La instalación de etanol es el ejemplo modelo para instalaciones de biosíntesis más complicadas.

Bibliografía utilizada y aplicada

- El clásico de Biotecnología en alemán:
  Dellweg H (1987) Biotechnologie. VCH, Weinheim
- El clásico "Lehninger" de Bioquímica:
  Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M (2001) Biochemie. 3. Aufl. Springer, Berlin
- Dingermann T (1999) Gentechnik. Biotechnik.
  Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Renneberg R (1984) Elixiere des Lebens. Aulis-Verlag Deubner und Co., Köln
- El artículo original sobre la estructura de la lisozima:
  Phillips D C (1967) The hen egg-white lysozyme molecule. *Proc Nat Acad Sci*, 57 (3): 484 - 495
- La biblia de bolsillo de la Biotecnología:
  Schmid R D (2002) Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik.
  Wiley-VCH, Weinheim
- Lo más nuevo sobre biocatálisis:
  Bommarius A S, Riebel, B R (2004) Biocatalysis. Wiley-VCH, Weinheim
- Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer U T (2005)
  Biocatalysts and Enzyme Technology. Wiley-VCH, Weinheim
- El clásico sobre biocatalizadores inmovilizados:
  Tanaka A, Tosa T, Kobayashi T (1993) Industrial Applications of Immobilized Biocatalysts. Marcel Dekker, New York
- La vida de Otto Warburg y su labor científica:
  Werner P, Renneberg R (Mitarb.) (1991) Ein Genie irrt seltener ...
  Akademie-Verlag, Berlin
- Primrose S B (1990) Biotechnologie. Grundlagen, Anwendungen, Perspektiven. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg

Enlaces de Web

- Página Web para ingeniería de enzimas de la Universidad South Bank de Londres, basada en un libro de texto:
  „Enzyme Technology" von Martin Chaplin und Christopher Bucke (Cambridge University Press, 1990):
  www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/
- BRENDA, la base de datos de enzimas de la Universidad de Colonia. Todas las enzimas con propiedades y citas bibliográficas:
  www.brenda.uni-koeln.de/
- Base de datos de proteínas (PDB) con todas las estructuras conocidas de enzimas. El colaborador de este libro David Goodsell escribe una sección muy leída con el título "Molécula del mes":
  www.rcsb.org/pdb/
- Cómo se une la lisozima al sustrato, una animación por ordenador de Protein Mechanics Inc.:
  www.locuspharma.com/structureMovies/lysozyme.php
- Moléculas en movimiento, visión en 3D de proteínas y DNA:
  www.umass.edu/molvis/freichsman/index.html
- El Prof. Blume ofrece fantásticos experimentos (también con enzimas) a sus alumnos:
  http://dc2.uni-bielefeld.de/cgi-bin/perlfect/search/search.pl

Ocho preguntas de autoevaluación

1. ¿Por qué es impensable el metabolismo en la célula sin enzimas?
2. ¿Los biocatalizadores son siempre proteínas?
3. ¿Mediante qué "trucos" pueden disminuir drásticamente las enzimas la energía de activación de las reacciones?
4. ¿Cómo se modificó la teoría de la llave-cerradura de Emil Fischer con el modelo de la lisozima de David Phillips? ¿Qué dice la idea de Koshland del "ajuste inducido"?
5. ¿Cuáles son las ventajas de las enzimas inmovilizadas? ¿Para qué se usan las enzimas inmovilizadas? ¿Por qué no se utilizan enzimas inmovilizadas en todas partes?
6. ¿Cuáles son los campos de aplicación más importantes de las enzimas en la industria?
7. ¿Por qué las lavadoras en Japón no tienen un programa caliente?
8. ¿Por qué y cómo se regeneran los cofactores en los reactores de enzimas de membrana para la síntesis de aminoácidos de alta calidad?

El milagro de la ingeniería genética

3.1 DNA: La doble hélice porta el material hereditario 50

3.2 Las DNA polimerasas catalizan la replicación de la doble hebra de DNA 50

3.3 No todos los genes constan de DNA: los virus RNA utilizan RNA de una única hebra 51

3.4 La aclaración del código genético 51

3.5 El genoma humano – Una enorme enciclopedia de 24 volúmenes 52

3.6 El código de DNA se agrieta: el RNA sintético descifra los codones 53

3.7 Los genes estructurales cercanos a los fragmentos de DNA controlan la expresión de los genes 58

3.8 Ribosomas – La fábrica de proteínas de la célula: una molécula gigante de RNA y proteínas 58

3.9 Recombinación: las cartas genéticas se barajan de nuevo 60

3.10 Los plásmidos son vectores ideales para el material genético 61

3.11 Tijeras y pegamento moleculares: endonucleasas de restricción y DNA ligasas 62

3.12 Los primeros experimentos de ingeniería genética: ¿bacterias que croan? 62

3.13 Cómo se obtienen los genes 65

3.14 ¿Insulina humana a partir de bacterias? 66

3.15 Cómo se sintetiza la insulina en humanos: desde la preproinsulina, pasando por la proinsulina, hasta la insulina activa 68

3.16 Los inicios de la ingeniería genética con proinsulina de rata 69

3. 17 Hibridación de DNA: cómo se encuentran bacterias con sondas de DNA 71

3.18 Un pequeño desvío: la somatostatina – La primera proteína humana de bacterias 71

3.19 Cómo se obtiene enzimáticamente insulina humana a partir de insulina de cerdo 73

3.20 ¡Finalmente se consiguió! La primera insulina humana producida por ingeniería genética 73

3.21 Asilomar: ¿cuál es el peligro de la nueva ingeniería genética? 74

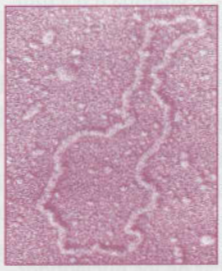
3.22 Proinsulina humana a partir de una única cepa de *E. coli* 76

3.23 Levaduras de cocción como productoras de proinsulina 77

3.24 Variantes artificiales de la insulina (muteína) mediante ingeniería genética 78

3.25 Los genes manipulados de células de mamífero producen proteínas complejas modificadas 78












Capítulo 3



Fig. 3.1 James D. Watson (nacido en 1928).

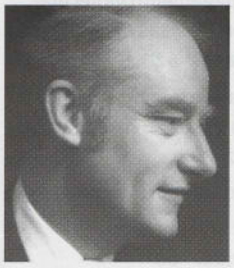


Fig. 3.2 Francis C. Crick (1916-2004).



Fig. 3.3 Doble hélice del DNA. Sydney Brenner en su primera impresión: *"The moment I saw the DNA model ... I realized it is the key of understanding to all problems of biology".*

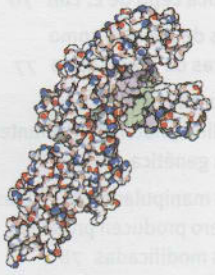


Fig. 3.4 DNA polimerasa: la hebra matriz se destaca en púrpura, y la nueva hebra formada en verde.

3.1 DNA: La doble hélice porta el material hereditario

El centro y el eje de rotación de la biorrevolución es la hélice de la vida –la portadora del material hereditario, el ácido desoxirribonucleico (ADN), abreviado internacionalmente **DNA** por las siglas de su nombre en inglés (*deoxyribonucleic acid*). La larga búsqueda del portador de la herencia (Cuadro 3.1) culminó en 1953 con un artículo de la revista científica "Nature", escrito por dos jóvenes investigadores, **James Dewey Watson** (nacido en 1928) y **Francis Compton Crick** (1916-2004) (Figs. 3.1 y 3.2). En él se podía ver un sencillo y genial gráfico de la doble hélice del DNA (Fig. 3.3).

El DNA es comparable a una simple cremallera en tirabuzón –sin embargo, es una cremallera que posee cuatro tipos diferentes de dientes, las cuatro bases: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Estas bases son partes integrantes de los nucleótidos, los componentes básicos del DNA. Los nucleótidos, asimismo, constan de un azúcar, una base y un resto fosfato (Fig. 3.8). La geometría de la doble hélice no es sólo para ahorrar espacio, sino que además permite el acceso a la información desde todas partes.

La **desoxirribosa** es el azúcar de los nucleótidos. A diferencia de la ribosa –el azúcar del ácido ribonucleico, el RNA– a la desoxirribosa le falta el átomo de oxígeno en el carbono 2'. El esqueleto consta de unidades alternantes de desoxirribosa y fosfato. Los azúcares están enlazados, pues, unos con otros mediante puentes fosfodiéster. Como los dientes de una cremallera en su soporte, las cuatro bases están sujetas al esqueleto, que tiene simplemente funciones portadoras. Para la información genética sólo es importante la **secuencia de las cuatro bases.**

Las dos tiras de dientes se mantienen juntas mecánicamente cuando la cremallera está cerrada. En el caso de las dos hebras del DNA se trata, en cambio, de interacciones moleculares, **puentes de hidrógeno (puentes H)**, que actúan entre bases opuestas de las dos hebras individuales (Fig. 3.8).

Erwin Chargaff (1905-2002, Fig. 3.5) determinó en 1950, con la ayuda de métodos cromatográficos, que la relación de adenina a timina y de guanina a citosina en todos los seres vivos es siempre alrededor de 1 (**regla de Chargaff**) (Fig. 3.6). A partir del modelo de DNA de Watson y Crick se entiende por qué esto es así: las bases A y T, así como las bases C y las G, encajan en el espacio de forma exacta; tres puentes H mantienen G y C juntas, dos puentes H a A y T (Fig. 3.8). La denominada **regla del apareamiento de bases** (o **regla de Watson-Crick**) es el apareamiento esencial para la transferencia exacta de la información genética.

3.2 Las DNA polimerasas catalizan la replicación de la doble hebra de DNA

La base de las características de toda herencia es la proliferación de células. Dos descendientes del mismo tipo se originan a partir de una célula, y ambas llevan el mismo programa hereditario. Por lo tanto, antes de la división celular (**mitosis**) el DNA debe preparar, por el proceso de **replicación,** una copia exacta de sí mismo. Con este propósito, el DNA se abre como una cremallera, es decir, las dos hebras sencillas se separan una de la otra. De cada una de las dos hebras libres que pertenecían al DNA, la **DNA polimerasa** (Fig. 3.4) sintetiza una nueva hebra de DNA. Se forma, con la hebra existente, de nuevo una doble hélice, de modo que al final se encuentran disponibles dos nuevas dobles hélices.

La DNA polimerasa pertenece a la clase de enzimas de las transferasas (Cap. 2), así que transfiere grupos químicos. La aisló **Arthur Kornberg** (nacido en 1918, premio Nobel en 1959) de *Escherichia coli.* En la replicación de un preparado celular se une un nucleótido A a un nucleótido T, y delante de un nucleótido C libre se coloca un nucleótido G, etc.

Mientras que el nucleótido, que se encuentra desapareado en la "parte delantera", se ordena correctamente mediante puentes de hidrógeno entre las bases apareadas, la polimerasa enlaza la "parte trasera" del "elemento del esqueleto" de la desoxirribosa y fosfato para generar la estructura con el enlace fuerte.

La DNA polimerasa (Fig. 3.4) cataliza, por lo tanto, con la rotura del pirofosfato, la unión de un enlace fosfodiéster entre el final OH-3' de una secuencia existente y el final trifosfato-5' de un nuevo nucleótido entrante.

Para ello la enzima necesita una presentación de copia, una **matriz (*template*)**. Ésta puede ser una hebra única o también una doble hebra parcialmente separada.

Aparte de la matriz, la polimerasa requiere todos los componentes en forma activada, es decir, los **desoxinucleósidos-5'-trifosfatos (dNTP)**, y una doble hélice de punto de partida, un **iniciador** (*primer*), con un grupo hidroxilo 3' libre.

La DNA polimerasa I, que se muestra en la Fig. 3.4, tiene una doble actividad: se une a un fragmento corto de una única hebra (*nick*), perteneciente a la molécula de DNA de doble hebra, y sintetiza entonces una hebra completamente nueva (actividad polimerasa), mientras continúa degradando la hebra existente (actividad nucleasa). Degradación y construcción transcurren simultáneamente, y el *nick* recorre longitudinalmente todo el DNA. Esto sirve para corregir fallos, y así, los nucleótidos que se han instalado erróneamente se reemplazan. Esta propiedad confiere la increíble precisión de la replicación del DNA, con un índice de fallo de uno por 100 000 000 de pares de bases copiados. ¡Esto sería como si se escribiese a máquina unas mil novelas y sólo se cometiera un error!

La molécula de la polimerasa se parece a una mano derecha: el lugar entre los otros dedos y el pulgar lo ocupa el DNA. La actividad polimerasa se sitúa entre el dedo índice y el dedo corazón. La actividad nucleasa en el centro de la molécula lee la corrección de los nucleótidos insertados. A partir de la doble hélice se originan así dos copias exactas, cada una de las cuales representa una molécula de DNA completa. En la división de la célula madre se separan ambas en las dos células hijas.

En la técnica decisiva para la ingeniería genética, la **reacción en cadena de la polimerasa** (***polymerase chain reaction*, PCR**, véase Cap. 10), se utilizan las DNA-polimerasas estables al calor de la bacteria *Thermus aquaticus*, que entre otros lugares viven en las fuentes de agua hirvientes del Parque Nacional de Yellowstone. Se denominan también Taq-polimerasas.

3.3 No todos los genes constan de DNA: los virus RNA utilizan RNA de una única hebra

El genoma de casi todos los organismos consta de DNA. Sin embargo, algunos virus utilizan RNA (ácido ribonucleico), que está rodeado de una envoltura proteica. El virus del mosaico del tabaco (VMT), que ataca las hojas de esta planta, consta de una molécula de RNA de una única hebra con 6395 nucleótidos y una envoltura proteica con 2130 subunidades idénticas (Fig. 3.7). Una **RNA-polimerasa** cataliza su replicación.

Otra clase importante de virus RNA son los **retrovirus**. En ellos el río de información genética no fluye como es habitual, desde el DNA al RNA, sino en dirección contraria (*retro*). A los retrovirus pertenecen el VIH causante del sida y algunos virus precursores de cáncer (Cap. 5).

Contienen dos copias de RNA de una única hebra. Al entrar en la célula atacada, este RNA se reescribe a DNA mediante una enzima viral que entra conjuntamente, la **transcriptasa inversa** (véase 3.13 y Fig. 3.35), y la doble hebra de DNA formada de este modo entra en el genoma cromosómico del huésped. La célula del huésped produce más tarde, con la información del genoma viral integrado, nuevos RNA virales y nuevas proteínas de cubierta del virus, que se unen para formar partículas infecciosas de virus (véase Cap. 5).

3.4 La aclaración del código genético

Sólo después de saberse que la información genética se encuentra en las cuatro bases se planteó la pregunta sobre cómo se codifican las instrucciones de la construcción genética en esta secuencia de bases.

En los años 1940, los dos investigadores de genética americanos **George W. Beadle** (1903-1989) y **Edward L. Tatum** (1909-1975), juntamente con **Joshua Lederberg** (nacido en 1925), los fundadores de la genética de fagos, aclararon el asunto. Ellos postularon: **"Un gen conduce a la producción de una enzima"**.

Las enzimas son moléculas proteicas. Por ejemplo, se podría sospechar que el gen para la coloración azul de los pétalos de las flores induce la producción de una enzima que controla la formación del colorante azul de las flores. Beadle, Tatum y Lederberg obtuvieron en 1959 el premio Nobel de Fisiología o Medicina.

La pregunta clave era, sin embargo, de qué forma las instrucciones de construcción del DNA llevan a la formación de proteínas. Las proteínas son moléculas de medidas diferentes, que se componen de 20 aminoácidos distintos. El tipo, el número y la **secuencia de los aminoácidos** en la molécula de proteína determinan sus propiedades (véase en el Cap. 2 el ejemplo de la lisozima).

La ordenación de las bases en el DNA, la **secuencia de DNA**, entrega las instrucciones para incorporar los aminoácidos en la proteína. Las instrucciones de construcción se encuentran en el conocido lenguaje de las bases A, C, G y T; las proteínas se escriben, en cambio, en otro lenguaje completamente diferente, el de los aminoácidos. La clave para traducir del lenguaje del DNA al de los aminoácidos se denomina **código genético**.

Tras el modelo de la doble hélice de Watson y Crick de los años 1950 se empezó a especular sobre el tipo de código genético: cuatro bases diferentes sirven



Fig. 3.5 Erwin Chargaff (1905-2002).

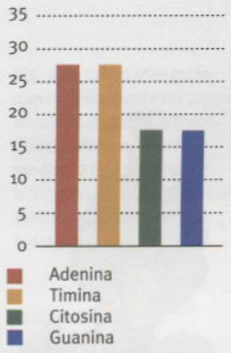


Fig. 3.6 Composición del DNA humano en porcentaje. Distribución de las bases A, T, C y G en el genoma humano, como se resume en las reglas de Chargaff.

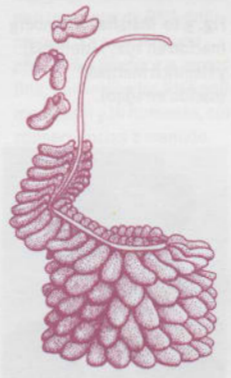


Fig. 3.7 Construcción del virus del mosaico del tabaco (VMT) con subunidades proteicas y una molécula de RNA de una única hebra.

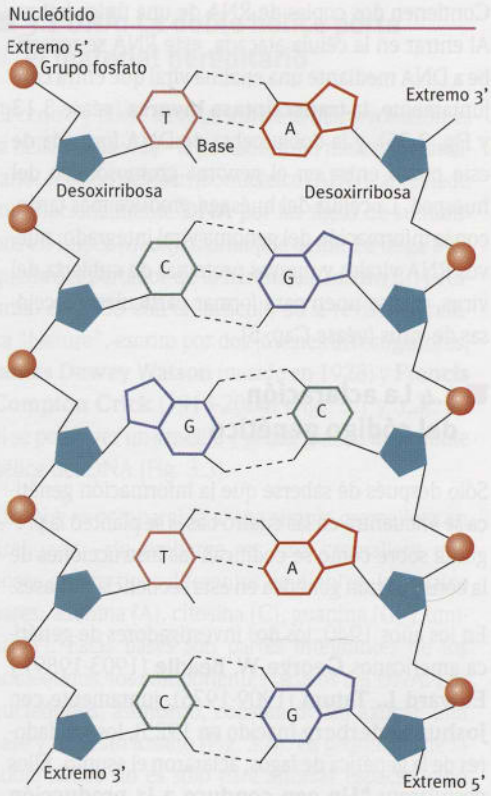


Fig. 3.8 Del DNA a la proteína. Derecha, arriba: estructura de la doble hélice del DNA. Derecha, abajo: cómo se transcribe la secuencia de bases del DNA al RNAm y desde los ribosomas se traduce a una secuencia de aminoácidos.

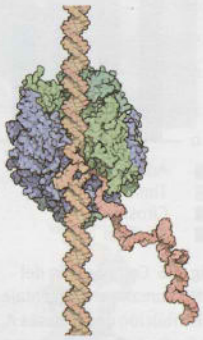


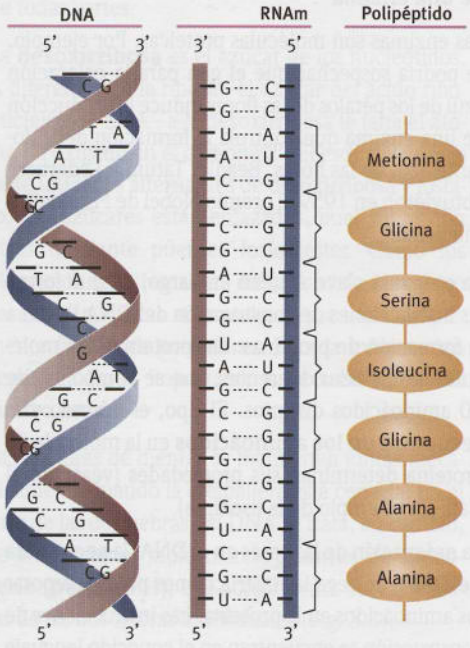
Fig. 3.9 RNA polimerasa con un RNAm nuevo sintetizado.



Fig. 3.10 Marshall Nirenberg (nacido en 1927) (derecha) y Heinrich Matthaei (nacido en 1940).



Fig. 3.11 Har Gobind Khorana (nacido en 1922), premio Nobel en 1968 con Nirenberg y Holley.



como instrucciones para la colocación por transferencia de 20 diferentes aminoácidos. Sólo una combinación de varias bases puede, pues, aportar las instrucciones para la instalación de un aminoácido en una proteína; si fueran combinaciones de dos, se conseguirían $4 \times 4 = 16$ posibilidades de combinación para la transferencia –demasiado pocas para la codificación de 20 aminoácidos. Por lo tanto, se requerirían al menos combinaciones de tres (**tripletes** o **codones**): 4^3 $(4 \times 4 \times 4) = 64$. Debido a que no se requieren 64 sino 20 instrucciones para la incorporación de los 20 aminoácidos, se podría sospechar que se usan varias combinaciones de tres para incorporar un mismo aminoácido. El código está, pues, "**degenerado**".

Se supo también a finales de la década de 1950 que las proteínas no se producen directamente en el DNA. El DNA genómico de las bacterias procariotas nada libre en el plasma, mientras que el DNA eucariótico se encuentra encerrado fuertemente en el núcleo celular (Fig. 3.16). Aparte del DNA genómico en el núcleo celular, los eucariotas poseen también DNA mitocondrial, y las células vegetales lo contienen en los cloroplastos.

Las proteínas se originan fuera del núcleo en el citoplasma. Las células disponen allí sus propias fábricas de proteínas: los ribosomas. En esta brecha entre el núcleo y la fábrica debe tenderse un puente.

¿Cómo llegan las instrucciones de construcción contenidas en el DNA desde el núcleo celular a los ribosomas en el citoplasma? Se requiere un mensajero (en inglés *messenger*). Tal mensajero biológico es también necesario por motivos de "economía celular".

3.5 El genoma humano – Una enorme enciclopedia de 24 volúmenes

El genoma del ser humano tiene 3 080 000 000 letras, aproximadamente 750 megabytes en información digital. Llenaría unos 5000 libros como éste y cabría en un único DVD (*Digital Versatile Disc*).

El ser humano posee de 20 000 a 25 000 genes codificadores de proteínas.

Un único de los 24 **cromosomas humanos** lleva pues, como media, aproximadamente 1000 genes diferentes.

El genoma humano se puede comparar con el contenido de una enciclopedia de 24 volúmenes "supergordos". Otra comparación ilustrada: con él se pueden llenar 2000 guías telefónicas como la de Nueva York (Cap. 10).

Cada volumen (cromosoma) de la enciclopedia (genoma) contiene aproximadamente 1000 instrucciones de construcción (genes) para proteínas, y la longitud de las instrucciones de construcción varía mucho. El lenguaje es raro: cada palabra (codón) consta sólo de tres letras y el alfabeto nada más tiene cuatro letras (A, T, C, G). Algunas instrucciones son únicamente unas pocas líneas, mientras que otras ocupan varias páginas.

Cada instrucción de construcción de proteína (**exón**) está interrumpida a menudo por varios, y

para nosotros hasta ahora incomprensibles, complicados lazos (**intrones**) que a veces se extienden claramente sin sentido y en repeticiones hacia los lados.

Si se solicita una determinada instrucción de construcción (un gen), la administración de la biblioteca (o sea, la célula) prepara una copia, en lugar de prestar el volumen original muy pesado de la enciclopedia. ¡Cuyo valor es además incalculable!

El nombre de esta copia genética de una hebra es **ácido ribonucleico mensajero (RNAm)**.

La copia de RNAm del gen se corresponde químicamente al original DNA. Como éste, consta también de un "esqueleto" alternando unidades de azúcar y fosfato, en el cual se asientan las mismas bases: A, C, G. La base timina se reemplaza, sin embargo, por la base **uracilo** (U), que aparece en el RNA en todos los lugares donde en el DNA se encuentra timina (T) (Fig. 3.8).

El azúcar del RNAm es, como ya se ha mencionado, una **ribosa**. Posee, a diferencia de la desoxirribosa del DNA, un grupo OH en el átomo de carbono 2 del azúcar.

Si la célula requiere una determinada proteína, se prepara primero del DNA una copia de RNAm del gen correspondiente. En los seres vivos superiores (eucariotas) estas copias se desplazan desde el núcleo celular al citoplasma, hacia la fábrica de proteínas en los ribosomas. Aquí, el RNAm dirige la formación de la proteína (Fig. 3.16).

El procedimiento para la producción de una copia de RNAm a partir de una fracción de DNA, la **transcripción**, se asemeja mucho al procedimiento de la copia (replicación) de la división celular, en la fase S de la mitosis.

En lugar de la DNA polimerasa actúa aquí otra enzima. La "cremallera" de la doble hélice se abre localmente al "principio de un gen", y en las bases libres se coloca la enzima **RNA polimerasa** (Fig. 3.9) para la correspondiente colocación de las "partes prefabricadas":

- frente a una adenina del DNA un uracilo,
- frente a una citosina del DNA una guanina,
- frente a una guanina del DNA una citosina y
- frente a una timina del DNA una adenina del RNA.

La **inhibición** irreversible de las RNA polimerasas mediante la α-amanitina (Fig. 3.13) es, a propósito, la causa de que cada año mueran en el mundo unas cien personas por envenenamiento con la seta *Amanita*. Las células no pueden sintetizar más RNAm y por tanto tampoco más proteínas.

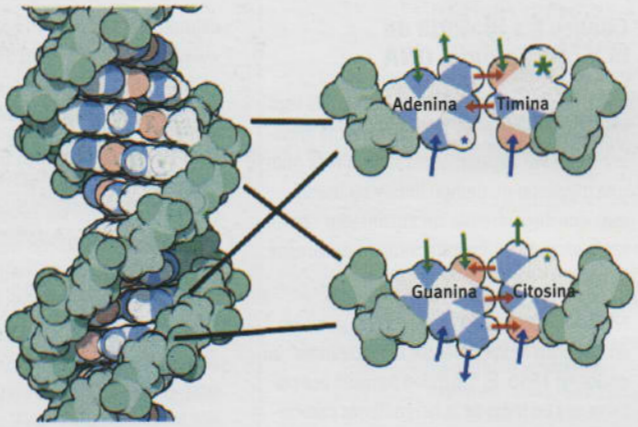


Fig. 3.12 Cómo interaccionan químicamente los pares de bases (regla de Watson-Crick): adenina-timina mediante dos puentes de hidrógeno, guanina-citosina mediante tres puentes de hidrógeno.

3.6 El código de DNA se agrieta: el RNA sintético descifra los codones

El principio del código genético ya era conocido a principios de los años 1960, pero aún no se había descrifrado. ¿Cuál de las 64 combinaciones posibles de tres bases (codón) controla la incorporación de cuál de los 20 aminoácidos diferentes en una proteína?

El experimento decisivo lo realizaron en 1961 el americano **Marshall Nirenberg** (nacido en 1927) y el alemán **Heinrich Matthaei** (nacido en 1940) (Fig. 3.10), en el Congreso Internacional de Bioquímica en Moscú.

Fabricaron enzimáticamente una molécula de RNAm artificial, que constaba sólo de la base uracilo (-U-U-U-U-etc.), y trasladaron estas instrucciones de colocación artificiales a una mezcla de reacción cuidadosamente preparada. La mezcla contenía todos los componentes químicos a partir de los cuales se construyen las células vivas, pero con una diferencia significativa: no contenía ningún otro DNA ni RNA que la molécula de RNAm artificial con bases U. No obstante, tras la adición del programa conductor, la mezcla de reacción "muerta" empezó a generar una proteína como en una célula viva. La molécula proteica artificial constaba de una cadena con el aminoácido fenilalanina monótonamente repetido: -Phe-Phe-Phe-etc.

Nirenberg y Matthaei habían descifrado con ello la primera de las 64 posibles combinaciones de tres del código genético. El codón U-U-U del RNA conduce, pues, a la incorporación del aminoácido fenilalanina a una molécula de proteína.

Pronto se determinó "AAA" como el codón para la lisina, "CCC" para la prolina, y así sucesivamente. Por fin, en 1966 terminó la búsqueda del código genético gracias al indio residente en Estados Unidos

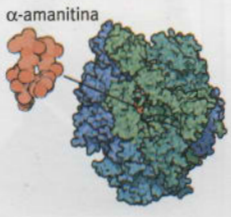




Fig. 3.13 Los eucariotas tienen tres tipos de RNA-polimerasa. La seta *Amanita phalloides* produce α-amanitina, que inhibe las RNA polimerasas II y III humanas, con consecuencias a menudo mortales.

¿Qué es una kilobase (kb)?

Kilobase (kb) significa 1000 bases de una doble hebra de DNA o de una molécula de una única hebra. 1 kb de una doble hebra de DNA tiene 0,34 micrómetros de longitud y una masa de aproximadamente 660 000 dalton.

Cuadro 3.1 Historia de la biotecnología: DNA

"Mientras que el señor abad era el guía espiritual más popular en Brünn, ninguna alma creía que sus experimentos fueran más que una diversión de tiempo libre y su teoría más que disparates de un encantador charlatán", escribió un contemporáneo de Gregor Mendel.

Mendel (1822-1884) había hecho públicos en 1865 sus "experimentos con guisantes" iniciados en 1856. Él fue quien formuló por primera vez las leyes de la herencia: las características puras observadas externamente (por ejemplo los colores de las flores y las formas de las semillas y las vainas) se determinan por los factores que se heredan independientemente unos de otros. Estos factores hereditarios se denominaron más tarde genes.



Gregor Mendel (1822 - 1884)

En 1900 las leyes de Mendel fueron "redescubiertas" por C.E. Correns, E. von Tschermak y H. de Vries.

En 1869, **Johann Friedrich Miescher** (1844-1895), de Basilea, aisló del pus de un vendaje una sustancia, la "nucleína". Esta sustancia no pudo degradarse por las enzimas fragmentadoras de proteínas. Tenía propiedades ácidas, y por ello se denominó más tarde nucleína, por los "ácidos nucleicos". Miescher encontró también nucleína en levaduras, células de riñón y de hígado, así como en los glóbulos rojos de la sangre.

Sin embargo, pasaron más de 50 años hasta que se supo que el DNA se forma conjuntamente a partir de seis componentes: ácido fosfórico, el azúcar desoxirribosa y las cuatro bases adenina, guanina, timina y citosina. Esta estructura simple no permitía explicar funciones complejas como la herencia.

Rudolf Signer (1903-1990), de Berna, produjo DNA en forma pura por primera vez en 1938. Ya había pasado un tiempo cuando se descubrió que las bases del DNA son anillos planos, que se encuentran colocados verticalmente respecto a una cadena de la molécula. En 1950 entregó 15 gramos del más valioso DNA altamente purificado, según Cambridge el "maná de Berna".

En 1928, el bacteriólogo británico **Frederick Griffith** (1877-1941) realizó un experimento con neumococos, los causantes de la neumonía. Griffith trabajó con dos cepas de neumococos. Una de ellas no tenía ninguna cápsula y recibió la denominación R (del inglés *rough*, rugosa). La otra formaba cápsulas y se describió como cepa S (del inglés *smooth*, lisa). En experimentos con ratones, la cepa S lisa fue mortal y la cepa R rugosa resultó inofensiva. Si se mataba a las bacterias de la cepa S peligrosa y se inyectaban a un ratón, no causaban daño al animal. Pero si se inyectaba al ratón una mezcla de bacterias R vivas y bacterias S muertas, moría. Los neumococos R originalmente inofensivos habían adquirido el factor letal de la cepa S.



Friedrich Miescher (1844-1895) descubrió en 1869 los ácidos nucleicos.

Griffith describió esto como una de las primeras posibilidades de intercambio de genes entre las bacterias (transformación). Hoy se sabe que el DNA de las bacterias S mortales había sobrevivido al proceso de calentamiento y lo habían tomado los neumococos R inofensivos. El DNA de la cepa S contenía el gen decisivo que protege a las bacterias del sistema inmunitario del huésped.

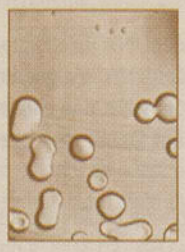
Tras un tiempo como médico clínico, el canadiense **Theodore Avery** (1877-1955) trabajó como científico en el Rockefeller Institute of Medical Research, desde 1913 hasta 1947. En 1944, 75 años después de Friedrich Miescher, demostró con **MacLeod** y **McCarty** que los ácidos nucleicos son los portadores de la información genética y no las proteínas, como se asumía hasta entonces. ¿Qué es el "principio de transformación" del intercambio de genes? ¿Y qué se considera un gen químicamente? Avery fue un paso más lejos que Griffith y tomó para su experimento no los simples neumococos S inactivados por calor, sino extractos celulares que se purificaban cada vez más. Todas las fracciones (componentes de la pared celular, diversas fracciones proteicas y fracciones que contenían ácidos nucleicos) se estudiaron según su capacidad de conseguir el paso de la formas R a la forma S. Cuando se añadía etanol se producía una precipitación en el tubo de ensayo y el "principio" ya no funcionaba. Los hidratos de carbono, como las cápsulas bacterianas, no precipitan con alcohol; en cambio, los ácidos grasos precipitan bien. Las proteasas no mostraron ningún efecto. El experimento, pues, sólo dio resultado con las fracciones que contenían ácidos nucleicos.



Theodore Oswald Avery (1877-1955) demostró, en 1944, que el DNA es el portador de la herencia. Fundó la genética molecular.

Sin embargo, si Avery añadía la enzima ribonucleasa, fragmentadora del RNA, el "principio" aún era eficaz. Ni las proteínas ni el RNA eran la causa de la transformación. El test químico para el análisis del azúcar del DNA desoxirribosa se coloreó de azul: ¡era DNA! Sólo las fracciones que contienen DNA, así como el DNA químicamente puro, transforman las células receptoras R inofensivas de modo duradero al fenotipo S patógeno. El DNA era, pues, el principio transformador. Los experimentos de Griffith y Avery son, desde el punto de vista actual, asombrosamente modernos. Fueron los primeros experimentos de ingeniería genética de la historia.

La tercera parte de la historia del DNA la escribieron Erwin Chargaff, Maurice Wilkins, Francis C. Crick y James D. Watson.



De un artículo clásico de Avery: pequeñas colonias de las cepas inofensivas rugosas no encapsuladas de *Streptococcus pneumoniae* (arriba) y de las cepas lisas encapsuladas (abajo).

Erwin Chargaff (Fig 3.5) venía de una familia judía. Tras la toma de poder de los nazis abandonó Alemania y fue a París,

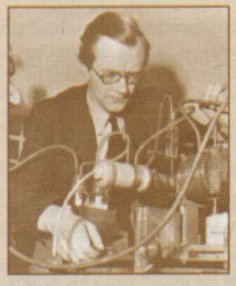
al Instituto Pasteur. En 1935 emigró a Estados Unidos y trabajó, a partir de 1938, en la Universidad de Columbia en Nueva York. Desde 1944 en adelante investigó sobre el DNA.

Chargaff estableció que en el DNA de cada ser vivo existe la misma relación de cantidad de adenina a timina y de citosina a guanina, lo que formuló con las por él mismo denominadas "reglas de Chargaff" (Fig. 3.6). Chargaff tuvo más tarde una seria advertencia por el abuso de la ingeniería genética.



Rosalind Franklin (1920- 1958)

De joven entusiasta en ornitología, el enormemente inteligente **James Dewey Watson** empezó, a la edad de 15 años, los estudios de zoología en la Universidad de Chicago. Cada vez más interesado en las cuestiones de la nueva genética, realizó su trabajo de doctorado con Salvador Luria, uno de los fundadores de la investigación de fagos. Estos virus, que atacan las bacterias (Cap. 5), eran válidos como modelos para los genes.



Maurice Wilkins (1916-2004), premio Nobel con Watson y Crick.

En 1950 Watson fue a Europa, a estudiar las bases bioquímicas de la proliferación de fagos. Llegó a Cambridge –"el hombre apropiado en el momento apropiado en el lugar apropiado"– y junto al físico y cristalógrafo **Francis Crick** aclararon en un tiempo corto, en 1953, la estructura de la doble hélice del DNA. La historia de la doble hélice la explicó mucho mejor el mismo Jim Watson. Él y Crick se estimularon con la competencia de la cristalógrafa de DNA londinense **Rosalind Franklin** (1920-1958) –que demostró la estructura en hélice del DNA– y de **Maurice Wilkins** (1916-2004), que compartió más tarde el premio Nobel con Watson y Crick. El químico americano **Linus Pauling** reconoció en 1951 la hélice como un elemento estructural decisivo de las proteínas, y luego examinó la estructura del DNA. Él postuló, sin embargo, una triple hélice en lugar de una doble hélice –y según el hijo de Pauling, Peter, Watson y Crick experimentaron una completa "alegría del mal ajeno académico".

Después de ganar la carrera del DNA, Watson buscó otros retos prometedores. Su experimento para aclarar la estructura del RNA, sin embargo, falló estrepitosamente.



El doble ganador de premio Nobel Linus Pauling (1901-1994).

En los siguientes años, jóvenes investigadores de Estados Unidos, Inglaterra y Francia, aparte de Watson y Crick, entre otros Sydney Brenner (Cap. 10), Richard Feynman y los expulsados de Alemania Erwin Chargaff, Gunther Stent y Edward Teller, bajo la dirección del científico ruso-americano Georgi Gamow, formaron el "club de la corbata del RNA", en el cual, de modo interdisciplinario y con el apoyo de muchos contactos informales, resolvieron acuciantes preguntas de la biología molecular, especialmente las del código genético.

También como maestro, en la Universidad, Watson fue revolucionario. Su idea era que el éxito científico depende de que los profesores enseñen rápidamente a los estudiantes su propia independencia. Llevó su idea a la práctica en los años 1960 en la Universidad de Harvard. Juntamente con Walter Gilbert aplicó este principio, por el cual ambos renunciaron a la práctica normal de los profesores de poner sus nombres en las publicaciones de sus estudiantes incluso aunque se hubieran originado sin su ayuda directa.

Watson fue definitivamente decisivo en el desarrollo del proyecto del genoma humano (Cap. 10), y con sus indicaciones y comentarios controvertidos aseguró, hasta hoy, los debates polémicos.

¿Cómo se escriben las secuencias de DNA?

El grupo hidroxilo 5' de un nucleótido está enlazado por un grupo fosfato con el grupo hidroxilo 3' del siguiente nucleótido (Fig. 3.8).

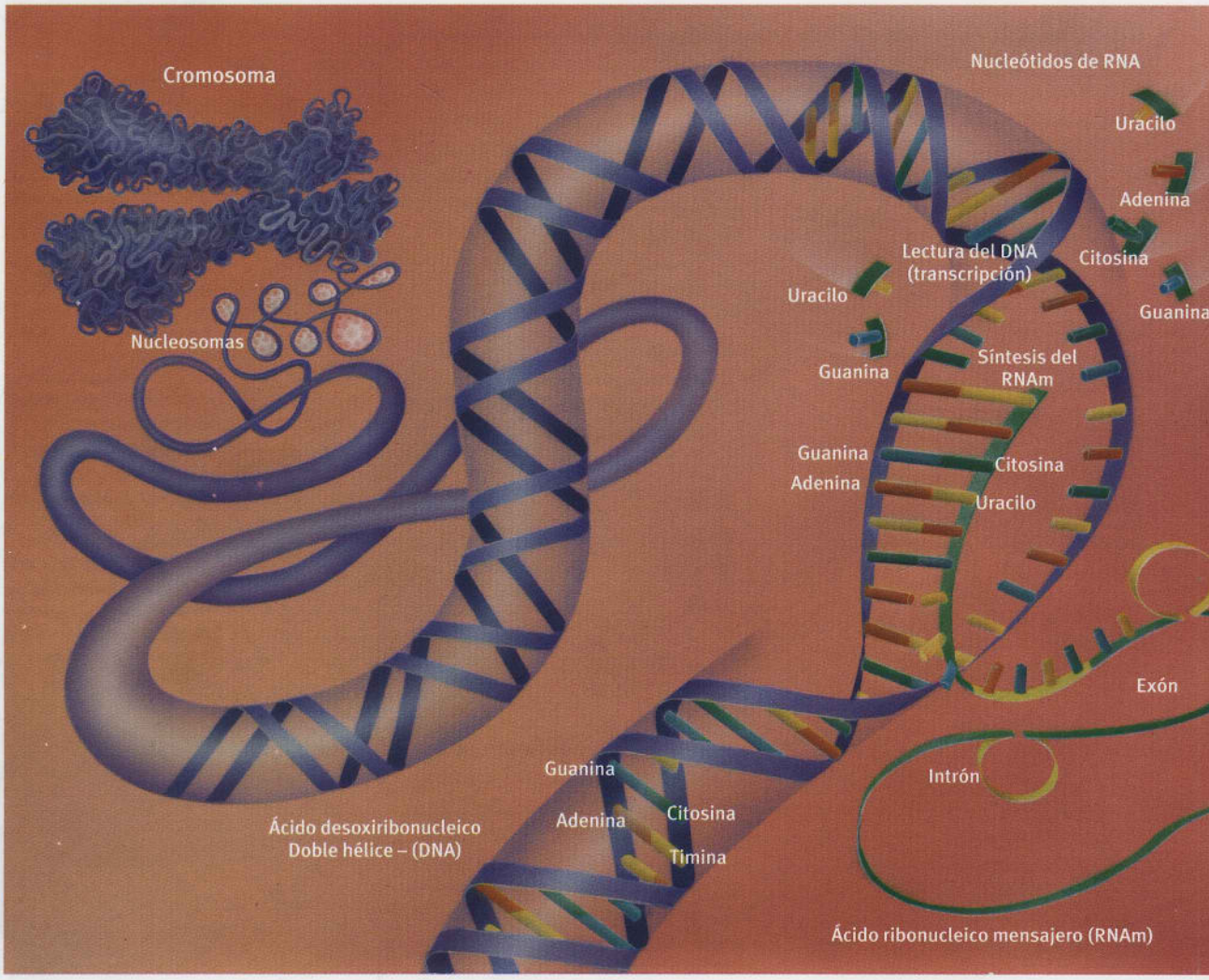
Todos los enlaces fosfodiéster en las hebras del DNA y del RNA están formados de la misma manera a lo largo de la cadena. Esto confiere a cada hebra de ácido nucleico una determinada polaridad y extremos 5' y 3' diferenciables. Se ha acordado escribir la secuencia en la dirección 5'-3'.

La forma abreviada ACCGGT significa, pues, 5'-ACCGGT-3'. A dispone de un grupo fosfato 5' en la "cabeza"; T, en cambio, un grupo OH-3' no enlazado en la "cola". La base de esta polaridad es que ACCGGT y la complementaria TGGCCAi son dos moléculas completamente diferentes!



Fig. 3.14 Visión en un microscopio electrónico de una célula de *E. coli* estallada (flecha: plásmido).

Una célula de *E. coli* estallada con su importante DNA en forma de anillo (aproximadamente un milímetro de longitud) y algunos plásmidos. La célula mide, en cambio, solamente dos micrómetros.



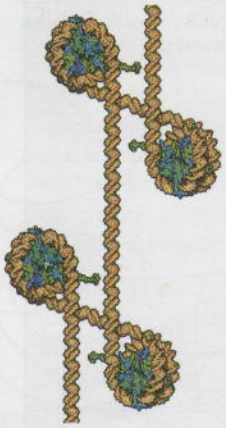


Fig. 3.15 El DNA no se encuentra desnudo en los cromosomas de las células eucariotas, sino que está estrechamente unido a pequeñas proteínas, las histonas. Juntos forman los nucleosomas.

Fig. 3.16 y 3.17 Todas las células vivas producen proteínas. Una molécula de proteína consta de aminoácidos. Las instrucciones sobre en qué orden (secuencia) se colocan los aminoácidos uno tras otro en la síntesis de proteínas se encuentra en el ácido desoxirribonucleico (DNA), largas moléculas lineales de doble hebra.

Cada hebra del DNA consta asimismo de componentes denominados nucleótidos y que se conocen con las letras iniciales de las bases que contienen: adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T).

Los nucleótidos se encuentran en pares complementarios, es decir, en dobles hebras de DNA en las que siempre hay en frente sólo un nucleótido A/T y C/G.

Cada aminoácido en la proteína significa un triplete de nucleótidos en el DNA. La totalidad de los tripletes de DNA que especifica una molécula de proteína se decribió como gen estructural de una proteína.

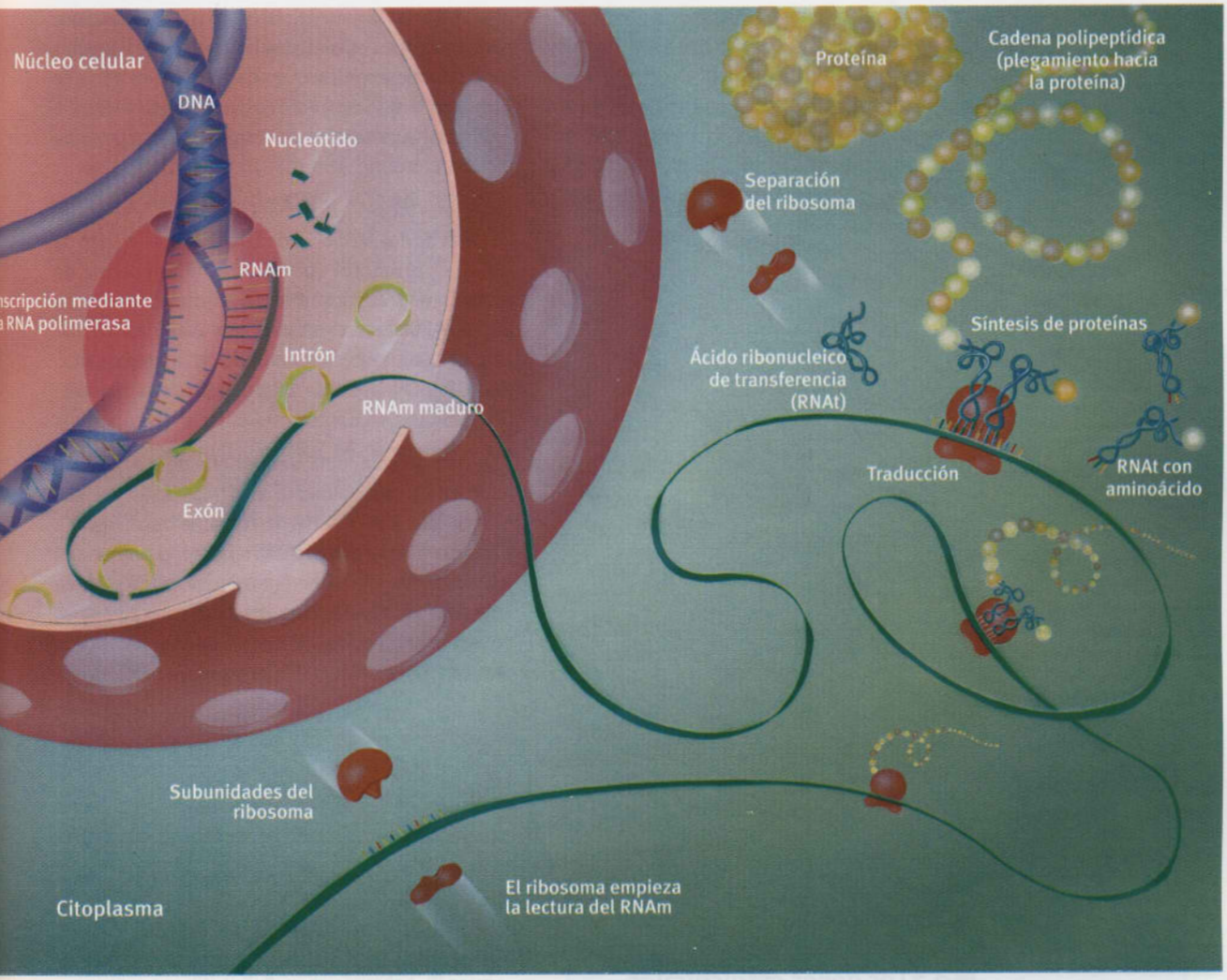
En los eucariotas, un gen de estructura como éste puede constar de varios fragmentos que llevan información (exones), entre los cuales se encuentran fragmentos de DNA (intrones) que no contienen ninguna información sobre las estructuras de las proteínas.

Las secuencias de nucleótidos no sólo pueden indicar aminoácidos específicos, sino también señales, que son interpretadas por la maquinaria que sintetiza proteínas como solicitudes de "inicio" o "parada".

Para que la información contenida en el DNA pueda ser eficaz en el citoplasma, el DNA debe transcribirse a ácido ribonucleico mensajero (RNAm). También el RNAm consta de nucleótidos, pero en lugar de la base timina (T) en el DNA aparece aquí el uracilo (U).

Al reescribir (transcripción) se copian primero los exones e intrones del DNA por la polimerasa. Entonces se eliminan del RNAm los intrones correspondientes de las secuencias de nucleótidos (*splicing*). El producto es una molécula de RNA más corta, que se describe como RNAm "maduro" (*mature*) porque se traslada desde el núcleo celular al plasma celular y, como un mensajero, lleva los planos de construcción de la molécula de proteína.

El orden de los nucleótidos (secuencia) del RNAm se traduce (traducción) entonces en el plasma celular con la ayuda de los ribosomas y los ácidos ribonucleicos de transferencia (RNAt) cargados con los 20 diferentes aminoácidos en la secuencia primaria de las proteínas. Las cadenas polipeptídicas sintetizadas se pliegan entonces para formar las proteínas.



Har Gobind Khorana (nacido en 1922) (Fig. 3.11), con el desciframiento de las últimas 64 posibles combinaciones de tres.

Con ello quedaba claro que los aminoácidos se codifican con grupos de tres bases (**tripletes**), e indudablemente se parte de un determinado punto de inicio. Sesenta y uno de los 64 codones deciden aminoácidos, y los tres restantes (UAA, UAG y UGA) son señales de **rotura de la cadena**. AUG es, en los eucariotas, una **señal de inicio** y codifica también para la metionina.

Sólo hay 61 posibles palabras en clave para 20 aminoácidos. O sea, para algunos aminoácidos existen más palabras en clave, y por lo tanto el código genético está "degenerado": para la valina y la alanina hay cuatro codones diferentes, para la leucina hay seis. Mediante esta degeneración del código genético, la secuencia de aminoácidos de una proteína no deriva siempre de una secuencia exacta de nucleótidos del DNA. El **código genético es en principio universal**. Sin embargo, hay excepciones: las mitocondrias, orgánulos celulares de los cuales se asume que habrían sido bacterias antiguas que entraron en simbiosis con las células superiores. Las células ofrecían protección, las bacterias suministraban energía. Las mitocondrias pueden tener un código desviado del resto de las células. Así, UGA no es en las mitocondrias humanas una señal de parada, sino que codifica para triptófano. También los ciliados (*ciliophora*) se separaron pronto en la evolución a su propio camino y han originado un código genético ligeramente desviado. Por ejemplo, aquí UGA es la única señal de parada. Los codones de rotura de cadena UAA y UAG codifican en los ciliados para otros aminoácidos.

¿Por qué el código ha permanecido casi invariable a lo largo de miles de millones de años? Cuando una mutación cambia drásticamente la lectura del RNAm se desencadena la modificación de la secuencia de

Exones e intrones – Un raro manuscrito

El científico-publicista inglés Steve Prentis comparó los genes de los eucariotas acertadamente con un raro manuscrito: algunas páginas con exquisita prosa (exones) siguen a letras y palabras sin sentido (intrones), antes de empezar otra vez los siguientes párrafos "ordenados" (exones).

El lector debe extraer (cortar y empalmar) los lugares sin sentido en el ejemplar copiado (RNAm) y unir los párrafos con información útil. El manuscrito acabado (*RNAm maduro*) puede entonces llevarse al impresor de libros (ribosoma) y se obtiene un libro lleno de sentido (proteína).

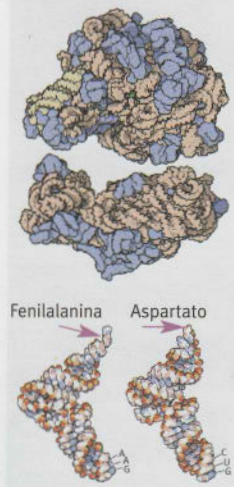
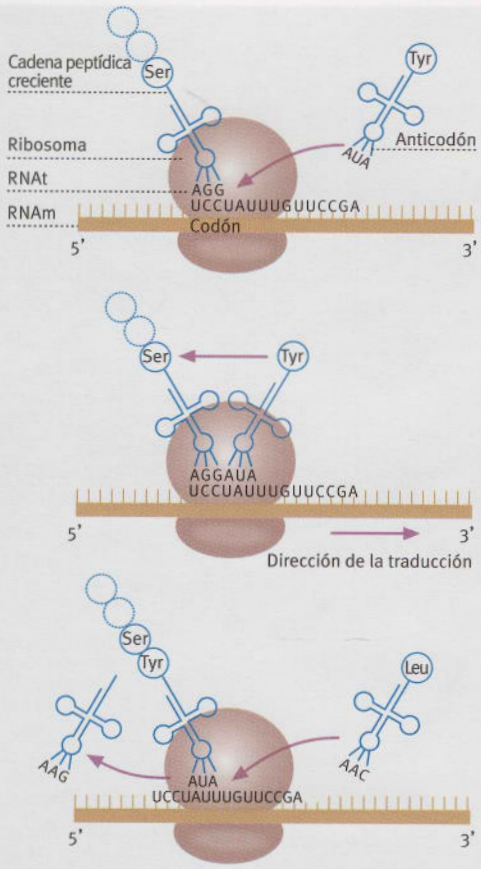


Fig. 3.19 El ribosoma consta de dos subunidades que envuelven a un RNAm durante la síntesis de proteína. Arriba: un ribosoma bacteriano. Los ribosomas eucarióticos son algo mayores. Los ribosomas constan mayoritariamente de RNA (en naranja y amarillo), que forma complejos con proteínas (azul). La subunidad pequeña "asocia" para cada codón del RNAm un anticodón prueba del RNAt con el aminoácido correspondiente. La subunidad grande cataliza la síntesis: traslada el aminoácido del RNAt a la cadena polipeptídica creciente. Abajo: dos de los 20 RNAt: el RNAt-aspartato lleva aspartato, el RNAt-fenilalanina lleva fenilalanina (flecha). Se ven también claramente los anticodones.



Fig. 3.20 Robert W. Holley (1922-1993) investigó el RNAt. Premio Nobel en 1968 con Nirenberg y Khorana.

Fig. 3.18 Derecha: traducción del RNAm a proteína en el ribosoma.



aminoácidos de casi todas las proteínas. Sin embargo, tales mutaciones serían mortales y se eliminarían rápidamente en la evolución por selección natural.

3.7 Los genes estructurales cercanos a los fragmentos de DNA controlan la expresión de los genes

En las bacterias, que como **procariotas** no poseen un núcleo celular, el DNA forma un anillo cerrado de al menos un milímetro de longitud. Todo esto se encuentra, sin embargo, como un apretado paquete en el interior de una célula bacteriana, que ocupa un espacio de sólo una milésima de milímetro (ver págs. 54 y 55).

De este modo, en un milímetro de DNA se alinean en la "cepa de seguridad" K12 de *Escherichia coli* exactamente 4 639 221 pares de bases, unos detrás de otros. Llevan genes codificadores de apenas 4300 proteínas. Los denominados **genes estructurales**, cada uno de aproximadamente 1000 pares de bases de longitud, codifican la estructura de una única proteína, principalmente de una enzima. Un gen estructural dirige la maquinaria de la célula, de modo que algunos cientos de aminoácidos en los ribosomas se encadenan en una determinada secuencia y con ello forman una determinada proteína.

No todas las zonas del DNA codifican proteínas. Fragmentos especiales, que están cerca de los genes estructurales, controlan su **expresión**, es decir, se ocupan de que uno de estos genes se transcriba a RNAm (transcripción) y se traduzca a una proteína (traducción).

El primer proceso, la **transcripción**, se lleva a cabo a partir de dos secciones de DNA especiales. Una de ellas, el **promotor** (**punto de inicio**), consta de una corta secuencia que permite que la enzima RNA polimerasa se una al DNA y lo recorra a lo largo. La enzima empieza entonces, en un lugar cercano a uno de los genes estructurales, con la transcripción del DNA a RNAm.

La otra sección, una **secuencia de parada**, se encuentra espacialmente algo más atrás del gen estructural y da la señal de acabar la transcripción. En *E. coli*, la señal de parada origina, en la hebra del RNAm sintetizada de nuevo, una estructura en "horquilla". Cuando se origina esta horquilla se libera enseguida la RNA polimerasa del nuevo RNAm sintetizado.

Las eucariotas poseen otros promotores (por ejemplo el promotor metalotioneína, que se ve afectado por iones metálicos pesados, detallado en el Cap. 8) y las secuencias *enhancer*, que practican potentes interacciones, y también las secuencias de parada.

En los eucariotas, el RNAm se modifica tras la transcripción: el extremo 5' se equipa con una estructura en caperuza (*cap*), el extremo 3' con una "cola" de componentes adenina [poli(A)] (véase la síntesis de la insulina en la Fig. 3.36). Otras zonas reguladoras se encuentran en los genes, cuya actividad cambia con la concentración instantánea de determinados productos del metabolismo.

Como veremos en la regulación de la utilización de la lactosa (detallada en el Cap. 4 como ejemplo del operador lac), la denominada **región del operador**, que se encuentra entre el promotor y el gen estructural, puede unir la denominada **proteína represora**.

Un **inductor** (por ejemplo un azúcar) se une a esta proteína represora, se modifica la estructura de la proteína en el espacio y abandona la región del operador. Así se permite libremente la lectura del gen estructural para la enzima degradadora del azúcar correspondiente.

3.8 Ribosomas – La fábrica de proteínas de la célula: una molécula gigante de RNA y proteínas

El RNAm contiene la información completa, incluyendo las señales de inicio y parada, para la síntesis

de proteínas. Se lee en el **ribosoma**. Los ribosomas constan de una subunidad grande y una más pequeña (Fig. 3.19). Son complejos de proteínas y RNA. Los **RNA ribosomales (RNAr)** son moléculas de una sola hebra y partes estabilizantes de los ribosomas. Los 20 RNAt diferentes se sintetizan a partir de 20 **aminoacil sintetasas** (Fig 3.21) completamente diferentes, de las que cada una une un determinado aminoácido a un determinado RNAt.

Junto al RNAm y al RNAr hay además otro tipo de RNA: los **RNA de transferencia (RNAt)**, que transportan aminoácidos en su forma activada al ribosoma (Fig. 3.18). Para cada uno de los 20 aminoácidos hay al menos un RNAt. Los RNAt constan de RNA con un "anticodón" en un extremo y el correspondiente aminoácido activado en el otro extremo (Fig. 3.19).

Otras secuencias de DNA, que se transcriben en RNAm junto al correspondiente gen estructural, supervisan el paso (**traducción**) en el ribosoma para obtener una cadena peptídica (Fig. 3.18). Un lugar de unión especial fija el RNAm al ribosoma. Empieza entonces la traducción en la señal de inicio, en el primer codón del gen estructural. Por último, una señal de parada al final del gen se ocupa de que la cadena proteica completa quede libre del ribosoma.

Sin una clara comprensión de todo este proceso es impensable una programación planificada del DNA. Así, las intervenciones en un gen estructural pueden cambiar la secuencia de aminoácidos de una enzima y con ello influir en su actividad. El promotor es capaz, incluso tras una alteración insignificante de su secuencia, de unir débilmente a la RNA polimerasa. Esto incrementa la eficiencia de la copia del DNA en RNAm (Cap. 4). Y definitivamente, las mutaciones en la región del operador o en un gen regulador pueden impedir que la proteína represora se coloque en su lugar normal. La transcripción se produce entonces a gran velocidad. A partir de aquí se traducen genes exógenos "incorporados" sólo entonces a las proteínas, si el promotor y los lugares de unión del huésped y del donante se parecen bastante uno al otro.

Las eucariotas, incluidos los organismos superiores, desde las levaduras y algas hasta los humanos, utilizan distintas **señales de control** que los procariotas, las bacterias. Ésta no es la única diferencia: en las células eucariotas no hay un DNA "desnudo" (Fig. 3.22). El DNA eucariota está empaquetado con proteínas (histonas) (Fig. 3.15) y distribuido en cromosomas. Los cromosomas se encuentran todos juntos en el interior del núcleo celular.

La célula de un hongo contiene ya diez veces más DNA que la de una bacteria, y las plantas y los animales superiores tienen incluso mil veces más, aunque su repertorio genético de ninguna manera se amplía en esta medida. Los humanos poseen, con 20 000 a 25 000 genes, sólo aproximadamente cinco veces más genes que una bacteria intestinal. Uno de los motivos de ello son los muchos genes estructurales "divididos", denominados **genes mosaico**, en los cuales se van alternando una tras otra las secciones codificadoras (**exones**) y las no codificadoras (**intrones, DNA "*junk*"**). Además, entre los genes hay largas secciones con secuencias repetidas varias veces (repetitivas), con una función hasta ahora desconocida.

Las pistas de la evolución (seguramente también la historia de los ataques de virus) indican la posible función del intrón (Cap. 10), y no tienen información legítima para la célula, por lo menos sobre la construcción de cadenas peptídicas. En los eucariotas, los intrones se copian a RNAm, forman

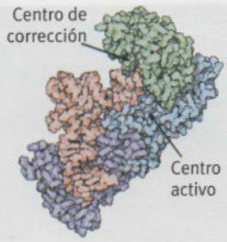
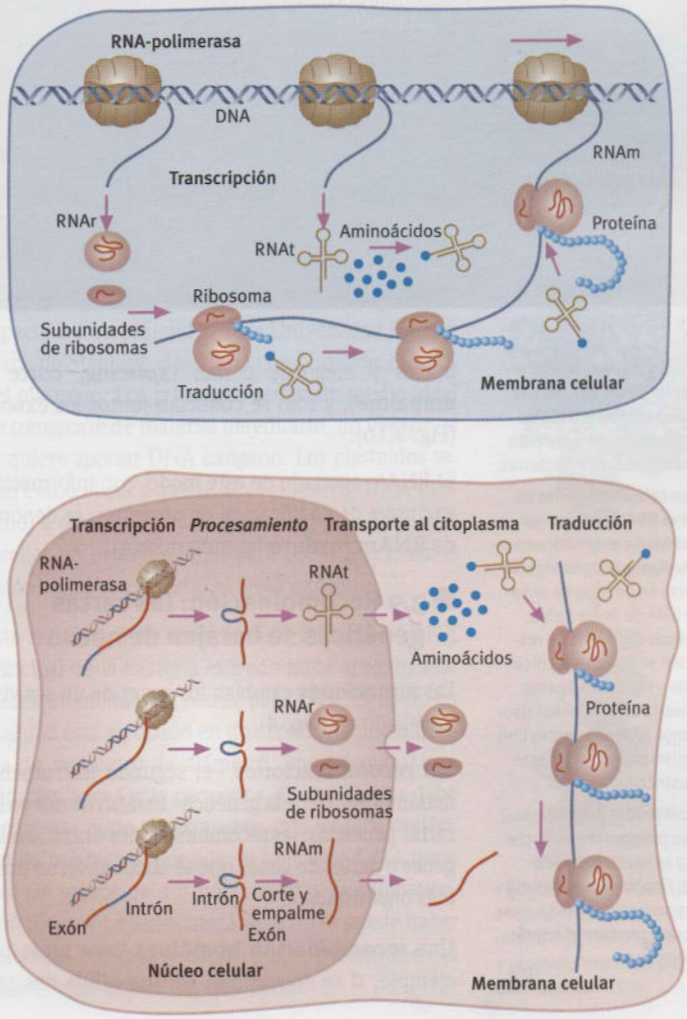


Fig. 3.21 Veinte diferentes aminoacil-RNAt-sintetasas conectan con mucha precisión los veinte aminoácidos con RNAt. La isoleucina es muy similar a la valina. Para evitar los fallos, la isoleucil-RNAt-sintetasa ocupa un centro activo adicional, que "corrige". Así sólo aparece un fallo en 3000 síntesis (¡en lugar de uno en 150 sin corrección!).

Fig. 3.22 Diferencias de la biosíntesis proteica en los procariotas (arriba) y los eucariotas (abajo).



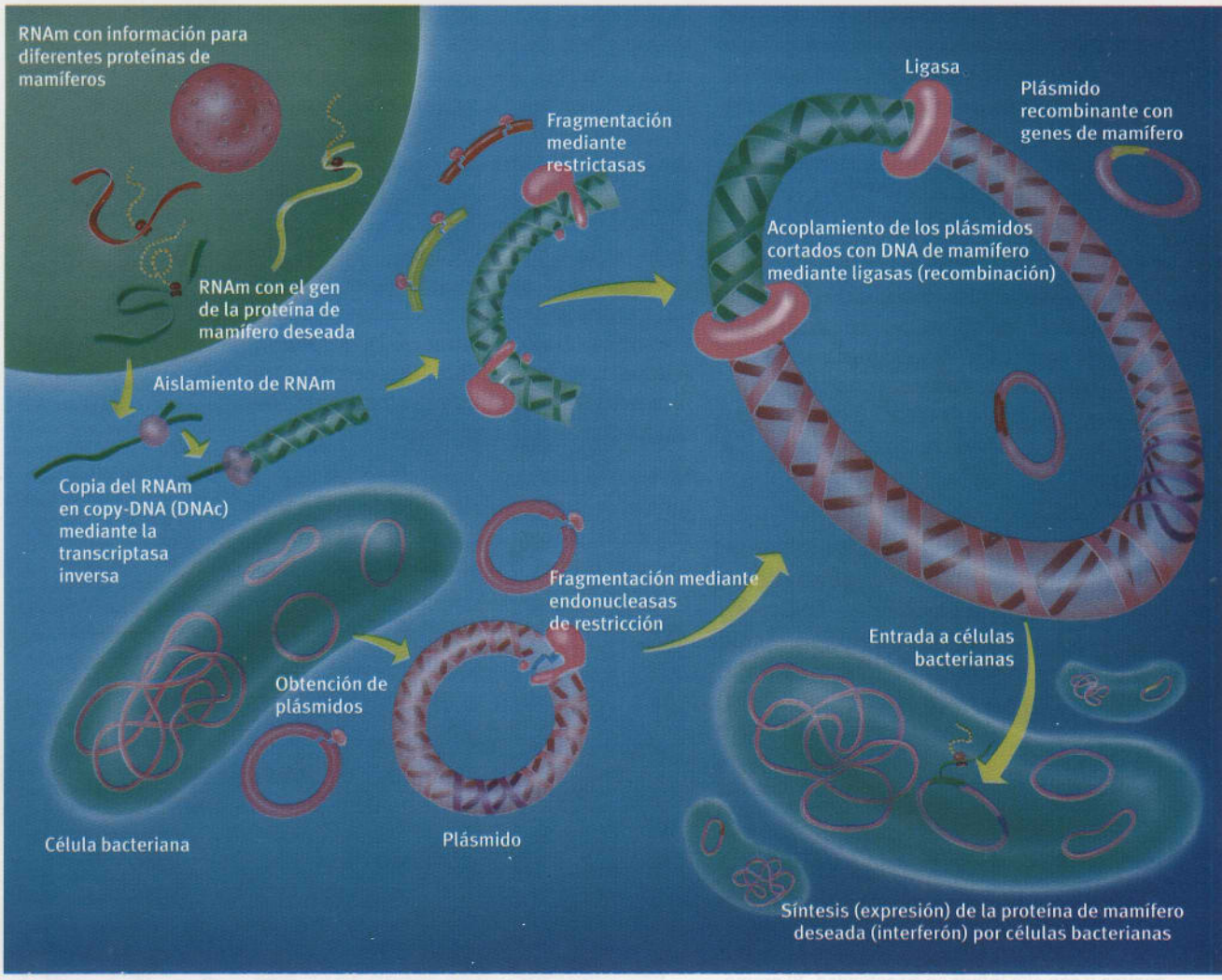


Fig. 3. 23 Manipulación genética de las células bacterianas como ejemplo de la producción de interferón humano mediante bacterias.

De las células humanas se aísla el RNAm entero, que se convierte enzimáticamente mediante la transcriptasa inversa en un tubo de ensayo a DNA de doble hebra, con endonucleasas de restricción se corta específicamente y mediante ligasas se inserta en plásmidos bacterianos (cortados antes con las mismas endonucleasas de restricción).

Los plásmidos recombinantes se transportan en bacterias y se multiplican (clonan). Finalmente, de las mil colonias bacterianas se aísla una, que produce el interferón humano.

bucles y luego se cortan (***splicing*, corte y empalme**), y sólo se conectan juntos los exones (Fig. 3.16).

El RNAm acortado de este modo, con información exclusiva de codificación de proteínas, se denomina **RNAm maduro** (mature mRNA).

3.9 Recombinación: las cartas genéticas se barajan de nuevo

Las **mutaciones** cambian los genes de un ser vivo (detallado en Cap. 4).

Las **recombinaciones** –el segundo instrumento más importante de la genética– barajan de nuevo las cartas genéticas: las recombinaciones organizan los genes o partes de genes que se encuentran en dos o más organismos.

Una **recombinación homóloga** tiene lugar, por ejemplo, si se encuentran en una célula dos cromosomas con la misma o similar secuencia de DNA e intercambian sus partes correspondientes (homólogas), donde el DNA se rompe y se une de nuevo. El intercambio es catalizado por enzimas especiales.

En los eucariotas se encuentran recombinaciones homólogas principalmente durante la **meiosis** (maduración de las células sexuales). Se forma una nueva composición mediante una distribución fortuita de los cromosomas **homólogos** maternos y paternos en las células sexuales originales. A continuación se unen de una sencilla **serie de cromosomas (haploide)** a una serie doble (**diploide**).

La recombinación entre partes de DNA homólogas es un procedimiento sumamente eficaz: si se separan dos individuos en genes o partes de genes, la recombinación origina dos **genotipos**, o sea individuos genéticamente diferentes.

Si dos cepas de bacterias se diferencian, por ejemplo, en una docena de pares de bases, pueden originar 2^{12} o casi 5000 nuevos genotipos. En la mayoría de los casos, sin embargo, hay más de una docena de diferencias y por lo tanto se obtienen posibilidades de combinación astronómicamente elevadas.

A pesar de que, presumiblemente, todos los genes de microorganismos se pueden intercambiar con cepas relacionadas, hasta ahora se ha obtenido, mediante recombinación genética natural con la finalidad de desarrollar a partir de varias cepas, una cepa utilizable industrialmente, aún poco utilizada.

Las **levaduras haploides** tienen un ciclo celular simple. Poseen una única serie de cromosomas durante la mayor parte de su ciclo celular y no una doble como los principales animales y plantas. Una célula normal de levadura puede reproducirse sólo sexualmente si se encuentra con una célula determinada del otro sexo, del tipo apareado contrario. Ambas células se funden y originan una célula diploide, que produce esporas sexuales haploides. Las esporas contienen otra combinación genética que las células haploides paternas. Con una sencilla modificación, las levaduras industriales pueden poseer varias series de cromosomas o "cancelar" el apareamiento (*mating*).

El **cruzamiento (hibridación)** diferente –a menudo también de cepas de distintos tipos– desempeña un papel significativo en el desarrollo de las levaduras industriales. Especialmente esto es válido para las levaduras que posibilitan una rápida producción de pan con los modernos métodos de fabricación, generan más alcohol para la destilación y ayudan a fabricar cervezas especiales, en las cuales se han degradado casi todos los hidratos de carbono solubles (Cap. 1).

¿Dónde se producen las recombinaciones, durante la división madura (meiosis) de la célula?

La recombinación tiene una importancia decisiva para la producción de **anticuerpos** muy diversos y algunas otras moléculas en el sistema inmunitario (Cap. 5). Algunos **virus** utilizan la recombinación para incorporar su herencia genética en el DNA de la célula huésped (Cap. 5). Los **genes** pueden manipularse con la ayuda de recombinaciones artificiales, por ejemplo en los ratones *knockout* (Cap. 8).

3.10 Los plásmidos son vectores ideales para el material genético

En 1955, los microbiólogos japoneses aislaron durante una epidemia de disentería una cepa de las bacterias *Shigella* que era resistente a tres antibióticos –las bacterias habían desarrollado resistencia. En los años posteriores, con la creciente utilización de antibióticos aumentó la **resistencia a los antibióticos**. Las bacterias resistentes pueden resistir el ataque de los antibióticos y, más aún, transferir su capacidad de resistencia a otras bacterias. Producen enzimas que inactivan a los antibióticos de diferentes maneras (véase Cap. 4).

En 1960, el japonés Watanabe encontró la solución del enigma: los **plásmidos**, pequeños elementos de DNA en forma de anillo (con 3000 a más de 100 000 pares de bases), que permanecen libres en las células bacterianas fuera del DNA principal mucho más grande (el "cromosoma principal") (Fig. 3.29). Hay aproximadamente 50 a 100 pequeños plásmidos y uno o dos mayores por célula. Los principales plásmidos pueden proliferar naturalmente en la célula. Si dos células bacterianas entran en contacto pueden intercambiar, mediante un puente (*pilus*), los plásmidos grandes (**conjugación**).

Sin embargo, los plásmidos pequeños no son transferibles. El DNA del plásmido por sí mismo no hace a las bacterias resistentes contra los antibióticos, controla mucho más la producción de enzimas inactivantes de antibióticos (por ejemplo de penicilinasas o la enzima inactivadora de la tetraciclina).

Stanley N. Cohen (nacido en 1935, Fig. 3.25), especialista en plásmidos de la Universidad Californiana de Stanford, descubrió cómo utilizar el DNA del plásmido. Los plásmidos serían un medio ideal de transporte de material hereditario, un **vector**, si se quiere aportar DNA exógeno. Los plásmidos serían como el cuco que se lleva el huevo (DNA exógeno) a otro nido (célula bacteriana). Se debe desarrollar un procedimiento para poder seccionar el anillo de DNA e insertar el DNA exógeno.

Esto no es fácil en absoluto: por un lado, el DNA principal de la bacteria estirado mide aproximadamente un milímetro (véanse págs. 54 y 55), pero en realidad está agrupado en una célula de una milésima de milímetro de diámetro. Los plásmidos son aún cien veces más pequeños. El gen que se debe incorporar mide aproximadamente una diezmilésima de milímetro. Por ello, la hélice de DNA tiene sólo un grosor de dos millonésimas de milímetro. Con tijeras y bisturíes mecánicos no se puede hacer nada. Las "tijeras" se deben poder encontrar en el mismo lugar donde hay que cortar.



Fig. 3.24 Herbert W. Boyer (nacido en 1938), cofundador de la ingeniería genética: *"Wonder is what sets up apart from other lie forms. No other species wonders about the meaning of existence or the complexity of the existence or the universe or themselves".*



Fig. 3.25 Stanley N. Cohen (nacido en 1935), especialista en plásmidos, cofundador de la ingeniería genética.

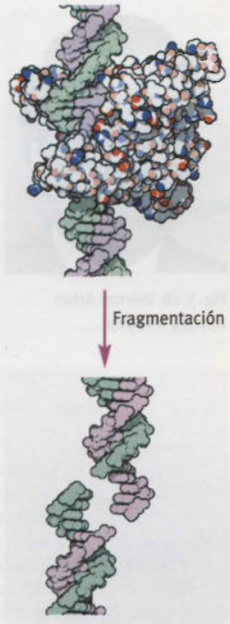


Fig. 3.26 Arriba: cómo una endonucleasa de restricción rompe específicamente DNA y produce "extremos pegajosos" (abajo).

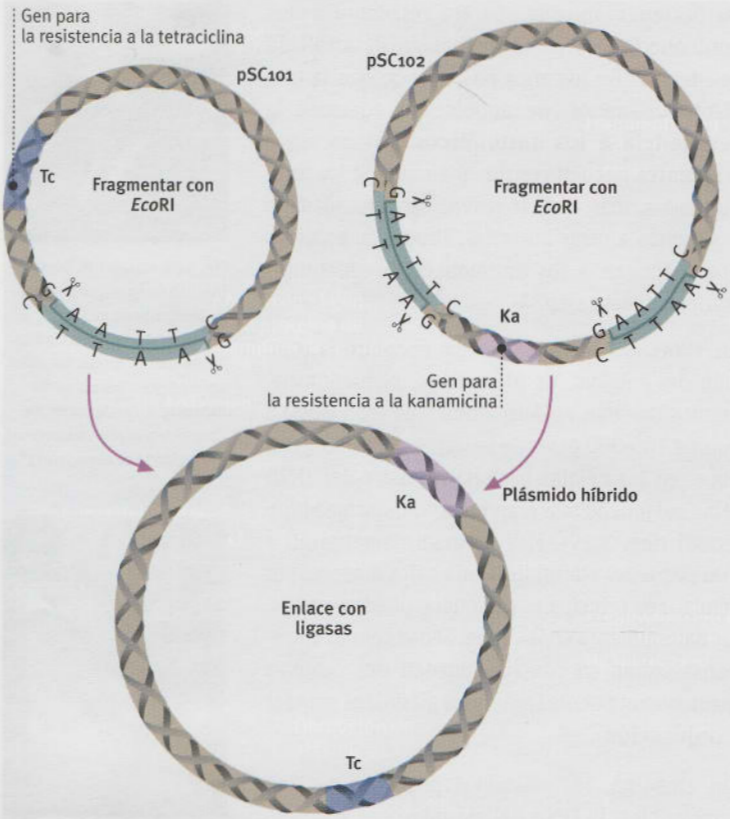


Fig. 3.27 El primer experimento de ingeniería genética de Cohen y Boyer.



Fig. 3.28 Werner Arber (nacido en 1929).

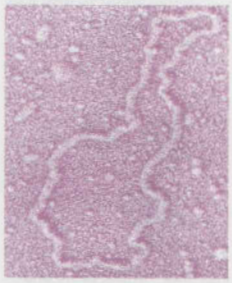


Fig. 3.29 Plásmido pSC101, por Stanley Cohen, denominado también *plasmid necklace* (plásmido collar).

3.11 Tijeras y pegamento moleculares: endonucleasas de restricción y DNA ligasas

En los años 1960, **Werner Arber** (nacido en 1929) (Fig. 3.28) en Ginebra y el americano **Hamilton D. Smith** (nacido en 1931, ambos recibieron el premio Nobel junto con Daniel Nathans, 1928-1999) descubrieron un mecanismo de protección de las bacterias contra la amenaza mortal mediante los virus bacterianos (**bacteriófagos**). Los bacteriófagos inyectan su DNA en las células bacterianas. Las bacterias cortan el DNA del virus exógeno con enzimas, las denominadas **endonucleasas de restricción** (abreviadamente **restrictasas**), y lo hacen así dañino. El DNA propio de la bacteria, en cambio, está protegido por grupos metilo ($-CH_3$) adicionales, que bloquean las restrictasas.

En 1970 se descubrió que las endonucleasas de restricción no cortan arbitrariamente el DNA, sino sólo exactamente en determinados pares de bases. **Herbert W. Boyer** (nacido en 1936, Fig. 3.24) investigó, en la Universidad de California en San Francisco, la endonucleasa de restricción *Eco*RI (denominada así por la cepa de *E. coli* RY13). Ésta cortaba el DNA solamente allí donde se encontraba la combinación de bases GAATTC, entre las bases G y A. En la hebra de DNA "hermana" complementaria enfrentada, con la secuencia de bases CTTAAG, *Eco*RI fragmentó también entre las bases A y G:

3'-XXXXXXXX**G**/**AATTC**XXXXXXXX-5'
5'-XXXXXXXX**CTTAA**/**G**XXXXXXXX-3'

Así no se origina ningún "corte liso", sino que se unen dos pedazos puente con finales superpuestos:

3'-XXXXXXXX**G** **AATTC**XXXXXXXX-5'
5'-XXXXXXXX**CTTAA** **G**XXXXXXXX-3'

Sin embargo, a bajas temperaturas el DNA cortado no se separa en dos partes; sus extremos sobresalientes se pegan con facilidad. Janet Mertz, del laboratorio de Paul Berg (Fig. 3.47) en la Universidad de Stanford, descubrió que las bases A y T, así como C y G, interaccionan electrostáticamente en estos "***sticky ends***" **(extremos pegajosos)**. Sin embargo, se pueden disponer juntos mediante una enzima que requiere ATP, la **DNA ligasa**.

Investigaciones independientes entre sí encontraron las "tijeras" y el "pegamento" para el DNA; los resultados de sus esfuerzos dieron su fruto en común.

Hoy se conocen más de 1200 endonucleasas de restricción, que forman tres clases diferentes. Sin embargo, sólo algunas de ellas son interesantes para la ingeniería genética. Hay también endonucleasas de restricción con cortes lisos y extremos lisos (*blunt ends*), por ejemplo *Pvu*II de *Proteus vulgaris* y *Alu*I de *Arthrobacter luteus*.

Diferentes enzimas-tijeras generan extremos iguales: las endonucleasas de restricción *Bam*HI (secuencia de reconocimiento GGATCC) de *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bgl*I (secuencia de reconocimiento AGATCT) de *Bacillus globigii* originan ambos extremos pegajosos con la misma secuencia GATC. Los fragmentos de genes que se producen por una de estas enzimas se unen, pues, los unos con los otros.

3.12 Los primeros experimentos de ingeniería genética: ¿bacterias que croan?

A principios de 1973, casi un año después de que las herramientas estuviesen disponibles, Stanley N. Cohen y su colaboradora Annie C.Y. Chang, de la Universidad de Stanford, con sus colegas de la vecina Universidad de San Francisco, Herbert W. Boyer (Fig. 3.24) y Robert H. Helling, realizaron el primer experimento de la nueva **ingeniería genética**. Los investigadores escogieron el pequeño **plásmido pSC 101** no transfectable (Fig. 3.29), conocido así

por las iniciales de Stanley Cohen, que está disponible en las células en gran número. Lleva un gen, el gen tc, que hace a *E. coli* resistente al antibiótico **tetraciclina**. Se escogió el plásmido pSC 101 porque contiene un único orden de bases, que se separa por la endonucleasa de restricción *Eco*RI entre G y A en la secuencia GAATTC. Si hubiera tenido más lugares de corte, el plásmido en forma de anillo no se habría cortado, sino que se habría dividido en muchos pedazos.

La capacidad de resistencia a los antibióticos no se podía perder en modo alguno con el corte. Más tarde se quiso averiguar en qué células bacterianas se incorpora con éxito el gen exógeno. *Eco*RI viene –como su nombre indica– de *Escherichia coli*. Mediante *Eco*RI, el DNA del plásmido en forma de anillo se convierte en DNA lineal en forma de hilo con extremos pegajosos. Cohen y Boyer también cortaron con *Eco*RI otro plásmido de *E. coli* (**pSC 102**), que contiene un gen para la resistencia al antibiótico **kanamicina (gen ka)** (Fig. 3.27). Igualmente, este plásmido tenía sólo un lugar de corte y el gen ka no se corta por *Eco*RI.

Los dos plásmidos cortados poseen los mismos restos pegajosos, que se habían cortado en los mismos lugares –G/AATTC–. Por atracción electrostática entre los lugares de corte se unieron los dos fragmentos sueltos separados de DNA. Los científicos obtuvieron el pegamento, la **DNA ligasa** (Fig. 3.33), que mantiene la mezcla y une con ella los dos puntos. Se crean nuevos **plásmidos recombinantes** mayores.

En el último paso, la **transformación**, se trasladó este **DNA recombinante** a bacterias. Para ello se añadió cloruro cálcico ($CaCl_2$) a la disolución de bacterias de *E. coli* manipuladas. Esta sal hace más permeables las paredes celulares al DNA (Fig. 3.30). Con este proceso artificial, que no ocurre así en la naturaleza, los nuevos plásmidos se introdujeron en las bacterias (véase también Fig. 3.23). Luego se hizo la prueba decisiva: la disolución bacteriana se extendió sobre placas de cultivo que contenían tetraciclina y kanamicina.

La mayoría de las bacterias murieron, como era de esperar. Sólo sobrevivieron unas pocas. Debían poseer un plásmido creado artificialmente con la **doble resistencia**: se formaban en las bacterias enzimas desactivadoras de kanamicina y tetraciclina. Las bacterias sobrevivientes proliferaban y crecían en colonias celulares; aproximadamente 100 millones de descendientes formados de manera idéntica, que llevaban los nuevos

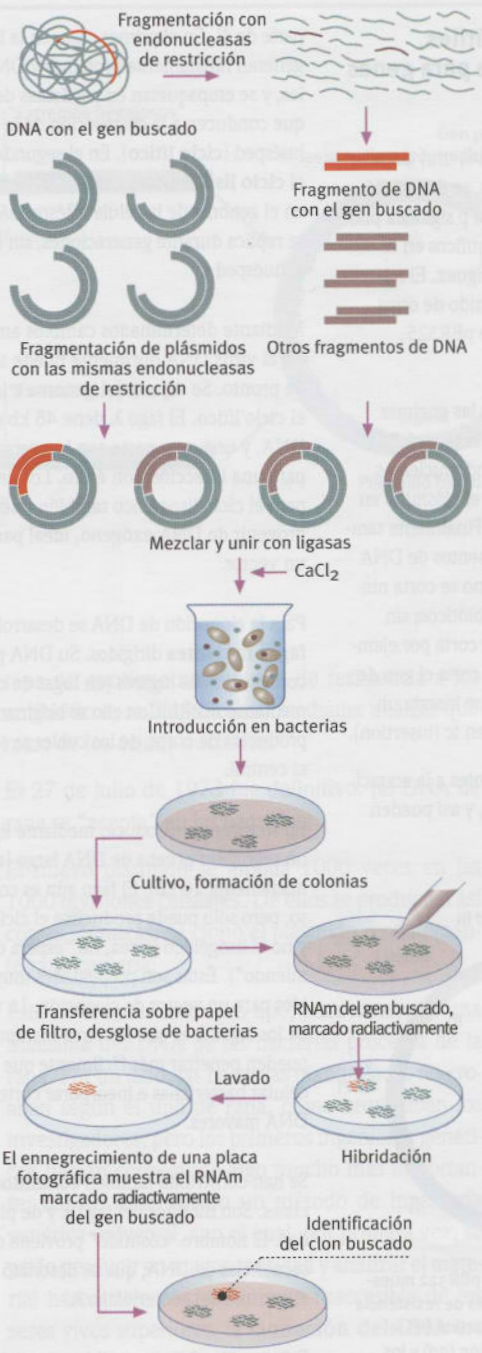


Fig. 3.30 Principio de clonación de un gen de células de mamífero.

DNA recombinantes. Se creó un **clon**, un grupo genético de criaturas vivas.

Tras este éxito Cohen y sus colaboradores se atrevieron con el siguiente experimento. Recombinaron segmentos de DNA de plásmidos de diferentes bacterias: de *E. coli* el plásmido pSC 101 y de *Staphylococcus aureus* un plásmido resistente a la penicilina. Allí, el plásmido de *S. aureus* proporciona cuatro puntos de corte para *Eco*RI, y por consiguiente se descuartiza en cuatro partes. Sólo un pedacito de DNA contiene, por lo tanto, el gen de

¿Qué puede extraerse de los genes?

"Los genes no se deben comparar con los planos de los ingenieros, más bien con recetas de un libro de cocina. Nos dicen qué ingredientes se incorporan, en qué cantidad y en qué orden, pero no nos entregan ningún plan completo y exacto de lo que sale de ahí."

Ian Stewart, Life's Other Secret, Nueva York 1998.

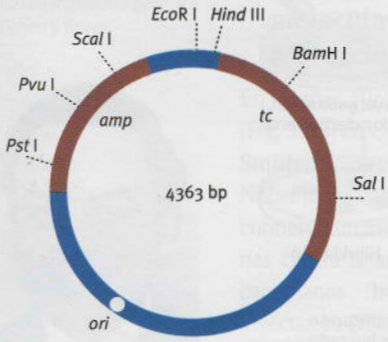
Cuadro 3.2 Vectores útiles, medios de transporte para genes

El plásmido pBR322

El plásmido pBR322 de *E. coli*, muy popular para los técnicos en genética, se desarrolló a finales de los años 1970. La p significa plásmido, BR se refiere a los científicos en él involucrados: Bolívar y Rodríguez. El número 322 diferencia el plásmido de otros del mismo laboratorio, como pBR325, pBR327, etc.

pBR322 contiene genes para las enzimas de resistencia a antibióticos: la tetraciclina y la ampicilina. Diferentes endonucleasas de restricción pueden cortar el plásmido en lugares de corte específicos. Finalmente también se insertan allí los fragmentos de DNA cortados. Si se utiliza *Eco*RI no se corta ningún gen de resistencia a antibióticos; sin embargo, esto sí sucede si se corta por ejemplo con *Bam*HI. Entonces se corta el gen de resistencia a la tetraciclina y se inserta un gen exógeno en medio del gen tc (insertion).

Las células son, pues, resistentes a la ampicilina, pero no a la tetraciclina, y así pueden seleccionarse fácilmente.



Los mapas genético y físico de pBR322 muestran las posiciones de dos genes de resistencia a la ampicilina (*amp*) y la tetraciclina (*tc*), el punto de partida de la replicación (*ori*) y los lugares de corte más importantes de las endonucleasas de restricción.

Las células que no han captado el vector son sensibles a los dos antibióticos. Las células que contienen pBR322 sin inserción son, en cambio, resistentes a ambos antibióticos.

El fago λ

El fago λ (fago lambda) adora la alternancia: puede destruir su huésped o incorporar una parte de él. En el primer caso, en la lisis se generan rápidamente proteínas y DNA virales, y se empaquetan en partículas de virus que conducen a la destrucción de la célula huésped (**ciclo lítico**). En el segundo caso, el **ciclo lisogénico** inserta el DNA del virus en el genoma de la célula huésped. Su DNA se replica durante generaciones, sin dañar al huésped.

Mediante determinados cambios ambientales el virus DNA durmiente puede activarse de pronto. Se separa del genoma e inicia el ciclo lítico. El fago λ tiene 48 kb de DNA, y una gran parte son importantes para una infección con éxito. Los genes para el ciclo lisogénico también pueden provenir de DNA exógeno, ideal para un vector.

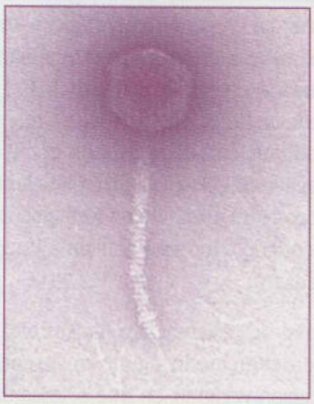
Para la clonación de DNA se desarrollan **fagos mutantes** dirigidos. Su DNA puede cortarse en dos lugares (en lugar de cinco) mediante *Eco*RI. Con ello se originan tres productos de corte, de los cuales se separa el central.

En su lugar se introduce, mediante ligasas, un segmento prueba de DNA largo (aproximadamente 10 kb). El fago aún es contagioso, pero sólo puede producirse el ciclo lítico y no el lisogénico (o sea, no "espera durmiendo"). Éstas son propiedades muy deseables para un vector de clonación. La ventaja de los fagos λ es que los virus manipulados pueden penetrar más fácilmente que las células bacterianas e incorporar cortes de DNA mayores.

Se han construido también **cósmidos** especiales. Son híbridos del fago λ y de plásmidos. El nombre "cósmido" proviene de las secuencias de DNA, que se describió como el gen *cos* del bacteriófago λ.

Estos cortes hacen posible que en el cósmido se puedan incorporar genes mayores (hasta 45 kb). Los cósmidos se empaquetan en fagos, con la ayuda de los cuales incorporan los genes exógenos a las bacterias.

Los cósmidos originan el gen para la resistencia a la ampicilina; las bacterias se pueden desplazar para sobrevivir en un cultivo a pesar de añadir ampicilina y para multiplicar un DNA exógeno.



El fago λ.

El fago M13

El M13 es un fago filamentoso. Parece completamente diferente al fago λ. Se trata de un virus en forma de hilo (900 nm de longitud, con sólo 9 nm de diámetro), con un DNA en forma de anillo de una única hebra (también denominada hebra +) y una cubierta proteica de 2710 subunidades proteicas idénticas (véase Cap. 5).

El virus penetra en *E. coli*, curiosamente, a través de su "órgano sexual", el *pilus* del sexo, que posibilita el intercambio de DNA entre bacterias. M13 es tan atractivo porque con él se puede obtener el DNA clonado en forma de una simple hebra. Las hebras simples de los genes clonados se necesitan especialmente para la secuenciación del DNA y la mutagénesis *in vitro* (Cap. 10).



El fago M13 es un virus filamentoso, es decir, alargado.

El M13 es un actor en la **técnica de visualización de fagos** (Cap. 5). El DNA M13 no se integra (como en el fago λ) en el genoma bacteriano. No provoca tampoco la lisis de las células. La bacteria crece y se divide, sin embargo, más lentamente que las células no infectadas. Las células hijas liberan todavía fagos M13.

Por generación se originan aproximadamente mil nuevos fagos M13. Puesto que el huésped no muere, se pueden cultivar y cosechar fácilmente en grandes cantidades.

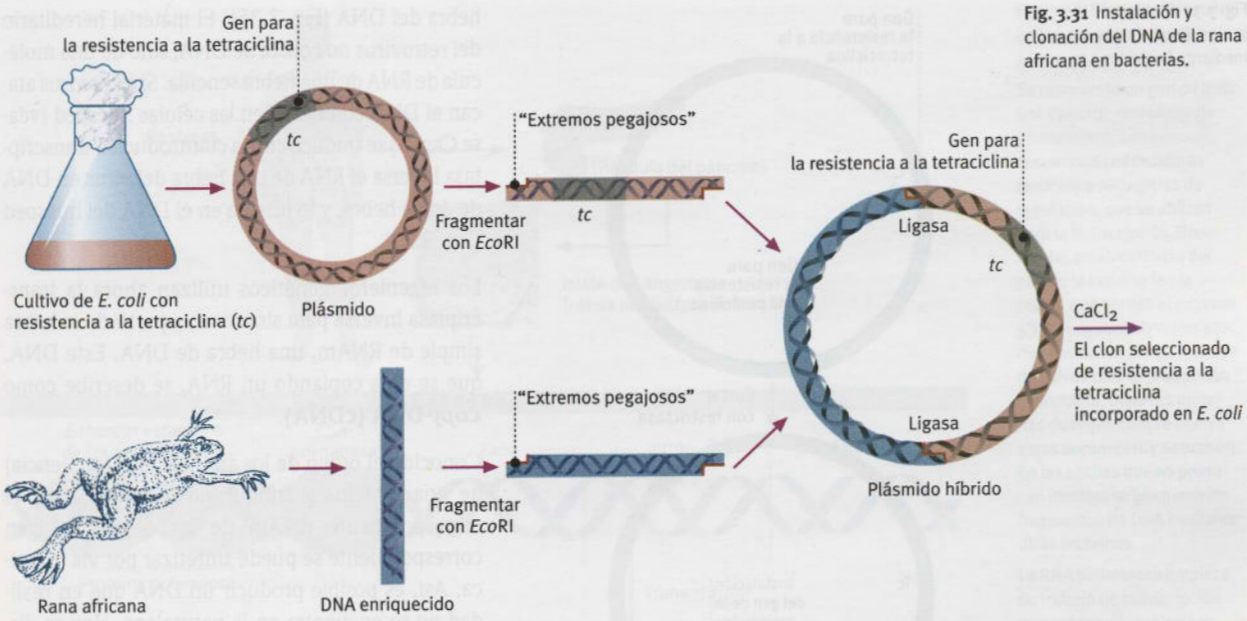


Fig. 3.31 Instalación y clonación del DNA de la rana africana en bacterias.

resistencia a la penicilina. Las diferentes posibilidades de combinación eran, por consiguiente, mayores que en los primeros experimentos. La hora de la verdad vino entonces con el cultivo de las bacterias manipuladas en medios que contuvieran tetraciclina y penicilina.

El laboratorio de Cohen fue un grito de júbilo: uno de estos plásmidos recombinados se fusiona en las células de *E. coli*. Con ello se sembró por primera vez el material hereditario de manera diferente. La "superación de las barreras, que normalmente separaban unas formas biológicas de otras", como Cohen había anunciado prematuramente, no se pudo lograr porque –como hoy sabemos– también pueden intercambiar material hereditario "de forma natural" de diferentes microorganismos y virus. ¡Todas las **infecciones virales** son transferencia de genes!

Animados por estos éxitos, se debían superar entonces barreras más altas: los límites de tipo entre bacterias y ranas, en concreto la **rana africana con garras** (*Xenopus laevis*) (Fig. 3.32).

El DNA genómico se aísla de las células de rana africana y se corta con enzimas de restricción del tipo *Eco*RI. Al mismo tiempo, el plásmido bacteriano pSC 101 también se corta con *Eco*RI (Fig. 3.31).

El DNA de rana y el DNA de bacteria se unen con ligasas, se incorporan en las células de *E. coli* y proliferan. Las células, que contienen un nuevo plásmido recombinante rana-bacteria, básicamente con resistencia a la tetraciclina, puesto que el DNA de rana no contiene ningún gen de resistencia a los antibióticos, se identificaban mediante análisis químico de los ácidos nucleicos.

El 27 de julio de 1973 fue definitivo: ¡el DNA de rana se "acepta" en las bacterias!

El nuevo plásmido se amplía 1000 veces en las 1000 divisiones celulares. De ellos se producían así copias idénticas: se clonó el plásmido recombinante rana-bacteria.

Éste no era aún un nuevo tipo, pues menos de una milésima del DNA de las bacterias procedía de la rana. Por un lado, las bacterias manipuladas no croaban según el tipo de rana, como bromeaban los investigadores, pero los primeros ingenieros genéticos habían conseguido algo mucho más importante: habían desarrollado un método de ingeniería genética universal, con el cual, por primera vez, se pudo producir en mayor cantidad y analizar el material hereditario completamente inaccesible de los seres vivos superiores: la **clonación del DNA** era técnicamente posible (Fig. 3.30).

3.13 Cómo se obtienen los genes

Desafortunadamente, el experimento con el DNA "desmenuzado" de rana no es tan fácil de aplicar a la producción de proteínas de seres vivos superiores. El motivo de ello son los intrones, incorporados en la cadena de DNA con su información "nonsense" (sin sentido) que no codifica proteínas. No sería apropiado fragmentar el DNA de seres vivos eucariotas superiores mediante endonucleasas de restricción e instalar el DNA en el plásmido. Por un



Fig. 3.32 Rana africana con garras (*Xenopus laevis*), un nuevo animal de laboratorio como lo fueron antes el ratón y la rata, modesto y de larga vida. Su nombre científico ("pie raro") viene de sus garras negras. En California, estos anfibios extremadamente devoradores, unos diez centímetros más grandes que los nativos, supusieron una plaga.

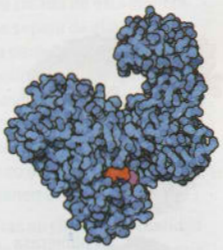


Fig. 3.33 DNA ligasa, el "pegamento" para el DNA cortado, es una enzima dependiente de ATP (véase Cap. 2). La ligasa es una herramienta elemental para la ingeniería genética. El cofactor ATP (rojo) y un resto de lisina (magenta) son esenciales.

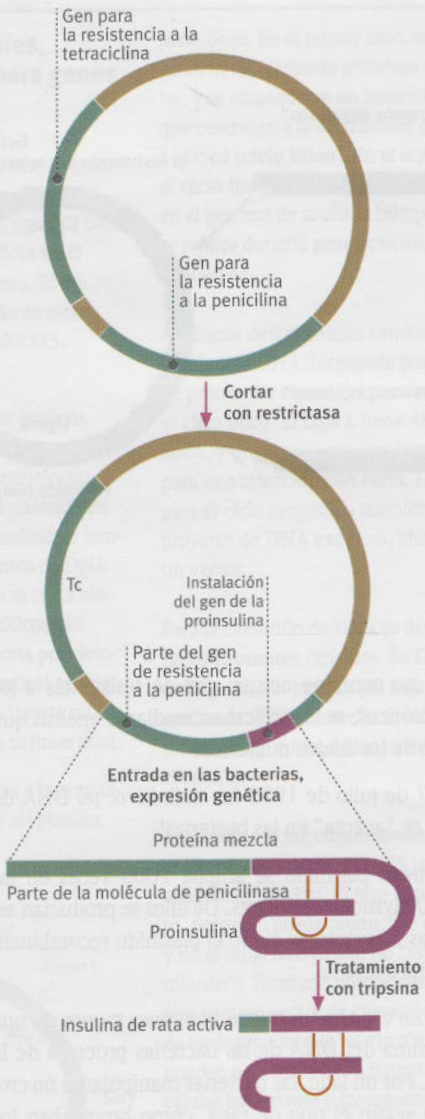


Fig. 3.34 Síntesis de la proinsulina de ratas mediante bacterias.

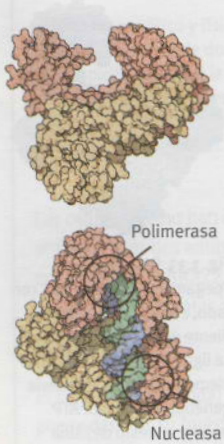


Fig. 3.35 Abajo: transcriptasa inversa. Su estructura en forma de garra.
Más abajo: en una molécula de transcriptasa inversa se unen dos actividades. Con la actividad polimerasa se origina una molécula híbrida RNA-DNA, con la nucleasa se degrada el RNA en el extremo sobrante. La hebra sencilla de DNA se completa luego y forma la doble hebra.

lado se podrían clonar miles de fragmentos de DNA exógeno, pero apenas se podría producir una proteína exógena funcional. En el mejor de los casos, el producto final sería una proteína con todos los aminoácidos de los exones, pero entre medio los completamente irrelevantes "aminoácidos extra" de los intrones.

La salida para el ingeniero genético no era utilizar el DNA cargado del intrón de los seres vivos superiores, sino originar el RNAm maduro (*mature*) que se libera de las instrucciones de construcción codificadas de las proteínas de intrones. Ahora el RNAm de hebra sencilla no se coloca junto al DNA de doble hebra del plásmido. Por suerte, se encontró (como ya se mencionó en la Sección 3.3) una enzima de retrovirus, la **transcriptasa inversa**, que puede transcribir la hebra sencilla del RNA como doble hebra del DNA (Fig. 3.35). El material hereditario del retrovirus no consta de DNA, sino de una molécula de RNA de una hebra sencilla. Si estos virus atacan el DNA contenido en las células huésped (véase Cap. 5) se traduce con la cointroducida transcriptasa inversa el RNA de una hebra del virus en DNA de doble hebra, y lo integra en el DNA del huésped (Fig. 3.23).

Los ingenieros genéticos utilizan ahora la transcriptasa inversa para sintetizar, a partir de la hebra simple de RNAm, una hebra de DNA. Este DNA, que se crea copiando un RNA, se describe como ***copy*-DNA (cDNA)**.

Conocido el orden de los aminoácidos (secuencia) de una proteína y aunque no se pueda aislar el correspondiente RNAm de las células, el gen correspondiente se puede sintetizar por vía química. Así, es posible producir un DNA que en realidad no se encuentra en la naturaleza. Hoy se dispone de **sintetizadores automáticos de DNA** (Cuadro 3.5). En ellos se une un nucleótido de partida en un fuerte material portador (como silicagel o perlas de vidrio), y a continuación se insertan nucleótidos en la secuencia deseada. En 1988 se podían sintetizar diariamente fragmentos de DNA de 30 bases de longitud; para ello, en 1979 se requería un trabajo en equipo de medio año. Hoy se pueden sintetizar por completo y en pocas horas "genes a medida".

3.14 ¿Insulina humana a partir de bacterias?

En julio de 1980, 17 voluntarios recibieron inyecciones de insulina en el Guy's Hospital de Londres y apareció en los titulares de los periódicos. ¿Qué había tan sensacional en ello? Cada día millones de diabéticos se trataban en todo el mundo con la hormona insulina (véase Cuadro 3.3). La insulina se obtenía del páncreas de toros y cerdos. La insulina sustituida debe regular el azúcar en sangre del diabético y luchar contra las consecuencias serias de la **diabetes** –una enfermedad que en los países industriales ocupa el tercer lugar entre las causas de muerte (véase Cuadro 3.4).

La diabetes de tipo I se produce por la destrucción autoinmunitaria de las células que forman insulina en el páncreas y empieza antes de los 20 años de vida. La diabetes de tipo II aparece a partir de la mitad de la vida (90% de los diabéticos), sobre todo en personas obesas (Cap. 10). Los 17 voluntarios antes mencionados fueron los primeros en la historia de la medicina que se trataron con una

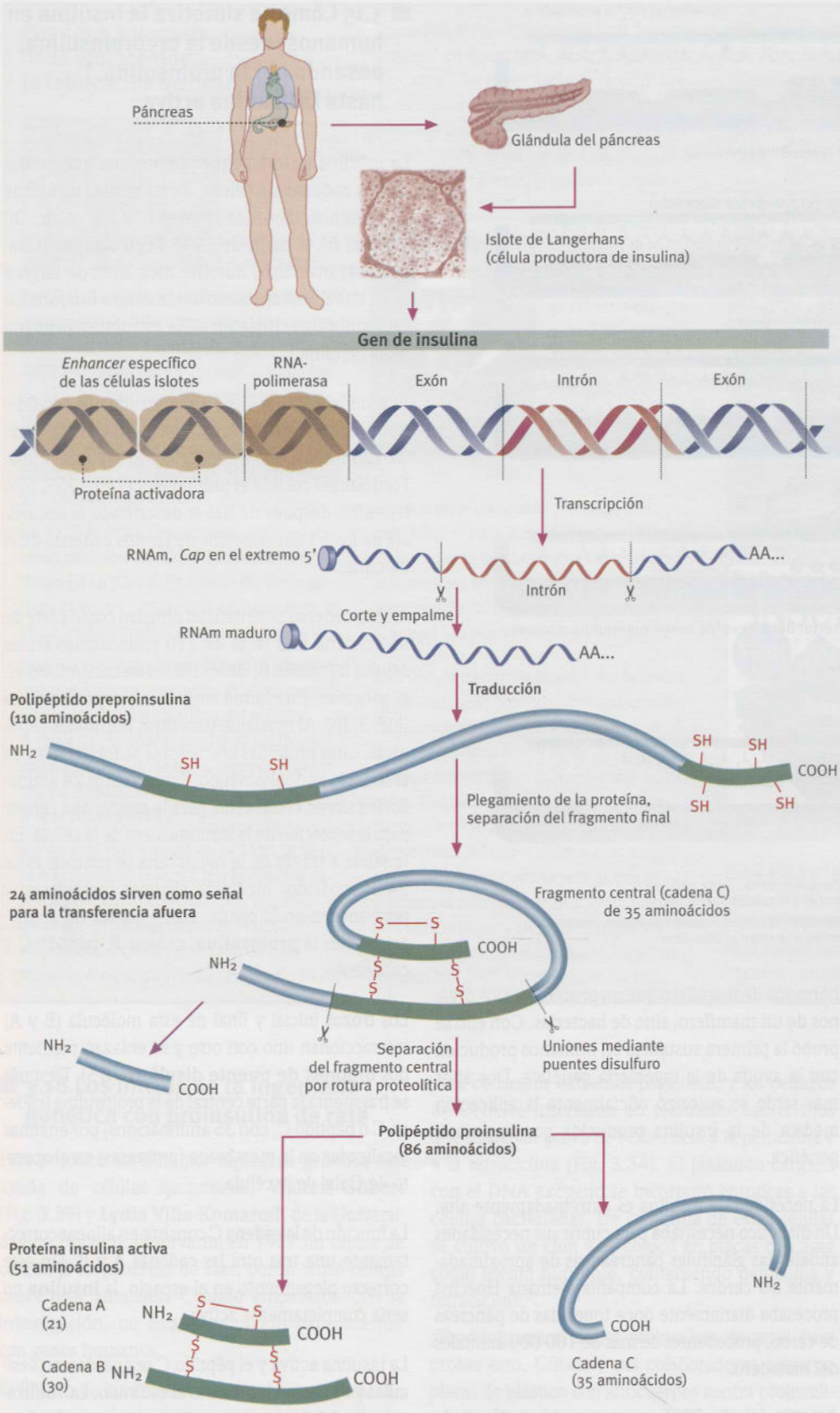


Fig. 3.36 Síntesis de insulina en las células islotes del páncreas.

Se representa un gen de insulina típico de una célula de un mamífero, con intrones, secuencias codificadoras (exones) y secuencias de regulación, que se utilizan para la transcripción. Brevemente, antes del inicio del gen de la insulina (en la región que bordea el extremo 5'), se encuentran varios elementos de secuencia que son decisivos para la producción de insulina. Diversas proteínas de regulación se unen a estas secuencias y se activan. En las células que no producen insulina se bloquean los fragmentos de DNA mediante otras proteínas.

La RNA polimerasa empieza su trabajo de transcripción tras estas secuencias. Los finales del RNAm transcrito en eucariotas se modifican con un 5'-cap ("caperuza") y una cola 3'-poli(A). La caperuza debe proteger de la degradación por enzimas (fosfatasas y nucleasas) y refuerza la traducción. La cola poli(A) no se codifica en el DNA y estabiliza abiertamente el RNAm.

También la velocidad de la síntesis de insulina puede regularse incluso tras la traducción en el ribosoma; la preproinsulina (128 aminoácidos) es más larga que la hormona activa. Enzimas especiales fragmentan en el extremo amino una corta parte (24 aminoácidos), que sirve como secuencia señal para atravesar la membrana del retículo endoplasmático. A continuación, la proinsulina creada de esta manera se separa de ella liberando la parte central de la cadena polipeptídica (péptido C). Las dos cadenas cortas A y B forman la insulina terminada. Mediante puentes disulfuro entre cisteínas se mantienen unidas.

Tras su síntesis, la cantidad de proteína activa se regula frecuentemente en el cuerpo por retroacoplamiento.

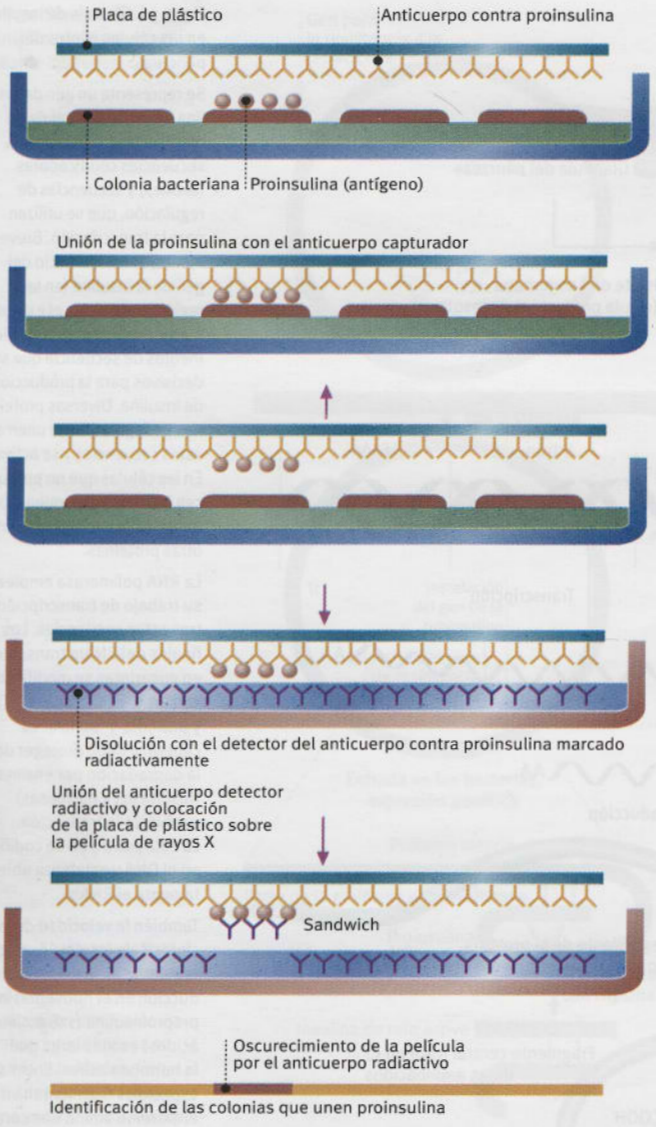


Fig. 3.37 Cómo se encontraron las colonias bacterianas que forman proinsulina con la ayuda de anticuerpos en el radioinmunoensayo.



Fig. 3.38 Rosalyn Yalow (nacida en 1921) descubrió el radioinmunoensayo (RIA). Recibió el Premio Nobel en 1977.

hormona de mamífero que no procedía de los órganos de un mamífero, sino de bacterias. Con ello se probó la primera sustancia en humanos producida con la ayuda de la ingeniería genética. Dos años más tarde se autorizó oficialmente la aplicación médica de la insulina producida por ingeniería genética.

La necesidad de insulina es extremadamente alta. Un diabético necesitaba para cubrir sus necesidades anuales las glándulas pancreáticas de aproximadamente 50 cerdos. La compañía alemana Hoechst procesaba diariamente once toneladas de páncreas de cerdo, procedentes de más de 100 000 animales del matadero.

A partir del año 2005 no se exportó en Alemania más insulina animal.

3.15 Cómo se sintetiza la insulina en humanos: desde la preproinsulina, pasando por la proinsulina, hasta la insulina activa

La insulina es una pequeña hormona que consta de dos cadenas proteicas, de las cuales una tiene 21 aminoácidos (cadena A) y la otra 30 (cadena B). A partir de 1945 **Fred Sanger** (Cuadro 3.4) investigó, durante diez años de largo y duro trabajo en el sótano del Instituto Bioquímico en Cambridge (Inglaterra), la estructura primaria de la insulina.

El propósito del análisis de la insulina se consideró intrépido en su tiempo. La insulina cristalizada de 120 toros sirvió a Sanger como materia prima. Fred Sanger recibió el premio Nobel en 1957, sólo tres años después de haber descrifrado la secuencia de los 51 aminoácidos de las dos cadenas de la insulina.

Ambas cadenas se sintetizan primero como parte de una cadena más larga de 110 aminoácidos en las células B (células β) de los islotes de Langerhans en el páncreas. Esta forma larga es la **preproinsulina** (Fig. 3.36). Al igual que para otras hormonas peptídicas, estas proteínas precursoras se fragmentan en el retículo endoplasmático. Sus primeros 24 aminoácidos sirven como señal para la membrana celular para la secreción de la insulina fuera de la célula. En la salida a través de la membrana se rompen estos 24 aminoácidos mediante enzimas (peptidasas) y permanecen en la célula. Los restantes 86 aminoácidos son la **proinsulina**: cadena B, péptido C y cadena A.

Los trozos inicial y final de esta molécula (B y A) interaccionan uno con otro y se enlazan mediante dos **uniones de puente disulfuro** (S-S). Después se fragmenta la parte central de la proinsulina (cadena C o péptido C, con 35 aminoácidos) por enzimas localizadas en la membrana (proteasas) en el aparato de Golgi de la célula.

La función de la cadena C consiste en alinear correctamente una tras otra las cadenas A y B. Sin este correcto plegamiento en el espacio, la **insulina** no sería completamente activa.

La insulina activa y el péptido C se guardan en vesículas y se liberan juntos tras el estímulo. La "utilización diaria" de insulina por los humanos es de aproximadamente 1,8 mg.

Cuadro 3.3 Historia de la biotecnología: la fabricación de insulina



Frederick Banting y Charles Best.

En 1921, los canadienses **Frederick G. Banting** (1891-1941, muerto en un accidente de aviación) y **Charles H. Best** (1899-1978) consiguieron en Toronto el aislamiento de la insulina de páncreas animal. Su trabajo se consideró tan trascendente que Banting consiguió, sólo dos años más tarde, juntamente con J.J.R. Macleod, el premio Nobel de fisiología o medicina.

En 1922 se probó clínicamente la hormona en un paciente, con éxito. La compañía americana Eli Lilly & Co. (Indianápolis) fue la primera en recibir una licencia exclusiva para un año y produjo "Iletin" en grandes cantidades.

Éste fue el disparo de salida para el consorcio que aún hoy existe entre las mayores compañías productoras de insulina del mundo. A partir de ese año, el comité de la Universidad de Toronto se dedicó a intereses diferentes. En Alemania fueron los del médico **Oscar Minkowski**.

Minkowski lo cuestionó en 1923 en la fábrica de colorantes Hoechst. En la Hoechst ya se había recogido anteriormente material glandular de los mataderos de Frankfurt y Karlsruhe, y habían intentado obtener insulina. A principios de noviembre de 1923 se produjo el desarrollo propio de la "antigua insulina" en el mercado, con la autorización de Canadá. De ahí en adelante Hoechst fue la conductora de la investigación en insulina y todavía controla, bajo el nuevo nombre de Sanofi-Aventis, junto con Eli Lilly, Novo Nordisk y Berlin Chemie, el mercado alemán.



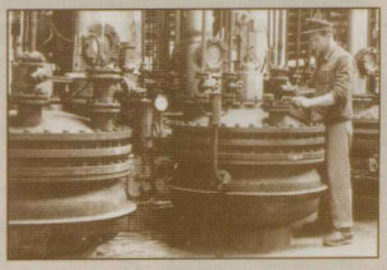
Oscar Minkowski (1858-1931) descubrió en 1889, en la Clínica de Medicina en Estrasburgo, que los perros desarrollan diabetes si se les extirpa el páncreas. Él convenció a Hoechst en 1923 para producir insulina.

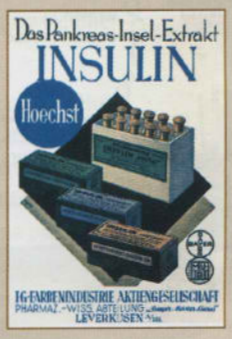
Muchas otras compañías probaron suerte, pero fallaron en la materia prima: la recogida de material de muchos pequeños mataderos alemanes era ardua. ¡Se pensó en el enorme matadero descrito por Upton Sinclair en Chicago! Los páncreas se debían importar.

En 1936, la compañía Hoechst fue la primera que consiguió producir hormona cristalizada concentrada. Las disoluciones producidas se purificaron mejor de las proteínas exógenas acompañantes y así fueron más funcionales. También se trabajó en las insulinas *depot*. En 1938 llegó al mercado la "insulina *depot* Hoechst" con estabilizadores superficiales. Sin embargo, durante la guerra se mantuvo el suministro mediante un nuevo procedimiento para asegurar la conservación de las glándulas. Sin embargo, en los primeros años tras 1945 la producción fue baja.

Hoechst continuó como el principal proveedor y lanzó al mercado en 1953 la "Long-insulin", que actuaba más tiempo. Entonces, **Frederick Sanger** consiguió, tras 10 años de trabajo, determinar la estructura de la insulina (véase Cuadro 3.4).







Arriba: producción de insulina en Hoechst. Izquierda: propaganda de la insulina de Hoechst.

Entre 1963 y 1965 se logró, en diversos grupos de trabajo, la síntesis total de la insulina, y en 1969 Dorothy Crowfoot-Hodgkin utilizó el análisis estructural por rayos X para clarificar su estructura espacial.

3.16 Los inicios de la ingeniería genética con proinsulina de rata

Para producir insulina por ingeniería genética con ayuda de células bacterianas, **Walter Gilbert** (Fig. 3.39) y **Lydia Villa-Komaroff**, de la Universidad de Harvard, observaron en 1977 un tumor de células β en páncreas de rata, por lo tanto células cancerosas animales. Cuando empezaron con la investigación, no estaba permitido experimentar con genes humanos.

El RNAm de las células cancerosas fue transscrito por los investigadores con transcriptasa inversa a cDNA, se cortó con endonucleasas de restricción para conseguir extremos pegajosos, y los pedazos de DNA se insertaron en plásmidos bacterianos que portaban genes de resistencia a la penicilina y a la tetraciclina (Fig. 3.34). El plásmido cargado con el DNA exógeno se incorporó entonces a las células bacterianas. De cada una de estas células se cultivó un clon y se colocó en placas con agar como medio nutriente, conteniendo penicilina y tetraciclina.

¿Producen estos clones proinsulina de rata? Para probar esto, Gilbert y sus colaboradores cargaron placas de plástico con anticuerpos contra proinsulina. Se generan en ratones anticuerpos contra la proinsulina inyectándoles la proteína. Los plásticos,



Fig. 3.39 Walter Gilbert (nacido en 1932), premio Nobel de Química en 1980.

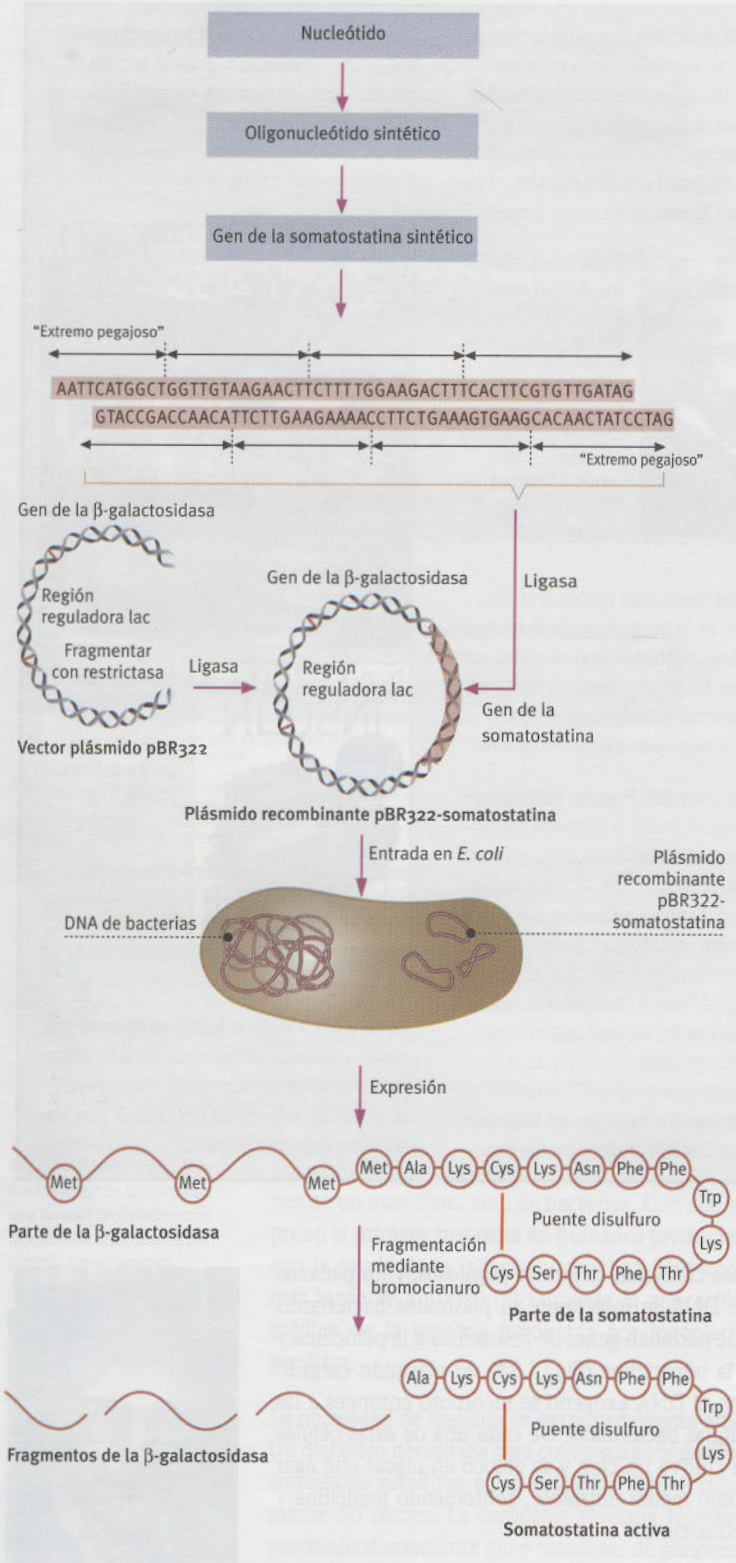


Fig. 3.40 La primera síntesis de un péptido humano, la hormona somatostatina, mediante bacterias manipuladas genéticamente.

como el poliestirol (PS), unen ligeramente anticuerpos por absorción. Los investigadores colocaron las placas de PS cubiertas en contacto con las colonias bacterianas. Mediante la adición de lisozima (véase Cap. 2) se lisaron las células y pudo analizarse su contenido.

Cualquier proteína en las células que contenga la secuencia aminoácida de la proinsulina une anticuerpos de las placas de plástico (Fig. 3.37). Estos anticuerpos se denominan también **anticuerpos capturadores** (*capture*).

¿Cómo se sabe si se ha unido la proinsulina y dónde? Se utiliza una disolución marcada radiactivamente de **anticuerpos detectores** (que también reconocen y unen proinsulina) y se incuban en placas de PS. En caso positivo se forma una **estructura en sandwich**: las placas unen el anticuerpo capturador, éste une la proinsulina, y ésta une, en otro lugar de la molécula, el anticuerpo detector marcado radiactivamente.

Si no existe proinsulina no se une anticuerpo detector. Estos anticuerpos detectores no unidos se lavan en una fase de lavado y no hay ningún sandwich ni radiactividad unida. El método se denomina **radioinmunoensayo** (RIA, véase también Cap. 10).

Rosalyn Yalow (nacida en 1921) (Fig. 3.38) desarrolló en 1959, en Nueva York, los primeros RIA para el análisis de insulina en sangre (premio Nobel en 1977 con Roger Guillemin y Andrew V. Schally). Puesto que los anticuerpos se marcan radiactivamente, se reconocen los lugares radiactivos relevantes en las placas de plástico si finalmente se coloca la placa sobre una película de rayos X sensible a la radiación (**autorradiografía**).

Un clon dio una reacción positiva: ennegreció la película. También la dio cuando las placas de plástico se cargaban no con anticuerpos contra proinsulina sino con anticuerpos contra penicilinasa. Es decir, el producto de síntesis, que se analizó con ayuda del anticuerpo, era aparentemente una **proteína mezcla de proinsulina y penicilinasa**. El gen para la proinsulina se había incorporado, pues, en medio del gen de la penicilinasa (Fig. 3.37).

Se aisló este clon. Como sus células crecían en un medio de cultivo líquido, se pudo aislar la proteína mezcla de la disolución de cultivo sin destruir las células. La fracción de penicilinasa había posibilitado que la proteína mezcla completa atravesara la membrana celular bacteriana para colocarse en el medio. La **secreción** de las proteínas en el medio fue un gran

avance en comparación con la proinsulina de rata, que se sintetizaba en las células y permanecía en ellas.

La penicilinasa estaba conectada a su **secuencia señal**, que posibilitaba la salida del "hilo proteico" de la célula. En otro caso, la proinsulina se habría quedado en la célula. El análisis de la secuencia nucleotídica del DNA exógeno, que estaba contenido en el plásmido bacteriano, mostró que en realidad solamente existía la secuencia exógena para la proinsulina.

Para conseguir insulina pura a partir de una proteína mezcla de proinsulina y penicilinasa, Gilbert retiró, con la ayuda de la enzima digestiva **tripsina** (Cap. 2 y Fig. 3.45), la parte más grande de la sección de penicilinasa y al mismo tiempo el segmento C central de la proinsulina. Con ello obtuvo **insulina activa**. Los científicos de Boston analizaron el producto y determinaron que influenciaba el metabolismo de los azúcares en los adipocitos como la insulina normal de rata: las bacterias habían producido una "auténtica" insulina de rata.

3.17 Hibridación de DNA: cómo se encuentran bacterias con sondas de DNA

En el caso de la proinsulina de rata se halló el clon recombinante por análisis del producto genético con anticuerpos mediante un radioinmunoensayo sandwich. Frecuentemente se detectan bacterias (también las no manipuladas, "naturales") con sondas de DNA.

Para ello se utiliza la **hibridación** del DNA: la construcción de una doble hebra de DNA a partir de hebras simples complementarias de diferentes orígenes, que forman una molécula híbrida.

En una determinada secuencia de DNA bacteriano se busca un oligonucleótido complementario de una hebra simple, una **sonda de DNA (*muestra* de DNA)**.

Las células crecen en colonias sobre un medio de cultivo (Fig. 3.44). Estas colonias se marcan (principalmente con números en el sentido de las agujas del reloj sobre la tapa de la placa de Petri) y entonces se toma una huella con un **filtro de nitrocelulosa**. Con ello se fija una copia imagen especular de las colonias. Las membranas celulares se destruyen con un **detergente** (un medio de lavado, como Tween), que libera el contenido de la célula. El DNA bacteriano se une fuertemente a la nitrocelulosa. Ahora se añade **sosa cáustica** (NaOH) que destruye los puentes de hidrógeno que mantenían unida la doble hélice bacteriana. Así, el DNA se desnaturaliza y se separa en dos hebras simples, que además permanecen unidas a la nitrocelulosa.

Luego se añade la sonda de DNA. Es un oligonucleótido de una hebra simple con al menos 20 nucleótidos. La sonda de DNA se puede producir con el sintetizador automático de DNA (véase Cuadro 3.5) si se conoce la estructura (secuencia) del gen buscado. La sonda se marca bien radiactivamente o (progresivamente) con moléculas fluorescentes. Tras la hibridación se lava la sonda marcada no unida. Sólo las secuencias de DNA buscadas han formado híbridos con la sonda de DNA. Se coloca entonces una película de rayos X sobre el filtro de nitrocelulosa y se observa su ennegrecimiento (autorradiografía). Las sondas hibridadas ennegrecen la película. En la incorporación de las moléculas de fluorescencia se aplica luz de determinadas longitudes de onda y entonces se iluminan. Si se ha encontrado un lugar donde se ha producido una hibridación, se vuelve de nuevo a la placa de agar y allí se localiza fácilmente la colonia buscada.

Con este procedimiento se encuentran las células manipuladas genéticamente, como también en el diagnóstico médico se detectan las bacterias naturales, por ejemplo la causante del cólera (Cap. 6). Para ello, sin embargo, se debe conocer una parte de la secuencia de DNA que es típica del correspondiente causante.

3.18 Un pequeño desvío: la somatostatina – La primera proteína humana de bacterias

A continuación se generó en las células bacterianas la **somatostatina** como la primera proteína humana (Fig. 3.40). Para ello se desarrollaron técnicas decisivas para la posterior producción de insulina.

La somatostatina consta solamente de 14 aminoácidos y es una de las muchas hormonas que se producen en el hipotálamo, una región del cerebro medio. Desde allí llega hasta la glándula pituitaria con el flujo sanguíneo, donde se ocupa de parar la liberación de insulina y del "apagado" de la hormona del crecimiento humana.

La somatostatina podría, por lo tanto, tener valor terapéutico. Por este motivo, en 1977 Herbert Boyer y sus colaboradores escogieron esta sustancia para sus investigaciones en el City of Hope National Medical Center y la Universidad de California, en San Francisco. Hasta entonces no se había conseguido aislar el gen de la somatostatina de células humanas, pues su secuencia de bases se obtuvo del cono-



Fig. 3.41 En 1975, con 27 años, Robert Swanson (1947-1999) conoció a Herbert Boyer. Juntos establecieron la ingeniería genética: *"All the academics I called said commercial application of gene splicing was ten years away. Herb didn't."*





Fig. 3.42 Arriba: la primera compañía de ingeniería genética no fue, como a menudo se afirma, Genentech, sino la Cetus Corporation, que fundaron en 1972, en Berkeley, el médico Peter Farley, el bioquímico Ronald Cape y el ganador del premio Nobel Donald Glaser. Fueron consultores el profesor del MIT Arnold Demain (arriba a la izquierda y abajo en una imagen actual), Joshua Lederberg y Stanley Cohen de la Universidad de Stanford.



Fig. 3.43 Somatostatina humana.

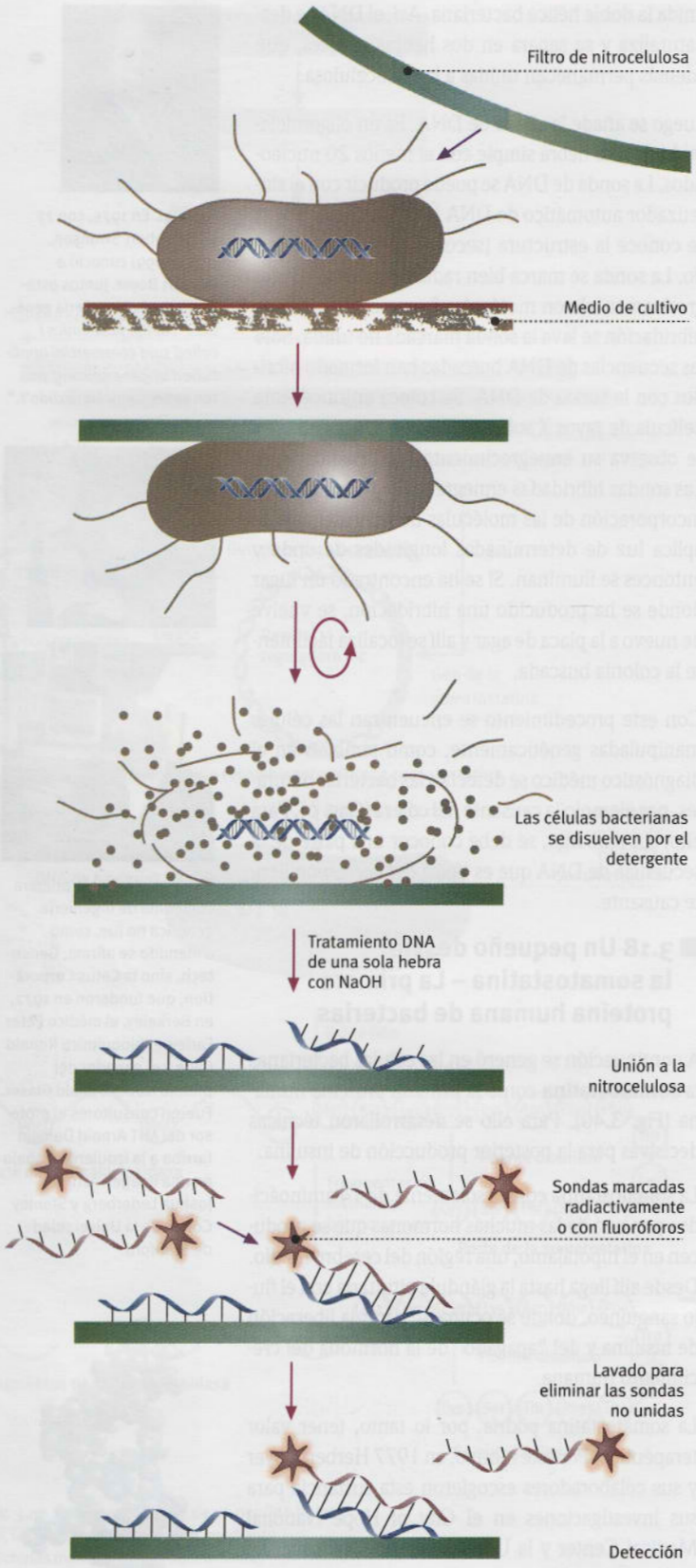


Fig. 3.44 Detección de bacterias con la ayuda de sondas de DNA y la hibridación del DNA.

cimiento del código genético a partir de la secuencia conocida de los 14 aminoácidos en el péptido.

Así se construyó en bloques, de tres bases cada uno, un **gen artificial** (Fig. 3.40). Consta de 52 pares de bases, de las cuales $14 \times 3 = 42$ contenían el plan de construcción codificado para la somatostatina. Los diez pares de bases restantes debían garantizar la expresión del gen (comprensión de las instrucciones de construcción) mediante el ribosoma, facilitar el aislamiento de la hormona y finalmente liberar "extremos pegajosos", que serían importantes para incorporar fragmentos de DNA de doble hebra en un plásmido (el vector). Como huésped se eligió *Escherichia coli*. Para llevar a cabo la transferencia se combinó el gen sintético con un plásmido que llevaba la descripción pBR322 (véase Cuadro 3.2), así como un fragmento del operón lac (exhaustivamente en el Cap. 4).

Para una expresión efectiva de un gen clonado se requiere una señal clara que sea entendida por la célula huésped. Estos promotores vienen frecuentemente de un gen, que puede alcanzar un grado de expresión elevado en este huésped. Lo más sencillo es acoplar el DNA clonado al DNA de un gen propio de una célula y aprovechar al mismo tiempo sus promotores buenos funcionales. El gen de la somatostatina se incorporó en el extremo propio del gen bacteriano, en el cual se codifica la enzima **β-galactosidasa**. La β-galactosidasa es una enzima que se encuentra en grandes cantidades y degrada lactosa. Es una enzima inducible (Cap. 4).

Tras la transferencia con éxito del plásmido en una célula de *E. coli* se produce, por lo tanto, una somatostatina en forma de **proteína de fusión** somatostatina-β-galactosidasa. En realidad es sólo un "péptido cola" de 14 aminoácidos, más corto, colgado a la enzima galactosidasa.

Mediante tratamiento con el producto químico **bromocianuro (CNBr)**, la proteína se rompe sólo en el lugar donde se encuentra el aminoácido **metionina**, dejando la somatostatina finalmente separada de la β-galactosidasa.

Debido a que el gen se había producido sintéticamente, era una menudencia incorporar la metionina requerida al inicio de la molécula de somatostatina. Para ello simplemente se instaló el codón ATG para la metionina. Este proceso previo no se pudo evitar. Si no, la somatostatina, si se intenta producir por sí misma, se degrada muy rápido mediante enzimas (proteasas) bacterianas fragmentadoras de proteínas. Esto es evidente gracias a que la "buena confidente" galactosidasa está "escondida" y no se

muestran apéndices de la somatostatina, que en otro caso se fragmentarían. Científicamente se dice: mediante su expresión como "proteína de fusión con acción propia de las bacterias", la somatostatina exógena de las bacterias se protege de la degradación por las proteasas bacterianas.

El resultado fue que la somatostatina sintetizada en *E. coli* era completamente idéntica a la natural humana. Cada célula forma alrededor de 10 000 moléculas de somatostatina. Esto era una hazaña extraordinaria, que animó a obtener otros péptidos.

Después de todo, el descubridor de la somatostatina animal, **Roger Guillemin** (nacido en 1924, premio Nobel en 1977 con Andrew V. Schally y Rosalyn Yalow, Fig. 3.38), tuvo que trabajar con 500 000 hipotálamos de cerebro de oveja para obtener aproximadamente cinco miligramos de la sustancia purificada de la hormona somatostatina animal.

Solamente ocho litros de la suspensión de las bacterias *E. coli* recombinantes aportaban ahora la misma cantidad de somatostatina humana.

3.19 Cómo se obtiene enzimáticamente insulina humana a partir de insulina de cerdo

La insulina utilizada antes en la terapia de la diabetes, como ya se ha comentado (véase también Cuadro 3.3), se extraía del páncreas de toros o cerdos. Su secuencia de aminoácidos no coincide completamente con la insulina humana: en el cerdo hay un aminoácido distinto, en el toro hay tres.

La insulina se incorporó dos años después de su descubrimiento al tratamiento de la diabetes. Por un lado eliminaba el síndrome principal de la enfermedad del azúcar, pero también tenía efectos secundarios indeseables. Así, algunos diabéticos desarrollaron alergia a la hormona animal, ya que era una proteína exógena para el sistema inmunitario, contra la que se podían formar anticuerpos.

La solución sería convertir la insulina de cerdo, con la ayuda de enzimas, en insulina humana. Los investigadores de Hoechst Inc. encontraron, a principios de los años 1980, una elegante solución: el aminoácido alanina final de la insulina de cerdo se intercambia enzimáticamente por una treonina. La hidrolasa **tripsina** (Fig. 3.46), además de hidrolizar en el estómago "todo lo fragmentable" para las proteínas (Cap. 2), tiene una propiedad asombrosa: hidrolizar proteínas y péptidos exactamente de modo específico junto a los aminoácidos lisina y

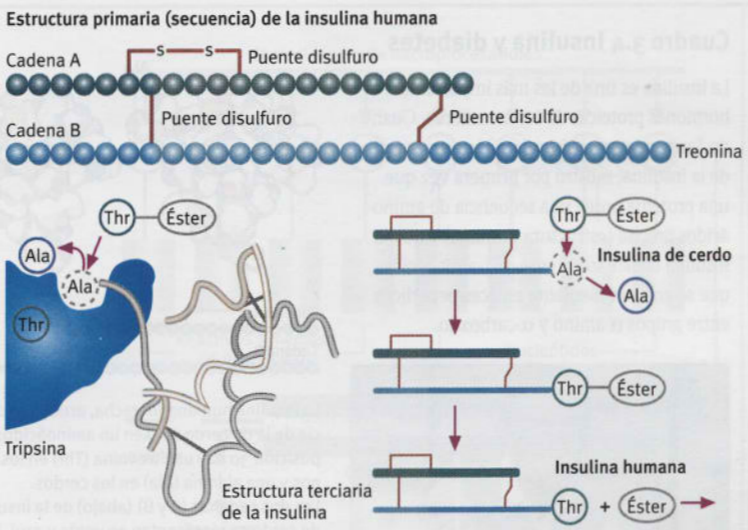


Fig. 3.45 Conversión enzimática de la insulina de cerdo a humana.

arginina. Al final de la cadena B en el cerdo se encuentra, por suerte, la alanina, y "antes" una lisina ... ¡Maravilloso!

Así pudo romperse la alanina final (Fig. 3.45). Primero va todo "normal": la insulina de cerdo se trata con tripsina. Al mismo tiempo se añade un éster de treonina (éster terbutilo de treonina) y la reacción tiene lugar en un 55% de disolvente orgánico. Entonces ocurre algo asombroso: la reacción inversa de la enzima. Las proteasas pueden fraccionar péptidos con la ayuda de agua, ¡pero también los péptidos (y ésteres de aminoácidos) se pueden unir en un entorno pobre en agua! Este proceso se denomina **transpeptidización**. El éster de treonina se anexiona en el lugar de rotura de la "alanina del cerdo". Sólo se debe hidrolizar mediante el aporte de agua. Se origina así insulina activa por catálisis enzimática.

Este procedimiento dura aproximadamente seis horas, pero requiere, como antes, grandes cantidades de insulina de cerdo como materia prima.

Como era de esperar, en Hoechst se trabajó diariamente con casi una docena de toneladas de páncreas de cerdo de más de 100 000 animales de matadero.

3.20 ¡Finalmente se consiguió! La primera insulina humana producida por ingeniería genética

En 1979 también se practicó con éxito la síntesis bacteriana de insulina humana. Con un rendimiento de insulina de 100 000 moléculas por célula, la producción de insulina bacteriana fue aún más productiva que la de somatostatina. Además, la insulina posee una

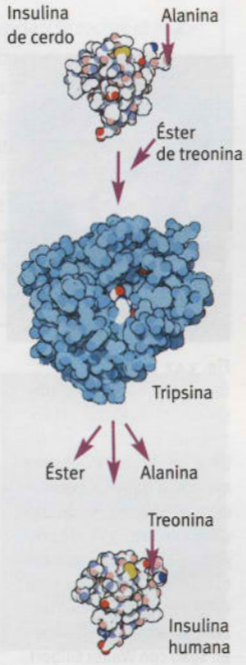
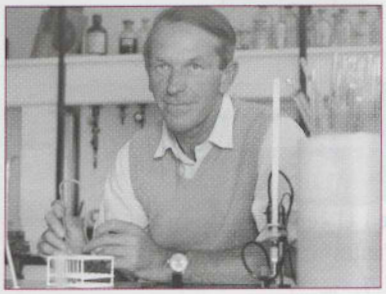


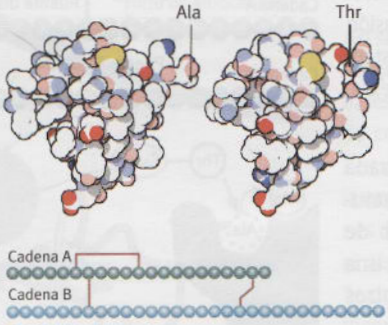
Fig. 3.46 Estructuras espaciales de la insulina de cerdo y la humana, así como de la tripsina (centro).

Cuadro 3.4 Insulina y diabetes

La insulina es una de las más importantes hormonas proteicas de los mamíferos. Cuando Sanger determinó en 1953 la estructura de la insulina, mostró por primera vez que una proteína posee una secuencia de aminoácidos precisa (estructura primaria) y que la insulina consta solamente de L-aminoácidos, que se enlazan mediante enlaces peptídicos entre grupos α-amino y α-carboxilo.



Fred Sanger (nacido en 1918) aclaró la estructura de la insulina entre 1945 y 1955, en Cambridge, y recibió por ello su primer premio Nobel. De vez en cuando, desde su laboratorio-sótano veía "dos formas, que pasaban hablando acaloradamente una con otra, una pareja bastante loca. Tenían la costumbre de gritar arriba y abajo, y de ir subiendo de tono de manera terrorífica". Éstos eran Watson y Crick. Estaba claro que estos dos "locos" acabarían animando a Sanger con el DNA. Así, Sanger recibió su segundo premio Nobel por la secuenciación del DNA (Cap. 10).



La insulina humana (derecha, arriba) se diferencia de la de cerdo sólo en un aminoácido: en la posición 30 hay una treonina (Thr) en los humanos y una alanina (Ala) en los cerdos.
Las dos cadenas (A y B) (abajo) de la insulina de cerdo se representan en verde y azul. Están enlazadas por tres puentes disulfuro (se ven aquí en marrón).

La insulina se produce en el páncreas y tras las comidas se libera a la sangre, cuando aumenta la cantidad de glucosa. Esta señal recorre el cuerpo: hacia el hígado, el músculo y los adipocitos. La insulina produce en las células el aumento de glucosa en la sangre y la síntesis de sustancias de reserva, como glucógeno, triacilglicéridos y proteínas, para ser utilizadas. La insulina es una molécula diminuta. Las proteínas pequeñas son un desafío para las células: es difícil producir una proteína pequeña que se pliegue en una estructura estable. La célula soluciona el problema formando cadenas peptídicas más largas, que se doblan en la forma adecuada y entonces se corta la parte sobrante (en el caso de la insulina el péptido C) (véase Fig. 3.36).

Si hay una alteración en la función de la insulina (por enfermedad del páncreas, por la edad o por un estilo de vida poco saludable), la cantidad de glucosa en sangre puede aumentar peligrosamente. Valores de glucosa elevados producen deshidratación, pues el cuerpo intenta eliminar el exceso de glucosa con la orina. El valor de pH cambia drásticamente en la sangre y las células se ven afectadas.

La diabetes es la enfermedad número uno de la civilización (Cap. 10), con carácter de epidemia mundial. La diabetes tipo I o *mellitus* (en latín "azucarado con miel"), dependiente de insulina, causa la destrucción autoinmunitaria de los islotes de Langerhans del páncreas. Las personas que la padecen necesitan insulina para sobrevivir. Los principales diabéticos tienen una cantidad de insulina en sangre normal o incluso elevada, pero no responden bien a la hormona (diabetes tipo II, detallada en el Cap. 10).



Fig. 3.47 Paul Berg (nacido en 1926) fue profesor de Stanford con sólo 33 años. Escribió la "carta Berg", en la cual exigía una moratoria para los experimentos peligrosos con DNA, y organizó en 1975 el Congreso de Asilomar, que aportó las líneas maestras para el trabajo con el DNA. Fue premio Nobel de Química en 1980 con Walter Gilbert y Frederick Sanger.

importancia médica esencialmente mayor. ¿Cómo se consiguió la síntesis?

La insulina consta, como se ha mencionado, de dos cadenas peptídicas de 21 y 30 aminoácidos, respectivamente. Sin embargo, la información para el **procesamiento** necesario hasta la insulina activa no está codificada en la secuencia del gen: el **péptido señal** y la secuencia del péptido C deben separarse y las cisteínas deben enlazarse exactamente a los **puentes disulfuro**. Esto sólo puede conseguirse en los islotes de Langerhans del páncreas.

Las células de *E. coli* y las levaduras eucarióticas no poseen esta habilidad (¡véase Sección 3.25!). Era cómodo, al menos para la insulina, que para su capacidad funcional no se tuviese que añadir ningún resto de azúcar (**glicosilación**). El camino del aislamiento del RNAm de la insulina no era fácil. Se debía realizar una tarea como en la somatostatina. De manera más laboriosa, en un pequeño trabajo de tres meses, los científicos del City of Hope National Medical Center produjeron las dos cadenas a partir de los correspondientes genes sintéticos. Puesto que –gracias a los 10 años de trabajo de Frederick Sanger– se sabía cómo formar insulina, se pudo elaborar la secuencia genética correspondiente sobre el papel.

Dieciocho fragmentos de varios nucleótidos condujeron a los investigadores al gen de la cadena más larga, y once fragmentos al gen de la cadena más corta. Siguieron separadas: por miedo a los posibles riesgos, se generaron la cadena A y la cadena B en paralelo en diferentes microorganismos (Fig. 3.47). La insulina activa no pudo originarse, pues, de ningún modo en una célula.

3.21 Asilomar: ¿cuál es el peligro de la nueva ingeniería genética?

¿Por qué ese miedo? El riesgo de los experimentos de ingeniería genética se discutió acaloradamente por científicos preocupados, como Paul Berg (Fig. 3.47), David Baltimore, Maxine Singer y Sydney Brenner, en 1975, en la conferencia de Asilomar. Si se podía, por ejemplo, generar por ingeniería genética bacterias intestinales resistentes a antibióticos causantes de cáncer, ¿tendría

Cuadro 3.5 Genes en un tubo de ensayo: robots automáticos de síntesis de DNA

Actualmente hay máquinas que pueden sintetizar automáticamente DNA de una única hebra y expresar secuencias rápidamente. El procedimiento completo, o sea, incluyendo la alineación (secuencia) de las bases individuales, se realiza mediante microprocesadores.

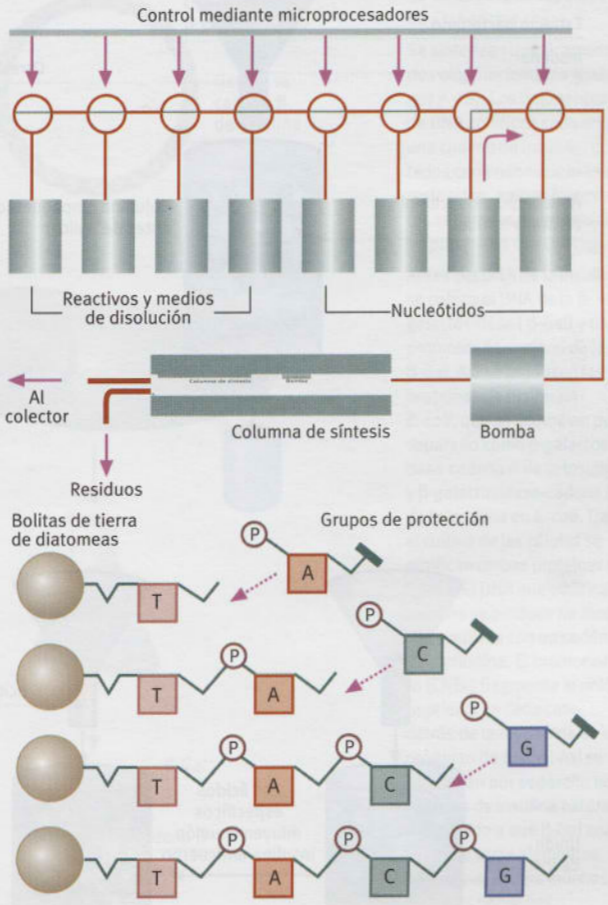


Sintetizador automático de DNA.

En estas máquinas se da la secuencia deseada. Los microprocesadores se ocupan de que se bombeen los nucleótidos, los reactivos y los medios de disolución para cada paso individual en la columna del sintetizador. La columna está llena de bolitas de tierra de diatomeas (sílica gel), aproximadamente con la granulación de la arena fina. Cada bolita proporciona un soporte sólido a una cadena de DNA.

Si se quiere sintetizar una determinada secuencia, por ejemplo TACG, es decir, que salga de una columna, se fija a las bolitas el primer nucleótido (en el ejemplo la base timina) –e indudablemente con el denominado extremo 3'. Los microprocesadores permiten que se bombeen millones de moléculas del siguiente nucleótido (A) a través de la columna. El extremo 5' de A está bloqueado químicamente, de modo que se une con la orientación adecuada a T. El grupo de protección se separa entonces y empieza una nueva ronda.

De esta manera se pueden sintetizar cadenas cortas de hasta aproximadamente 50 nucleótidos. Las cadenas de oligonucleótidos acabadas se separan de las bolitas y se eluyen de la columna. El tiempo para la síntesis de cadenas de nucleótidos se acorta constantemente con cada nuevo desarrollo automatizado. Se escribe solamente la secuencia y se recoge el oligonucleótido acabado tras muy poco tiempo. Los oligonucleótidos son importantes en biotecnología por tres motivos: pueden llegar a formar los genes sintéticos completos más grandes (como en la insulina y la somatostatina), pueden utilizarse como sondas de DNA (Fig. 3.44) y se requieren como iniciador (*primer*) para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la secuenciación (Cap. 10).



Principio de un sintetizador automático de genes

como consecuencia una "epidemia de cáncer expandida por las bacterias"? Los científicos preocupados no sospechaban, sin embargo, que su propio sentimiento de responsabilidad se convertiría en imágenes de horror sobre los peligros de la ingeniería genética en los medios de comunicación.

¿Qué pasaría en caso de que las bacterias formasen insulina activa y por descuido se colocasen en el intestino de los humanos y sobreviviesen allí? Podrían provocar una conmoción insulínica mortal. En lo sucesivo, el National Institute of Health (NIH) promulgó directrices muy estrictas en materia de ingeniería genética.

Se crearon **cepas de seguridad** "lisadas" de *E. coli* (por ejemplo K12), que no podían existir fuera del laboratorio, y se concibieron laboratorios de diferentes niveles de seguridad (P1 hasta P3) para trabajos microbiológicos.

Los genes creados artificialmente para las cadenas A y B de la insulina no tenían indudablemente la misma secuencia que el fragmento genético (que no se conocía), pero representaban los polipéptidos reales.



Fig. 3.48 Microcolonia de *Escherichia coli*. Detalle del tema "Las bacterias también envejecen", véase Cuadro en el Cap. 10.

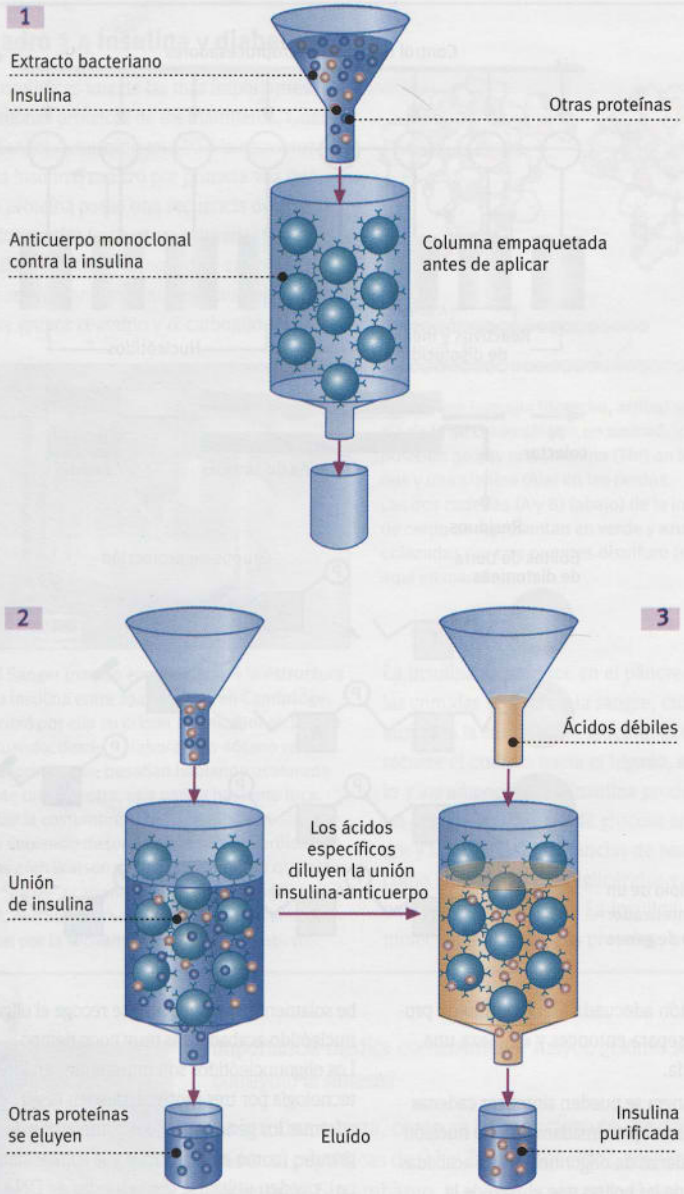


Fig. 3.49 Purificación de la insulina mediante cromatografía de afinidad.

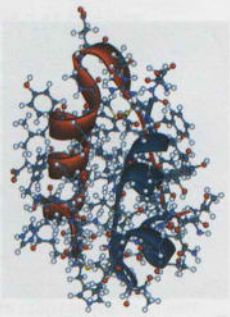


Fig. 3.50 Estructura espacial de la molécula de insulina con puentes disulfuro (amarillo) y hélices α de las cadenas A y B.

Cada gen artificial, el de la cadena A y el de la B, se incorporó directamente (como en el caso de la somatostatina) detrás del gen promotor de la β-galactosidasa y del gen de la galactosidasa en diferentes plásmidos.

De forma inteligente se incorporó de nuevo, entre los genes de la insulina y de la galactosidasa, un "lugar de rotura", un codón para el aminoácido **metionina** (o sea ATG). Tras la producción eficaz, cada cadena A o B llevaba una metionina adicional en el extremo N-terminal de las cadenas para la rotura de la galactosidasa (Fig. 3.51).

Tras la transferencia de dos cepas de *E. coli* diferentes y de la producción eficaz de los polipéptidos se fragmentaron ambos péptidos con bromocianuro otra vez exactamente en el "lugar que se debía romper" para la galactosidasa respectiva. La Fig. 3.49 muestra cómo se pueden purificar después las cadenas de insulina a partir de una mezcla de sustancias diferentes con la ayuda de anticuerpos especiales contra insulina, exclusivamente por cromatografía. Esta separación se basa en la afinidad de la insulina por los especiales anticuerpos anti-insulina, y se denomina **cromatografía de afinidad**.

Entonces se requiere sólo un paso químico: la **"sulfurólisis oxidativa"**. El oxígeno y un valor de pH fuertemente básico producen la oxidación de la cisteína, que lleva un grupo SH. Ahora son altamente reactivas y se unen a grupos SH oxidados vecinos mediante un **puente disulfuro** (unión S-S) para formar insulina activa.

El rendimiento de la insulina activa se reduce, sin embargo, por enlaces falsos de las cadenas A y B, que se deben separar. Los puentes disulfuro son decisivos para la estructura espacial y, por lo tanto, para la actividad de la insulina.

La insulina debe contener tres puentes disulfuro: uno interior de la cadena A y dos entre las cadenas A y B. La **insulina recombinante** microbiana generada de esta manera condujo, en 1982, a una revolución en el mercado de la insulina.

Por motivos de seguridad, al principio se produjeron separadamente las cadenas A y B. Los recelos eran efectivamente grandes: la compañía Hoechst solicitó en 1984 el permiso para la construcción de una instalación de producción de insulina humana mediante ingeniería genética. Tras interminables idas y venidas, finalmente en 1998 –después de 14 años de burocracia y discusiones públicas– Hoechst Marion Roussel puso en funcionamiento la instalación en Alemania.

3.22 Proinsulina humana a partir de una única cepa de *E. coli*

Otra mejora fue la producción de proinsulina en una sola cepa bacteriana. El gen completo de la proinsulina (con el péptido C, sin embargo, sin la secuencia para el péptido señal) se sintetizó primero artificialmente. Antes del codón para el primer aminoácido se añadió de nuevo un codón de metionina (ATG).

La ventaja era que solamente se utilizaba un único plásmido y una única cepa de *E. coli*. En este caso se controla el gen de la proinsulina con un potente promotor de la triptófano sintasa. Sobre el plásmido se encontraron también, uno tras otro, el promotor de la triptófano sintasa, el gen de la triptófano sintasa, la secuencia ATG (que codifica metionina, como

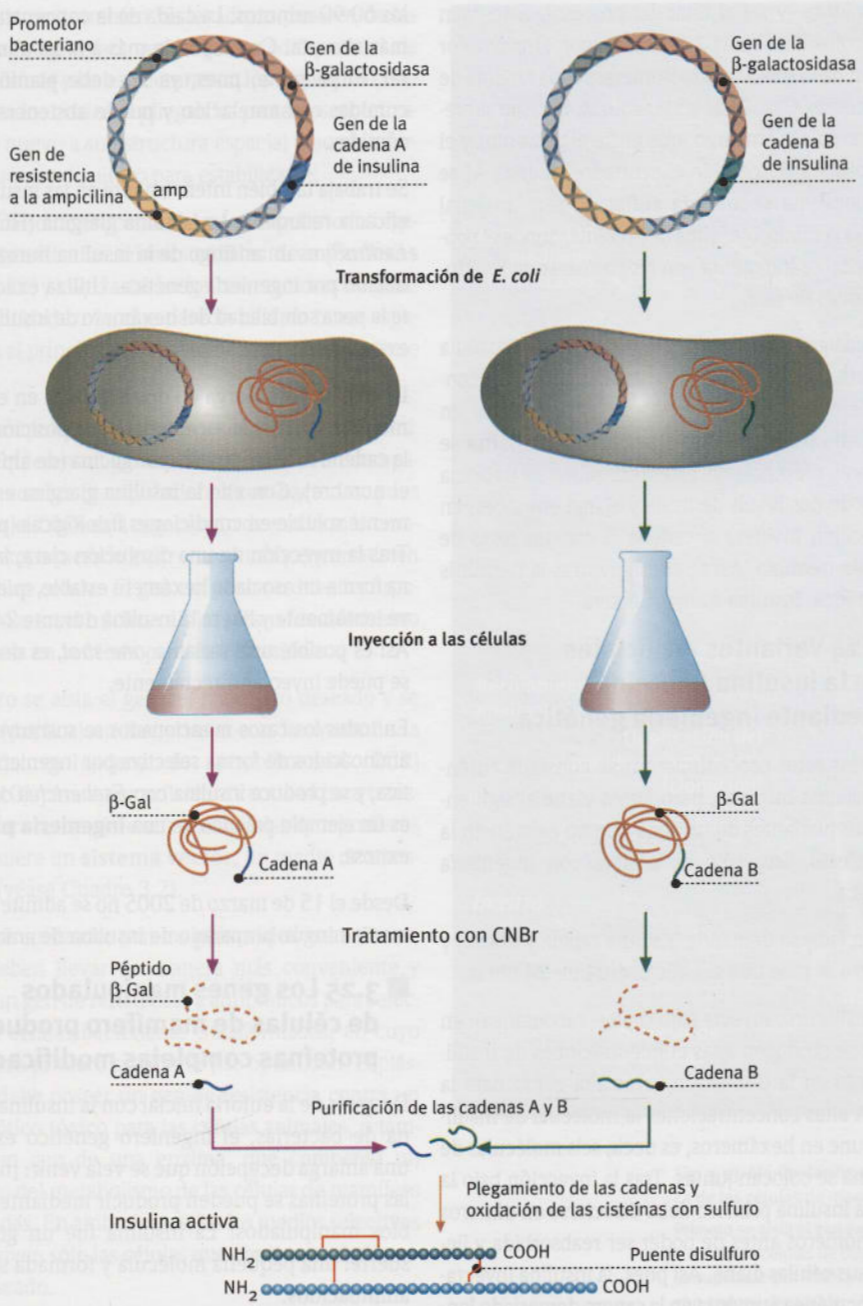
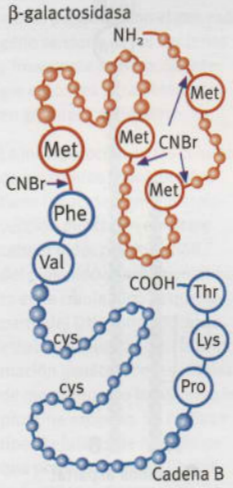


Fig. 3.51 Expresión de insulina en dos cepas separadas de *Escherichia coli*:

Se sintetizan químicamente dos oligonucleótidos (cadenas A y B). Los fragmentos de DNA codifican cada uno una cadena de insulina. Cortados con endonucleasas de restricción, ambos fragmentos separados se incorporan en plásmidos con DNA ligasa.

Antes del DNA de la insulina se coloca el DNA de la β-galactosidasa (β-Gal) y un promotor bacteriano de la β-Gal. Así se producen las proteínas de fusión en *E. coli*, que se acumulan por separado como β-galactosidasa-cadena A de la insulina y β-galactosidasa-cadena B de la insulina en *E. coli*. Tras el cultivo de las células se purifican ambas proteínas de fusión. El DNA que codifica la insulina se produce de modo que empieza con un codón de metionina. El bromocianuro (CNBr) fragmenta la unión peptídica en cada caso detrás de la metionina en el producto de fusión. Así se consiguen por separado las cadenas de insulina naturales. Debido a que β-Gal aún contiene otros elementos metionina, origina muchos péptidos pequeños.

Genial: ¡las cadenas de insulina no contienen metioninas internas y permanecen intactas! Mediante sulfurólisis oxidativa se activan finalmente, tras su purificación, las cisteínas de las cadenas A y B, y ambas cadenas se unen: se origina insulina humana intacta.

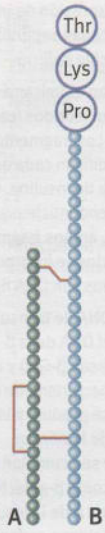


El CNBr fragmenta la unión peptídica tras la metionina.

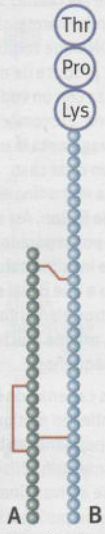
lugar de partida) y la secuencia para la proinsulina (B-C-A). Se forma, pues, una **proteína de fusión**. Tras la biosíntesis se fragmenta con CNBr la metionina con la enzima triptófano sintasa y se consigue la proinsulina. Los enlaces correctos de los restos de cisteína se consiguen mediante sulfurólisis. Con el péptido C se logró una mejor unión de las cadenas A y B. El péptido C se corta y extrae enzimáticamente mediante **tripsina**. Así se consigue insulina activa, plegada de la forma correcta, ¡100% idéntica a la insulina humana! Utilizando este método, hoy producen insulina las compañías Berlin-Chemie, Sanofi-Aventis (antes Hoechst) y Lilly.

3.23 Levaduras de cocción como productoras de proinsulina

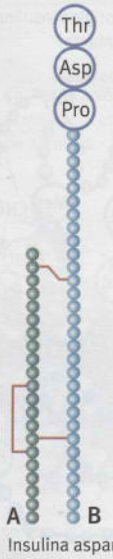
En lugar de bacterias procariotas, la compañía Novo Nordisk escogió levaduras de cocción eucariotas. También utilizó un gen artificial, pero (después de un fracaso con el péptido C completo) con sólo nueve nucleótidos para el péptido C (o sea, únicamente con tres aminoácidos en el producto). Las proteasas de levadura no pueden hidrolizar este péptido corto, elegido de modo tan genial que lleva una sobre otra las cadenas A y B a una proximidad favorable, que puede enlazar puentes disulfuro incluso en la célula



Insulina humana



Insulina lispro



Insulina aspartat

Fig. 3.52 Variantes de insulina.

de levadura (y no al final del proceso). Este "gen miniproinsulina" está controlado por el promotor del gen de la triosa fosfato isomerasa (una enzima de la glucólisis, Cap. 2) de las levaduras. El rasgo sobresaliente es, sin embargo, que entre el promotor y el gen (cadena B - péptido C acortado - cadena A) se incorpora una **secuencia señal**. El péptido señal expulsa la miniproinsulina de la célula, donde el péptido señal se fragmenta con las proteasas de levadura después de salir.

Por consiguiente, se cede al medio una proinsulina correcta. El minipéptido C se separa como en la conversión de insulina de cerdo a insulina humana: en un medio pobre en agua (orgánico) la **tripsina** se separa en presencia del éster terbutílico de treonina detrás de dos restos de lisina y alarga entonces, en la reacción inversa, la cadena B con un resto de éster de treonina. Así se consigue, tras la hidrólisis enzimática, insulina humana activa.

3.24 Variantes artificiales de la insulina (muteína) mediante ingeniería genética

En todos estos procedimientos se consigue auténtica insulina humana, pero ahora viene el siguiente paso: ¡variantes de insulina que no existen en la naturaleza! Esto sólo es posible con ingeniería genética.

Por un lado se demanda insulina rápida y eficaz, y por otro se pide que sea eficaz durante 24 horas.

Si la insulina se inyecta bajo la piel (subcutánea), en breve se producen altas concentraciones de insulina tanto en la disolución inyectada como bajo la piel. A altas concentraciones la molécula de insulina se une en hexámeros, es decir, seis moléculas de insulina se colocan juntas. Tras la inyección bajo la piel, la insulina primero debe disociarse en dímeros y monómeros antes de poder ser reabsorbida y llegar a sus células diana. Así pues, la insulina inyectada subcutánea aumenta en la sangre demasiado lentamente y permanece demasiado tiempo elevada de manera no fisiológica. Esto plantea un problema para el diabético.

Se buscó intensamente elevar la disponibilidad rápida de la insulina: el intercambio recíproco de prolina y lisina en la posición 28 y 29 condujo, en 1996, al producto *Humalog*®, la denominada insulina lispro (Fig. 3.52). El nombre deriva de "lisina-prolina". Si, por el contrario, se intercambia sólo lisina por aspartato, se obtiene insulina *aspart*®.

Ambas variantes son rápidamente efectivas. Se consiguen concentraciones de insulina en plasma a los 60-90 minutos. La caída de la concentración es más abrupta. Corresponde más a la insulina natural. El paciente, pues, ya no debe planificar sus comidas con antelación y puede abstenerse entre comidas.

Se trabaja también intensamente en las insulinas de eficacia retardada. La insulina glargina (HOE 901, *Lantus*®) es un análogo de la insulina humana producido por ingeniería genética. Utiliza exactamente la poca solubilidad del hexámero de insulina, que evita una insulina "rápida".

La cadena B se alarga en dos argininas en el extremo C-terminal y la asparagina de la posición 21 de la cadena A se reemplaza por glicina (de ahí "gl" en el nombre). Con ello la insulina glargina es difícilmente soluble en condiciones fisiológicas (pH 7,4). Tras la inyección de una disolución clara, la insulina forma un asociado hexámero estable, que disuelve lentamente y libera la insulina durante 24 horas. Así es posible una variante *one-shot*, es decir, que se puede inyectar directamente.

En todos los casos mencionados se sustituyeron los aminoácidos de forma selectiva por ingeniería genética, y se produce insulina con *Escherichia coli*. Éste es un ejemplo práctico de una **ingeniería proteica** exitosa.

Desde el 15 de marzo de 2005 no se admite en Alemania ningún preparado de insulina de animales.

3.25 Los genes manipulados de células de mamífero producen proteínas complejas modificadas

Después de la euforia inicial con la insulina humana de bacterias, el ingeniero genético esperaba una amarga decepción que se veía venir: ¡no todas las proteínas se pueden producir mediante microbios manipulados! La insulina fue un golpe de suerte: una pequeña molécula y formada sólo por aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos no es la única característica importante de una proteína: las proteínas animales y humanas construidas de forma complicada, que además de su parte proteica requieren modificaciones (restos de azúcar, grupos fosfato o nucleotídicos) para su eficacia, no pueden producirse de bacterias procariotas, o bien son inactivas. Una salida la ofrecieron primero las levaduras eucariotas, cuyas células están altamente organizadas en estructura y metabolismo. Las levaduras tuvieron éxito en la producción de proinsulina, de hirudina (Cap. 9) y de las vacunas contra la hepatitis B (Cap. 5), totalmente al contrario que *E. coli*.

Sin embargo, también las levaduras carecen de las enzimas y los cofactores para las modificaciones de las proteínas y las estructuras en los orgánulos celulares, en los cuales se pliegan las proteínas sintetizadas de nuevo a su estructura espacial y pueden formar puentes disulfuro para estabilizarse.

La única solución consistía en manipular con ingeniería genética las mismas **células de mamíferos** (Fig. 3.53) y cultivarlas en los biorreactores en grandes cantidades. Lo que parecía casi no tener esperanzas al principio, hoy ya se domina técnicamente bien.

Las manipulaciones genéticas en células de mamífero requieren un gasto mucho más alto en comparación con las manipulaciones con bacterias, pues en ellas el DNA está organizado de modo más complejo: empaquetado en cromosomas y encerrado en un núcleo celular. El gen exógeno no debe incorporarse sólo en el núcleo celular (**transfección**), sino utilizarse en la célula para su expresión.

Primero se aísla el gen del mamífero deseado y se clona (duplica) en bacterias o con la ayuda de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Cap. 10), para tener suficiente cantidad para transferir. Para la transferencia a las células de mamíferos se requiere un **sistema vector**, un medio de transporte (véase Cuadro 3.2).

Los más utilizados son los **plásmidos** bacterianos, que deben llevar de manera más conveniente y sabia un gen de resistencia a antibióticos para seleccionar células bacterianas transformadas, en cuyo plásmido primero proliferan y se optimizan. El plásmido debe poseer un gen de resistencia contra un antibiótico tóxico para las células animales, o también un gen de una enzima, que compensa un defecto del metabolismo de las células de mamífero utilizadas. En ambos casos, en los medios selectivos sobreviven sólo las células que contienen el plásmido deseado.

Con las ya conocidas "enzimas tijeras y pegamento", endonucleasas de restricción y DNA ligasas, se incorpora mediante ingeniería genética el gen humano en el plásmido. Es importante, para la posterior expresión en células de mamíferos, la construcción al mismo tiempo de un promotor animal directamente antes del gen.

El plásmido híbrido así originado se mezcla con bacterias, y todas las células que lo han tomado se reconocen fácilmente por su resistencia a un determinado antibiótico. Sólo ellas crecen en una colonia de células del mismo tipo, un clon. Cada célula de esta colonia contiene, pues, una copia del mismo plás-

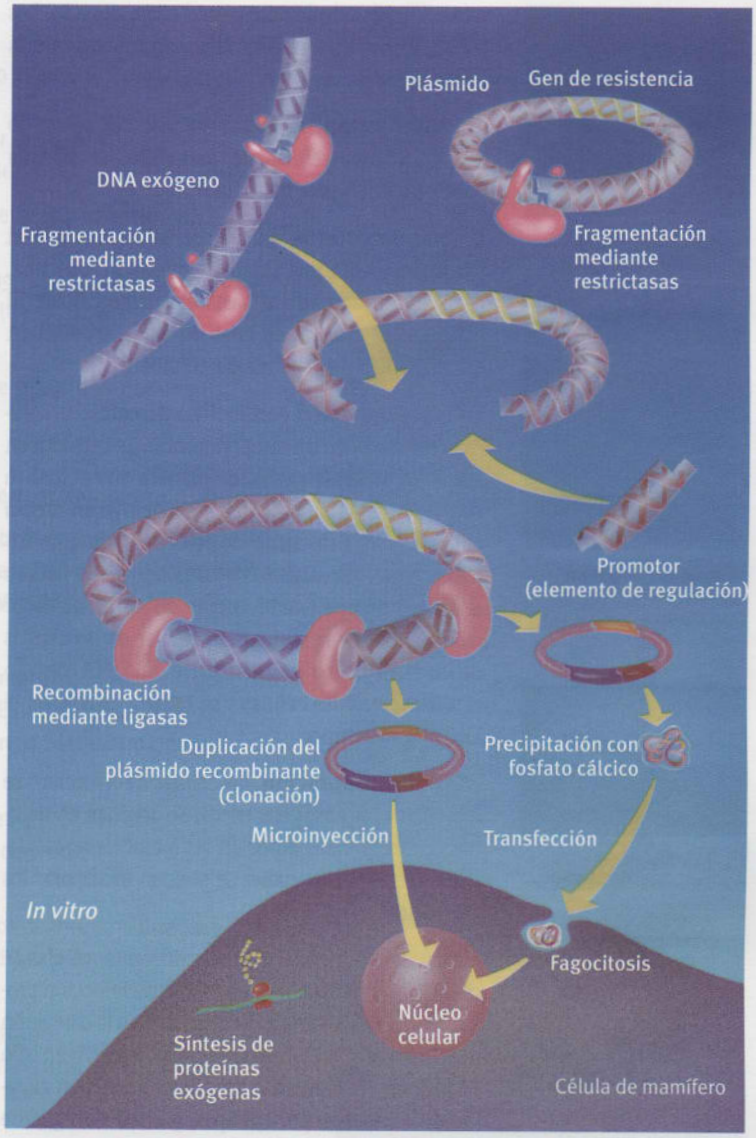


Fig. 3.53 Manipulación genética de las células de mamíferos.

Primero se aísla el gen exógeno, clonado en células de bacterias (o duplicado por PCR), y luego, con endonucleasas de restricción y ligasas, se llega a un sistema vector (representado aquí: plásmidos bacterianos que contienen un gen de resistencia a determinados antibióticos). Con ello el gen exógeno se puede interpretar (expresar) en las células de mamíferos; al mismo tiempo, un promotor animal (la secuencia de reconocimiento para la unión de la RNA polimerasa) se debe instalar directamente antes del gen exógeno.

El plásmido recombinante se incorpora en bacterias. Las células que han introducido con éxito el plásmido son resistentes a determinados antibióticos y así se pueden seleccionar. El plásmido con el gen exógeno se clona en las bacterias y finalmente se aísla. Se integra entonces para obtenerse en grandes cantidades.

La incorporación en las células de mamíferos (transfección) tiene lugar mediante microinyección directa en el núcleo celular o por precipitación del plásmido y recepción directa en la célula. Una pequeña parte del DNA introducido se estabiliza integrado en la información genética de las células de mamífero y se transforma en proteína exógena. Se cultivan tipos celulares de mamíferos que preferentemente liberan la proteína exógena al medio para una purificación simple.



Fig. 3.54 Cultivo de células de mamíferos con medios especiales.

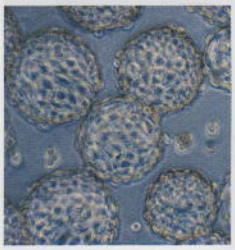


Fig. 3.55 Las células de mamíferos crecen sobre soportes en forma de esfera.



Fig. 3.56 Biorreactor para cultivos de células de mamíferos.



Fig. 3.57 En este reactor de cultivo de células de mamíferos las fibras huecas abastecen de alimento a las células.

Posibles modificaciones de una proteína tras su síntesis en células eucariotas

- Grupos disulfuro entre restos de cisteína
- Captura de azúcares (glicosilación)
- Bloqueo del extremo N
- Farnesilación o miristinilación para asociar las proteínas con la membrana
- Hidrólisis especiales (fragmentación proteolítica)

mido. El plásmido se duplica con ellas, clonado. Los plásmidos se extraen luego fácilmente de las células bacterianas.

La **transfección**, la incorporación del plásmido híbrido en las células de mamífero, se efectúa mediante diferentes métodos:

La **microinyección** del vector se realiza bajo el microscopio con una aguja de inyección muy fina, cuya punta se conduce hasta el núcleo celular. El plásmido se integra, en caso de éxito, en el DNA cromosómico de la célula de mamífero.

En la **precipitación con fosfato de calcio** se coloca el plásmido en un tampón fosfato. Se introducen entonces iones de calcio, de manera que el fosfato de calcio insoluble precipita y se incluye en medio del plásmido. Este agregado se obtiene en el precipitado como granulado. Los iones de calcio aceleran al mismo tiempo la adquisición de los gránulos de DNA mediante la membrana celular en las células de mamífero. Una pequeña parte del DNA tomado se transporta a las células y se integra estable en el DNA cromosómico.

En la **electroporación,** las células de mamífero se exponen a impulsos eléctricos. Se originan en tiempos cortos grandes poros en las membranas celulares, a través de los cuales se pueden incorporar los plásmidos.

Después de la transfección se cultivan las células de mamífero tratadas sobre un medio de selección propio (Fig. 3.54). Como ya se describió en la clonación de genes en *E. coli,* en la **selección** sobreviven sólo las células manipuladas genéticamente. Son capaces de sobrevivir, por ejemplo, gracias a un gen de resistencia situado en el plásmido resistente a antibióticos tóxicos contra las células animales, o gracias al gen de una enzima que compensa un defecto metabólico de las células de mamífero utilizadas.

Los productos deseados se obtienen de diferentes formas. Si los productos permanecen en la célula, éstas se cultivan y luego se abren, y su producto se aísla y purifica (Fig. 3.49). Si por el contrario los productos se liberan (segregan) de las células (por ejemplo anticuerpos), se pueden obtener del medio bombeando, mientras que las células permanecen en el reactor.

Las células manipuladas forman colonias. En los medios de nutrición apropiados crecen y producen la proteína deseada en grandes cantidades.

Para su crecimiento en estado natural muchas células de mamíferos necesitan superficies sólidas, de cristal o plástico, sobre las cuales forman capas de células regulares (Fig. 3.55). Las principales células de mamífero crecen hoy en día, sin embargo, como células individuales en medios de cultivo líquidos en biorreactores.

Las células de mamífero se encierran también en geles: las células de hibridoma que forman anticuerpos (véase Cap. 5) crecen en cápsulas de alginato y separan los anticuerpos a través de las membranas de la cápsula hacia el medio.

Los primeros productos de la ingeniería genética, una nueva etapa en el desarrollo de la biotecnología, fueron productos farmacéuticos producidos a partir de células manipuladas.

Ya en 1940 tuvo lugar, con la producción de la penicilina, un acontecimiento biotecnológico.

Bibliografía utilizada y aplicada

- El libro crucial para proseguir, complementario al actual, "Biotechnologie für Einsteiger":
  Brown TA (2002) Gentechnologie für Einsteiger. 3. Aufl.
  Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Aunque tiene unos cuantos años, aún es la mejor introducción a la investigación en DNA:
  Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M (1993) Rekombinierte DNA.
  2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Historia de la investigación del DNA:
  Judson HF (1980) Der 8. Tag der Schöpfung: Sternstunden der neuen Biologie. Meyster, Wien und München.
- La clásica autobiografía de Jim Watson:
  Watson JD (1969) Die Doppel-Helix. Rowohlt-Verlag, Hamburg.
- El amplio y rico en ilustraciones compendio sobre ingeniería genética y biotecnología, que ahora es el trabajo estándar para farmacéuticos en alemán:
  Dingermann T (1999) Gentechnik Biotechnik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Una buena introducción americana, principalmente de ingeniería genética, con ejemplos de trabajos de biotecnología en Estados Unidos:
  Thiemann WJ, Palladino MA (2004) Introduction to Biotechnology.
  Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco.
- **Bioquímica pura y muy bien ilustrada, "el Stryer":**
  Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2007) Bioquímica 6 ed.
  Editorial Reverté, Barcelona.
- A pesar de ser un libro antiguo, está lleno de conocimientos nuevos:
  Berg P, Singer M (1993) Die Sprache der Gene. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Libro de microbiología moderno, muy bien ilustrado:
  McKane L, Kandel J (1996) Microbiology, essentials and applications.
  2nd ed. McGraw-Hill Inc., New York.

Enlaces de Web

- Historia de la investigación del DNA y animaciones estupendas que necesariamente se deben ver:
  www.dnaftb.org/dnaftb
- El Prof. Hans Traxel (Berna) explica en alemán las bases de la biología molecular:
  http://ntbiouser.unibe.ch/trachsel/teaching/Gentechnologie/Start.html
- Fantástica animación de DNA y cromosomas:
  www.wehi.edu.au/education/wehi-tv/dna/wrapping.html
- Contribuciones de David Goodsell al banco de datos de proteínas en el original:
  www.scripps.edu/mb/goodsell/
- El modelo de la insulina en imagen tridimensional, gira libremente:
  http://brodel.med.utoronto.ca/molecule/
- El artículo clásico de Wilkins, Franklin, Avery, Watson y Crick en versión original:
  www.nature.com/nature/dna50/archive.html

Ocho preguntas de autoevaluación

1. ¿En qué se diferencia el DNA del RNA? Cite al menos tres diferencias.
2. La secuencia de una hebra de DNA es:
   5'–AATTCGTCGGTCAGCC–3'
   ¿Cuál es la secuencia complementaria?
3. ¡Ha descubierto usted una nueva cepa bacteriana! Su DNA consta de un 17% de adenina. ¿Cuál es la proporción de guanina en el genoma de la bacteria?
4. Un RNAm de eucariota tiene la siguiente secuencia:
   5'–AUGCCCCGAACCUCAAAGUGA–3'
   ¿Cuántos codones contiene y cuántos aminoácidos codifica? (Normalmente los RNAm son más largos. Recordar: no sólo hay codones codificadores para proteínas.)
5. ¿Qué tipo de proteína se obtendría si se cortara directamente DNA del genoma humano con endonucleasas de restricción, se incorporara en plásmidos y se llevara a la expresión? ¿Cómo se pueden evitar estos resultados?
6. ¿Qué hace que los plásmidos bacterianos sean vectores ideales para DNA exógeno? Cite al menos otro vector sobre la base de un virus.
7. ¿Por qué las sondas de DNA deben ser siempre moléculas de una única cadena?
8. ¿Por qué en la insulina humana las cadenas A y B se expresaron primero separadas en experimentos con *E. coli*?

Biotecnología blanca

Las células como fábricas de síntesis

4.1 El problema de la visión general 84

4.2 Adaptación táctica: regulación por retroacoplamiento 86

4.3 Adaptación estratégica: producción de enzimas a demanda 87

4.4 Un ordenador molecular alostérico: la glutamina sintetasa 89

4.5 Represión de catabolitos o cómo se pesca una polimerasa 90

4.6 ¡Mohos en lugar de limones! 90

4.7 Lisina en abundancia: la retroinhibición de la aspartato quinasa se burla con mutantes 91

4.8 L-glutamato: condimento de sopa "levorrotatorio" en exceso 93

4.9 ¿Tienen que ser siempre microbios? La síntesis química contra la fermentación 94

4.10 Ácido L-ascórbico, la vitamina C 96

4.11 Aspartamo – La marcha triunfal de un éster dipeptídico dulce 99

4.12 Las células inmovilizadas producen aminoácidos y ácidos orgánicos 101

4.13 Mutaciones: un camino hacia la programación selectiva de microbios 101

4.14 *Penicillium notatum*: el hongo milagroso de Alexander Fleming 106

4.15 *Screening*: biotecnólogos a la caza de hongos 106

4.16 El menú de los microbios 107

4.17 La biofábrica moderna 110

4.18 Calor, frío y sequedad nos mantienen los microbios en el cuello 110

4.19 Recuperación del producto: *downstream processing* 114

4.20 Estreptomicina y cefalosporina – Los siguientes antibióticos después de la penicilina 115

4.21 La competencia con los microbios: resistencias 115

4.22 Ciclosporina – Un producto microbiano para trasplantes 117

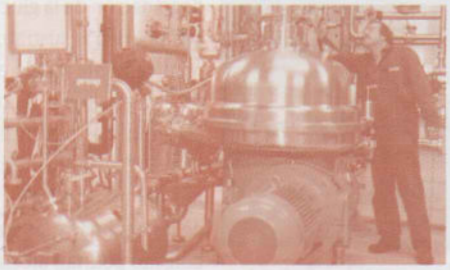
4.23 Hormonas esteroideas: la cortisona y la píldora anticonceptiva 119



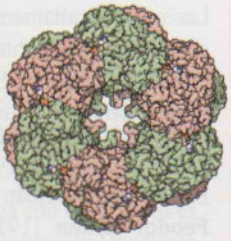




















Capítulo 4



Fig. 4.1 El cofundador de la biología teórica, Ludwig von Bertalanffy (1901-1972), provocó en parte drásticas consecuencias prácticas con su teoría.

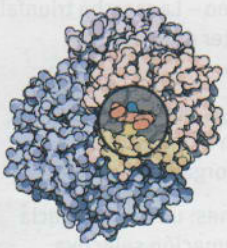


Fig. 4.2 La hemoglobina (con oxígeno unido al complejo porfirina-hierro, del grupo hemo) fue la primera proteína que mostró efectos alostéricos: la unión de oxígeno cambia la forma de la molécula. Se unen entonces más fácilmente otros oxígenos.



Fig. 4.3 Jacques Monod (1910-1976), ganador del premio Nobel y director del Instituto Pasteur desde 1971 hasta su muerte en 1976. Monod escribió un tratado filosófico muy discutido: "Casualidad y necesidad".

4.1 El problema de la visión general

Cada célula es un **sistema abierto** al medio ambiente. De ellas fluye sin cesar materia, que se transforma extraordinariamente rápido, pero nunca alcanza un equilibrio estacionario. La célula se encuentra en un **equilibrio de flujos (*steady state*)**. El cofundador de la biología teórica, **Ludwig von Bertalanffy** (1901-1972) (Fig. 4.1), lo expresó así: "Si, por ejemplo, usted tiene un perro, puede creer que dentro de cinco años aún tendrá el mismo perro, que siempre viene corriendo cuando lo llama por su nombre; pero en realidad del actual perro apenas quedará algo de él en cuanto a sus componentes materiales. Después de cinco años, su perro tendrá poco más que una molécula y muy pocas células de su vida anterior. Los resultados de esta renovación constante de la vida pueden cambiar por sí mismos a sus conocidos humanos, y a su mujer".

Un individuo de 70 kg de peso toma, por ejemplo, en un día, aproximadamente 50 a 100 g de proteína, 300 g de hidratos de carbono y 40 a 90 g de lípidos, junto con agua, vitaminas, minerales y unos 500 litros de oxígeno. En su cuerpo se generan y degradan al mismo tiempo alrededor de 70 kg de la "moneda de intercambio de energía", la adenosina trifosfato (ATP), y 2 kg de ácido cítrico (véase más adelante en este capítulo), finalmente se libera energía y productos de residuos no utilizables.

Sólo con un aporte constante de materia se puede mantener el equilibrio de flujos del sistema celular. Para ello utilizamos uno a dos kilogramos de bacterias en el intestino, que nos ayudan en el metabolismo y producen en parte importantes vitaminas.

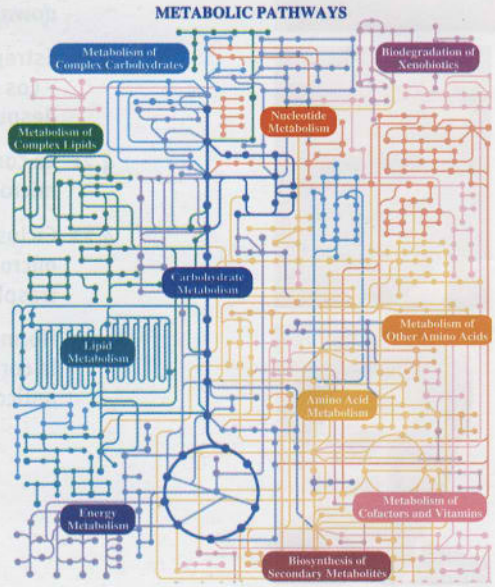


Fig. 4.4 La red metabólica de la célula: desde los azúcares complejos (en azul, arriba a la izquierda) se origina por ejemplo glucosa, que se convierte en la glucólisis (véase Cap. 1) (en azul, vertical en el centro) y avanza al ciclo de Krebs (azul, abajo en el centro). Se forman los aminoácidos en las ramificaciones.

En una única célula de un tamaño medio de 1/1000 a 1/100 mm se producen múltiples reacciones del metabolismo al mismo tiempo, unas tras otras o de manera simultánea. Están exactamente sintonizadas unas con otras. En reposo o en actividad, hambre, crecimiento y reproducción, calor o frío, el estado de orden del metabolismo debe defenderse y adaptarse con flexibilidad a las condiciones cambiantes. En todos los seres vivos existe, por lo tanto, una estrecha red de mecanismos de regulación y control, que se basan en diferentes principios. En las células, las enzimas desempeñan papeles decisivos en dicha red. Como parte de una fábrica, las principales enzimas de la "fábrica celular" a menudo se organizan en cadenas ramificadas o ciclos (Figs. 4.4 y 4.6). En el caso más sencillo, las moléculas de enzima "cuelgan" libres en el **plasma celular** (citoplasma).

En el plasma celular de una célula individual (Fig. 4.5) se encuentran entre 50 000 y 100 000 moléculas de las enzimas más importantes de la degradación de la glucosa (glucólisis) (véase Cap. 1). Sus pequeños sustratos y productos pueden cruzar relativamente rápido el citoplasma en el camino desde una enzima a las otras. Sin embargo, las distancias mínimas para nuestros conceptos a menudo se convierten en el auténtico obstáculo para las reacciones del metabolismo. Los activadores o inhibidores de las enzimas y las enzimas de otras rutas del metabolismo podrían afectar ligeramente las reacciones.

Las enzimas altamente organizadas evitan estas alteraciones y aumentan su efectividad uniéndose y formando complejos. Estas estructuras, compuestas generalmente de muchas enzimas diferentes, se describen como **sistemas multienzimáticos.**

El bioquímico alemán y ganador del premio Nobel **Feodor Lynen** (1911-1979) investigó durante mucho tiempo el mecanismo de síntesis de los ácidos grasos en la célula. Descubrió que las enzimas de la síntesis de los ácidos grasos se unen en un gran sistema multienzimático. En las levaduras, este complejo de la sintasa del ácido graso consta de siete enzimas diferentes, firmemente acopladas unas con otras. En estos sistemas multienzimáticos, las separaciones en el espacio son mínimas. El sustrato pasa de mano en mano, permanece en un ciclo

cerrado y abandona el sistema si está disponible como producto final. Así se evitan los efectos de difusión.

Los primeros microscopios electrónicos mostraron que una célula de un ser vivo superior (**célula eucariota**) no es un saco muy grande donde todos los componentes están moviéndose en confusión. Más bien recorren una red de canales y membranas. La Figura 4.8 muestra cómo es el "relleno" de una célula (aquí una célula eucariota).

La célula eucariota es como una fábrica separada en diferentes espacios de función o **compartimentos**. Las paredes, tuberías y cables están formadas de **membranas** (Fig. 4.5), que también separan los departamentos especiales: el "centro de control" en el núcleo celular, la "fuerza motriz" en las mitocondrias, los ribosomas donde se produce proteína... Así como en una fábrica las máquinas y los especialistas se encuentran sólo en determinadas zonas de trabajo, en la célula las distintas enzimas están separadas en departamentos completamente distintos. Aquí y allá tienen lugar procesos incompatibles, fuertemente separados unos de otros, en diferentes espacios. Los ácidos grasos, por ejemplo, se forman en el plasma celular, y en cambio –separados por membranas– se degradan en las mitocondrias.

Además, las membranas no sólo son barreras para las enzimas, sino que además permiten acumular sustratos en determinados lugares en cantidades mayores, acoplar reacciones enzimáticas, ordenarlas y organizarlas en el espacio. Cada vez cobran más fuerza las observaciones de que muchas enzimas, por no decir todas las principales de la célula, no están libres sino que están disponibles unidas a diferentes estructuras. Una parte significativa de las enzimas "nada" en los lípidos de las membranas.

La célula tiene dos posibilidades principales para regular el metabolismo con la ayuda de las enzimas.

La **adaptación táctica** empieza con las enzimas ya existentes. Se activa o inhibe (inhibición) mediante cambios químicos y físicos. Todos estos procesos tienen en común que reaccionan muy rápido y en condiciones cambiantes a corto plazo, a menudo en fracciones de segundo.

Por el contrario, la **adaptación estratégica** tiene lugar como respuesta a las condiciones de vida generalmente cambiantes, y se produce mediante el "aparato genético".

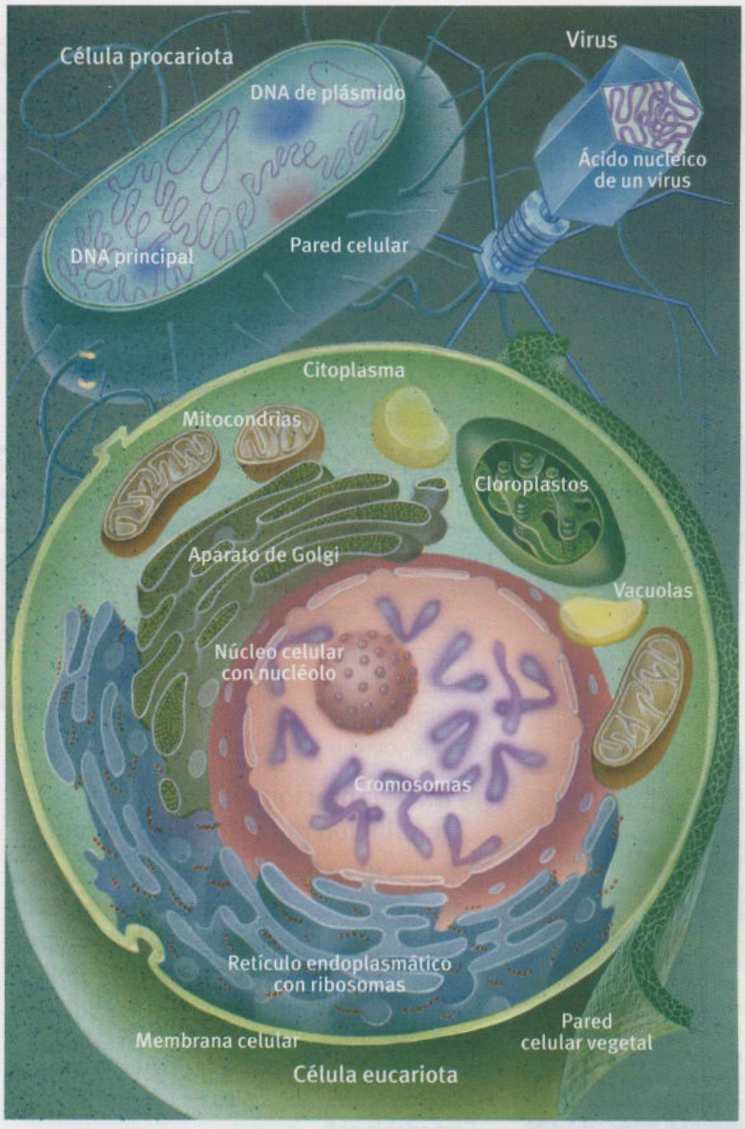


Fig. 4.5 Las células eucariotas (abajo, combinadas células de plantas y animales), las células procariotas (arriba a la izquierda) y los virus (aquí un bacteriófago).

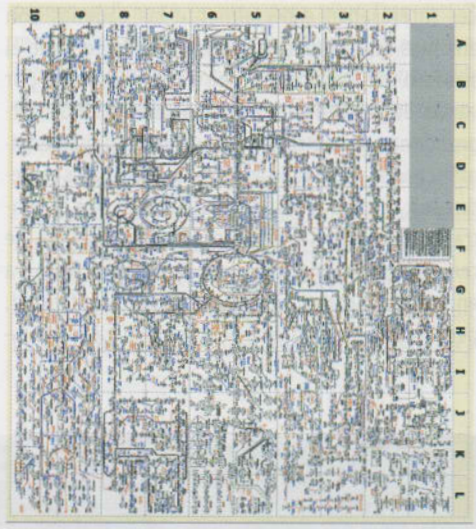
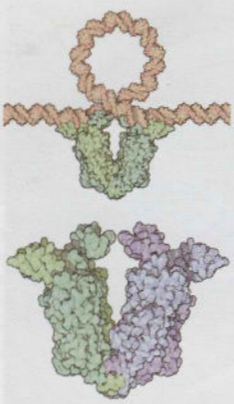


Fig. 4.6 Una fascinante impresión conjunta: el plano de la ciudad de una célula. Tomado de un conocido mapa metabólico (*Metabolic pathway*) de Gerhard Michal (Boehringer-Mannheim, ahora Roche) que muestra todas las enzimas, sustratos, cofactores, interconexiones y retroacoplamientos conocidos.



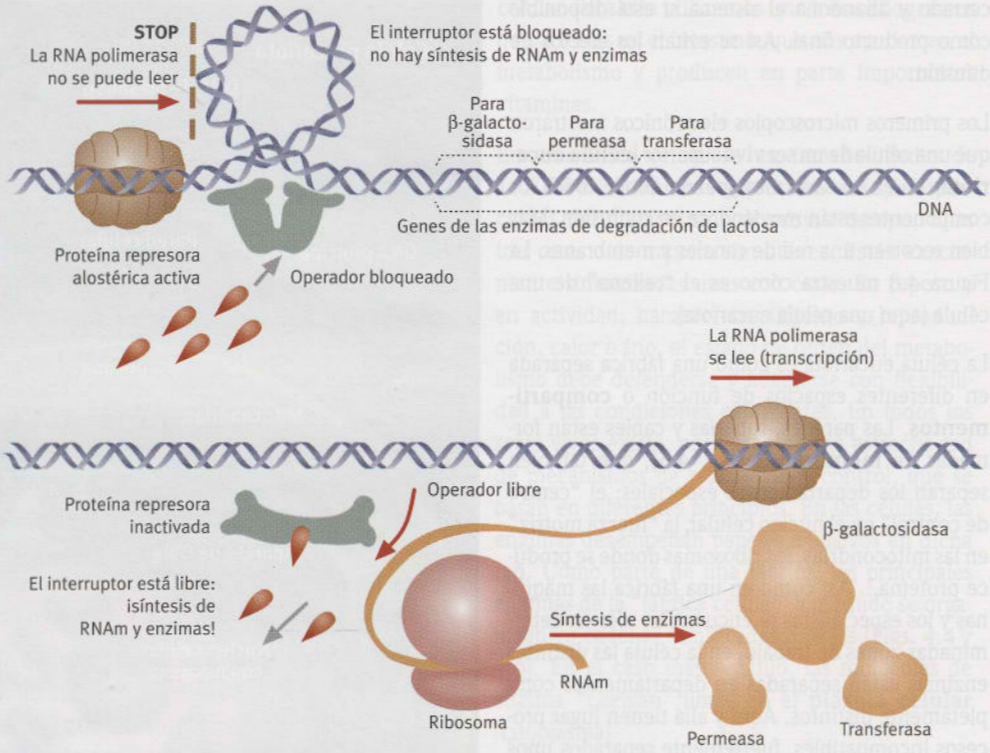


Fig. 4.7 Inducción de la enzima degradadora de lactosa en una célula de bacteria mediante lactosa (o el auténtico inductor alolactosa) (derecha). El represor lac se une a la región operador del DNA (abajo).

Fig. 4.8 Abajo: corte panorámico de una célula eucariota. Izquierda: visión general del corte.
Derecha: el panorama empieza a la izquierda en la superficie de la célula y transcurre a través de una parte del citoplasma. En el retículo endoplasmático se muestran los ribosomas en la síntesis de proteínas. Luego sigue el aparato de Golgi y una vesícula. En el centro se ve una mitocondria. A la derecha el núcleo celular. Se muestran todas las macromoléculas: las proteínas en azul, el DNA y el RNA en rojo y naranja, los lípidos en amarillo, los hidratos de carbono (azúcar) en verde. Los ribosomas compuestos por RNA y proteínas se destacan en magenta-rojo. En las células reales se rellenan los espacios entre las macromoléculas con pequeñas moléculas, iones y agua.



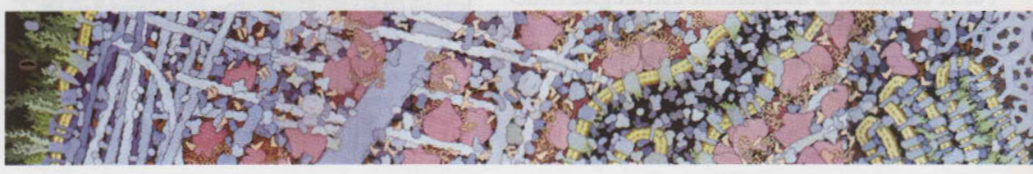
4.2 Adaptación táctica: regulación por retroacoplamiento

"¡Eureka! He descubierto el segundo secreto de la vida…", gritó el profesor **Jacques Monod** (1910-1976) (Fig. 4.3) con entusiasmo tras dos décadas de trabajo de investigación en el parisino Instituto Pasteur. Desde mediados de los años 1950, diferentes grupos de investigación estudiaron el principio de la regulación metabólica en los "animales domésticos" del bioquímico: la bacteria intestinal *Escherichia coli*.

Les interesaban especialmente las cadenas con enzimas unidas unas tras otras, que hacen que el sustrato de partida se convierta, pasando por varias etapas, en los productos finales. Fue sorprendente el control exacto de las cadenas enzimáticas: ¡si se añaden los productos finales sintetizados, se para enseguida su síntesis! Por el contrario, el producto final no paraba la cadena de reacción si se calentaba con cuidado la primera enzima de la cadena. Seguía mostrando actividad, pero indudablemente se destruía el lugar de parada de la enzima. ¿Cómo podía, sin embargo, el producto final de la cadena parar la primera enzima? Se propuso que podía haber una competencia por la enzima entre el sustrato y el producto final, porque no había ninguna similitud entre ambos.

Monod dedujo, tras otros experimentos, que el "interruptor" debía ser otro lugar de unión espacial (estérico) separado del centro activo. El efecto conjunto se bautizó como **alosterismo** (del griego *allos*: otro, diferente).

Este segundo centro alostérico influenciaba de alguna manera al centro activo. Justo en esa época se conoció el experimento del análisis estructural por rayos X de la hemoglobina realizado por **John Kendrew** (nacido en 1917, premio Nobel en 1962 junto con **Max Perutz**). En un principio no parecieron estar muy interesados en la solución del problema del alosterismo, pero demostraron que la misma molécula de hemoglobina cambiaba de forma si en una de sus cuatro subunidades se unía una molécula de oxígeno (Fig. 4.2).



¡Ésa era la solución! El plegamiento final para una enzima alostérica se demostró oficialmente: la unión de un inhibidor en el centro alostérico modificó la estructura espacial completa de la enzima, y con ello la forma del centro activo, de modo que no se podía convertir más el sustrato. En cambio, los activadores debían, tras la unión al centro alostérico de la enzima, mover su centro activo a la estructura espacial óptima.

En realidad, todas las **enzimas alostéricas** están formadas por varias subunidades. Cada una de ellas ocupa principalmente un centro activo y uno o más centros alostéricos. Las subunidades están, por lo tanto, tan estrechamente unidas entre sí que la unión de una única molécula inhibidora alostérica no sólo modifica la estructura espacial y la actividad de la subunidad unida, sino que al mismo tiempo también inhibe las otras subunidades. Esta cooperatividad de las subunidades potencia la acción reguladora de los inhibidores (o activadores).

Las **enzimas reguladoras alostéricas** pueden controlar mediante señales muy débiles (inhibidores o activadores) y causar una fuerte acción en la célula. Por eso están colocadas en las posiciones clave del metabolismo. A menudo basta una única **"enzima controladora" alostérica** (*pace maker enzyme*) al inicio de una ruta metabólica para regular la velocidad de la ruta entera. Un ejemplo biotecnológico importante es la síntesis de glutamina en bacterias (Sección 4.4). Si el producto final en una cadena metabólica se acumula en gran cantidad, se produce un **efecto de retroacoplamiento negativo** (*negative feedback*).

El producto final actúa a distancia, se une alostéricamente a la enzima controladora de la cadena, lo inhibe y detiene así el flujo conjunto. Los productos intermedios y el producto final dejan de producirse. El sustrato de partida puede utilizarse para otros fines, hasta la degradación del exceso mediante transporte de salida o la utilización del producto final.

No sólo las enzimas sino también otras proteínas pueden regularse según el principio del alosterismo. Como describió Monod, pueden "interaccionar entre los enlaces sin afectar por otro lado la afinidad química (fuerza de unión), y con ello regular el flujo de materia y de energía a través del sistema conjunto, mientras necesitan muy poca energía por sí mismas". Monod y Jacob compartieron el premio Nobel de medicina en el año 1965 con **André Lwoff**.

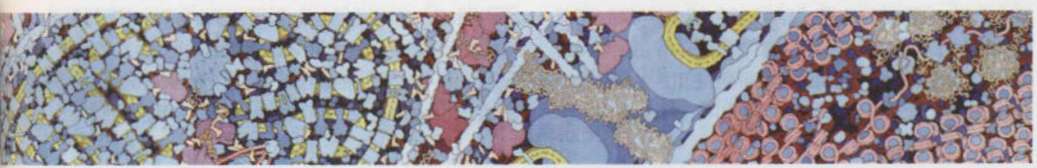
Veremos cómo el represor lac y la síntesis de glutamina se regulan alostéricamente.

4.3 Adaptación estratégica: producción de enzimas a demanda

Todas las células de un organismo llevan en su núcleo, encerrada en el DNA, la misma composición completa de información genética. Una célula nerviosa o intestinal altamente especializada no necesita, sin embargo, el programa genético conjunto. Al contrario, la unión de acetilcolina esterasa mediante una célula intestinal no tendría sentido y hasta podría ser mortal la formación de enzimas de la digestión en una célula nerviosa. Una parte de la información almacenada es, por lo tanto, sofocada y bloqueada según el tipo celular en diferente medida. Sin embargo, debe haber también mecanismos de control y de información que decidan qué información debe liberarse para ser leída en el momento justo y en el lugar adecuado.

Jacques Monod y su colega **François Jacob** (nacido en 1920) se dedicaron a esta cuestión desde principios de los años 1950. Colocaron bacterias que estaban en un medio con glucosa, su alimento preferido, en otro que sólo contenía azúcar de la leche (lactosa). Repentinamente se paró su crecimiento. No pudieron utilizar lactosa, pues sus células no poseen suficiente enzima para ello. Tras casi 20 minutos de reposo empezó un crecimiento tempestuoso. Entonces las bacterias habían conseguido, obviamente, utilizar la lactosa mediante enzimas.

El fenómeno se conocía desde la década de 1930 como **inducción**. Ya entonces se sospechó que hay dos categorías de enzimas en la célula: **enzimas constitutivas** y enzimas **inducibles**. Las constitutivas son las enzimas más importantes del metabolismo y pertenecen de manera ininterrumpida y continua a la célula, en su constitución, y se



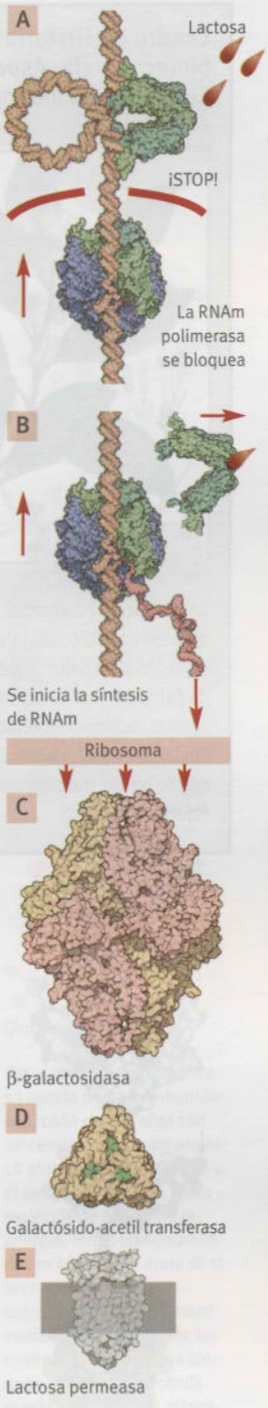


Fig. 4.9 Procesos en la inducción de lac (arriba). La estructura molecular de tres enzimas degradadoras de lactosa (abajo). La β-galactosidasa cataliza la degradación de lactosa a los azúcares sencillos glucosa y galactosa. La galactósido-acetil transferasa es una segunda enzima. La lactosa permeasa es una proteína en la membrana de la bacteria, que transporta lactosa al interior de la célula.

Cuadro 4.1 Historia de la biotecnología: *Aspergillus niger* – El final de un monopolio italiano



La producción comercial de ácido cítrico empezó en 1826 con John y Edward Sturge en la zona del Selby inglés. Como sustancia de partida se usó el zumo de limón de los cítricos italianos importados (limones y limas). De ellos se obtenía citrato cálcico, que se puede transformar fácilmente en ácido cítrico.

Italia conquistó muy rápido el monopolio de la producción, y los precios subieron. Cuando, sin embargo, durante la Primera Guerra Mundial, Italia descuidó sus campos de cítricos, el ácido cítrico se encareció enormemente. Otros países buscaron alternativas más favorables para su fabricación.

En 1917, **J.N. Currie** publicó en el Journal of Biological Chemistry un artículo que en unos pocos años iba a terminar con el monopolio italiano. Hablaba de una actividad metabólica especial del hongo *Aspergillus niger*. Currie descubrió que *Aspergillus niger* produce mucho más ácido cítrico que otros hongos, y estudió por qué el rendimiento era superior.

La compañía Pfizer Inc., en Nueva York, acometió en 1923, con la ayuda de John Currie, la primera producción al por mayor de ácido cítrico, y siguieron otras instalaciones en Alemania, Checoslovaquia, Gran Bretaña y Bélgica.

El cultivo de *Aspergillus niger* se realizaba en la superficie de un medio líquido. Glucosa, sacarosa y melaza de azúcar de remolacha eran los sustratos.

Cien años tras la fundación de la compañía en Inglaterra, John & E. Sturge (Citric) Ltd., con sede en York, combinaron en 1930 el método de Currie con la producción química convencional de citrato de calcio de zumo de limón. La compañía pasó más tarde a pertenecer a Boehringer Ingelheim o Haarmann & Reimer. Tras la Segunda Guerra Mundial se desarrolló un proceso con cultivo sumergido, que se podía controlar mejor.

En los años 1960 y 1970 se intentó –debido a los bajos precios del aceite– sintetizar ácido cítrico con la ayuda de levaduras (cepas de *Candida*) a partir de fracciones de petróleo. La idea, junto con otra para la producción de una proteína individual, se rechazó por razones poco económicas (véase también Cap. 6, *Single Cell Protein*).

Hoy se siguen utilizando, junto con *Aspergillus niger*, también otras levaduras.

Aun con la mejor voluntad, actualmente no se pueden obtener 800 000 toneladas de ácido cítrico de las frutas cítricas.
¡Para ello se deberían plantar limoneros en toda Italia!

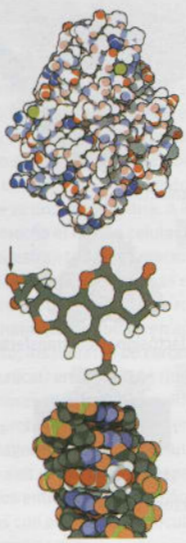


Fig. 4.10 El citocromo P-450 (aquí de la bacteria que utiliza alcanfor *Pseudomonas putida*). La materia exógena se desintoxica mediante aporte de oxígeno. Algunos sustratos, como el benzopireno y la aflatoxina, sin embargo, "intoxican". El epóxido que se muestra aquí (flecha) de la aflatoxina (centro) se une al DNA (abajo) y produce mutaciones y cáncer.

forman en cantidad constante. Las enzimas inducibles se producen sólo en caso de necesidad y su aparición (inducción) se debe a determinadas sustancias. Sirven para adaptarse a condiciones ambientales cambiantes. Su concentración en la célula fluctúa mucho.

Con la lactosa se indujo, en los experimentos comentados, la formación de tres **enzimas degradadoras de lactosa**. Primero se descubrió, en experimentos ingeniosos, que los genes para las tres enzimas se encuentran uno junto a otro en el DNA. Para formar las tres enzimas degradadoras debe haber también tres genes implicados.

¿Cómo puede, sin embargo, una sencilla sustancia como la lactosa "encender" el complicado aparato genético de las células bacterianas? En este punto se cruzaron de pronto la clara idea de Monod del alosterismo con el enigma sin resolver de la inducción. La solución era fácil y genial: el **inductor** se debía asociar con una proteína alostérica, que bloquea el gen para enzimas degradadoras de lactosa. La proteína represora alostérica se distorsiona entonces espacialmente, se inactiva y libera el DNA. La idea resultó ser satisfactoria, a pesar de que Jacob y Monod no pudieron demostrar experimentalmente ninguna proteína represora. En 1967, **Walter Gilbert** (véase Cap. 3) y **Benno Müller-Hill** lograron aislar esta proteína represora para las enzimas degradadoras de lactosa en forma pura. Cada célula contiene sólo unas pocas moléculas de represor. Con ello se confirmó experimentalmente la hipótesis de Jacob y Monod, que dos años antes habían recibido el premio Nobel.

Así pues, la inducción mediante lactosa tiene lugar en las bacterias tal como se representa en las Figuras 4.7 y 4.9.

El **represor** es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas (Fig. 4.7). Se une fuertemente a una región específica del DNA de la bacteria, el **operador**, que está junto a esa región que codifica para tres enzimas que utilizan lactosa. Si la lactosa y los azúcares similares se unen a la proteína represora, el represor cambia su forma y entonces no se puede fijar más tiempo al DNA. Ahora la RNA polimerasa puede recorrer longitudinalmente el DNA y transcribir el gen: se producen las tres enzimas. Si apenas se produce lactosa, las enzimas degradadoras de lactosa no se utilizan más, el represor lac asu-

me de nuevo su forma de partida y bloquea el DNA otra vez.

Cerca de los genes que codifican las enzimas degradadoras se encuentra, en una sección de DNA, el operador que sirve como interruptor para el gen. El operador se bloquea mediante cuatro subunidades de la proteína represora, que encaja exactamente en la sección del DNA. El represor "dobla" formalmente el DNA y origina un lazo. Con ello la RNA polimerasa ya no puede iniciarse mecanísticamente, puesto que no pueden leerse los tres genes para las enzimas degradadoras de lactosa.

Ahora aparece el **inductor**, en nuestro caso la lactosa. El inductor se une a la proteína represora alostérica activa y modifica su estructura espacial. El sustrato a degradar no debe ser el mismo inductor. El inductor "auténtico" es, aquí, la alolactosa, una **modificación** que se forma al inicio de la inducción de la lactosa y que inactiva al represor. Ahora ya no encaja espacialmente con el operador y se repele –¡por lo tanto el interruptor está libre! Se deshace el lazo del DNA.

La RNA polimerasa ya puede ponerse en movimiento (Fig. 4.9). Transcribe la información de los tres genes en un fragmento largo de RNAm, que enseguida es leído en los ribosomas. Ahora se producen una tras otra las tres enzimas. Las enzimas acabadas de formar aceleran la captura y la utilización de lactosa, con lo cual entran a raudales más moléculas inductoras en la célula. En un tiempo relativamente más corto la célula bacteriana ha formado suficiente enzima para poder alimentarse de lactosa.

Si las bacterias en esta situación se colocan en un medio de glucosa pura, se desprende repentinamente el inductor (o sea la lactosa o la alolactosa). La proteína represora inactivada por el inductor cambia de nuevo a su forma activa, se une al operador y detiene el trabajo de la RNA polimerasa y la síntesis de las tres enzimas degradadoras de lactosa. Las enzimas de la utilización de lactosa aún existentes en la célula son entonces superfluas y por lo tanto se degradan. Dicho brevemente: en la inducción, el inductor solamente anula la inhibición de la síntesis de enzimas. Se trata, pues, de un **control negativo**.

Con la ayuda de este mecanismo, la célula puede imponer completamente su régimen de ahorro. Sería pues también poco económico si una bacteria produjese constantemente diferentes enzimas para todos los cambios en la vida.

Otro mecanismo, la **represión**, impide que sencillamente continúe la producción, a pesar de que se encuentren montañas enormes de producto acabado "frente a la puerta".

En los seres vivos superiores, la inducción y la represión se regulan de forma más complicada que en las bacterias, transcurren más lentamente y de forma menos drástica. Además de los alimentos, pueden trabajar de modo inducido también las hormonas propias del cuerpo y las materias exógenas. Un ejemplo en los humanos es la **inducción de las enzimas del hígado** mediante fármacos (sistema del citocromo P-450, Fig. 4.10) y alcohol (alcohol y acetaldehído deshidrogenasa, Cap. 1). Como es sabido, la toma constante de somníferos produce la pérdida de sus efectos porque se induce el **sistema del citocromo P-450**. Los somníferos se degradan a moléculas solubles en agua y se "descontaminan". Si ahora, sin embargo, el P-450 inducido entra en contacto con sustancias como el benzo-α-pireno (cigarrillos, carne asada a la parrilla), estos sustratos se convierten en epóxido cancerígeno y tiene lugar entonces una "intoxicación". Lo mismo ocurre con las aflatoxinas (Fig. 4.10). Está claro que la intoxicación es mayor cuanto más fuerte sea la inducción del P-450 (por ejemplo por un abuso de píldoras).

El consumo constante de etanol induce, en cambio, la alcohol deshidrogenasa y la acetaldehído deshidrogenasa del hígado. Por un lado se tolera más alcohol, pero también se deben tener en consideración los daños al hígado.

4.4 Un ordenador molecular alostérico: la glutamina sintetasa

Nuestro cuerpo debe poder reaccionar frente a diferentes alimentos y tener preparadas las enzimas correspondientes, de igual manera que las bacterias. Sin embargo, a menudo éstas (a diferencia de nosotros) no tienen elección: deben tomar alimento allí donde se encuentran, tomando lo que haya y luego movilizando las enzimas correspondientes.

La **glutamina sintetasa** (GS) es una enzima clave en el control del nitrógeno en la célula (Fig. 4.11). La glutamina es como aminoácido no sólo un componente de las proteínas, sino que entrega también átomos de nitrógeno a enzimas que sintetizan las bases del DNA y los aminoácidos. Por lo tanto, la GS debe ser cuidadosamente controlada: debe conectarse en caso de necesidad de nitrógeno, de modo que la célula no se muera de hambre, pero cuando hay suficiente nitrógeno debe desconectarse para evitar un "exceso de incorporación".

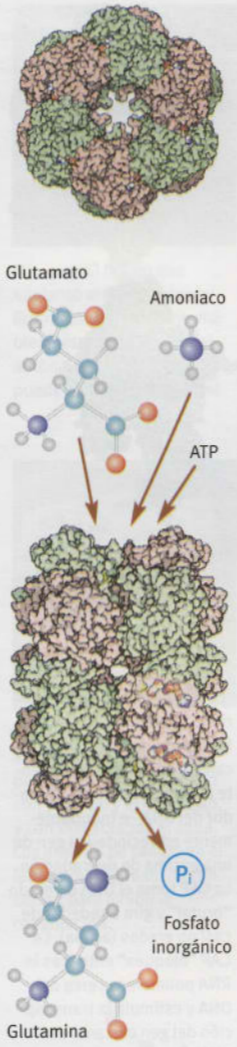


Fig. 4.11 La glutamina sintasa consta de doce subunidades, cada una de ellas con un centro activo, para producir glutamina. El glutamato y el amoniaco se unen, y una molécula de ATP libera la energía. Todas las subunidades se comunican entre sí: si la concentración de los correspondientes sustratos aumenta, la actividad de las enzimas en conjunto se bloquea más y más. La célula puede, sin embargo, relajarse enseguida digamos "apretando el botón" de la enzima conjunta, y entonces un grupo tirosina en el centro activo se une a una molécula de AMP y con ello se bloquea completamente su acción.

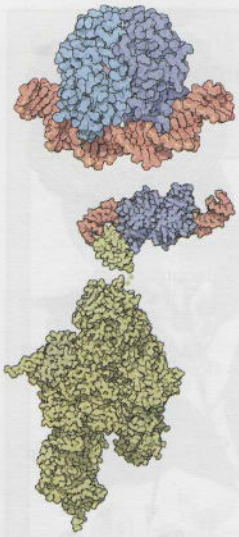


Fig. 4.12 La proteína activadora de catabolitos (*Catabolite Activator Protein*, CAP) "pesca" entre los genes y deja trabajar fácilmente a la polimerasa. Si se une AMPc (púrpura en la imagen superior), la CAP modifica su conformación de forma insignificante y se une perfectamente al correspondiente operador del DNA –e indudablemente en vecindad al gen de una enzima de degradación. La CAP toma el DNA de modo "brutal" y gira alrededor de casi 90 grados (arriba). La CAP "bloquea" entonces la RNA polimerasa cerca del DNA y estimula la transcripción del gen cercano. La RNA polimerasa (amarillo) tiene una pequeña subunidad que interacciona con la CAP y el DNA (casi como una caña de pescar). La imagen muestra cómo se une la mitad de la subunidad de la polimerasa al DNA (rojo) y a la CAP (azul). Las dos mitades de esta subunidad están conectadas por un brazo flexible. La RNA polimerasa "pesca" activamente el gen deseado.

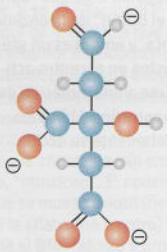


Fig. 4.13 Ácido cítrico.

La GS actúa como un ordenador molecular en el cual se registra el contenido de moléculas ricas en nitrógeno: aminoácidos como la glicina, la alanina, la histidina y el triptófano, y nucleótidos como el monofosfato de adenosina (AMP) y el trifosfato de citidina (CTP). Cuando hay demasiada cantidad de ellos, la GS "lo nota" e interrumpe ligeramente la producción. Pero si aumenta drásticamente el nivel, los productos finales de la GS disminuyen cada vez más y más. La enzima se detiene si hay suficiente cantidad de todas estas sustancias.

La glutamina sintetasa está sujeta, en conjunto, al denominado **"retroacoplamiento acumulativo"**: los ocho productos finales pueden inhibir la enzima. Cada inhibidor puede inhibir adicionalmente la actividad enzimática, incluso si están unidos otros inhibidores ya en cantidad saturante.

El aminoácido glutamina es una importante fuente de alimentación en los cultivos celulares animales. Se incorpora a las bebidas deportivas porque suministra energía. Junto con la arginina, es apreciada por los culturistas.

4.5 Represión de catabolitos o cómo se pesca una polimerasa

A las bacterias les gusta lo dulce, particularmente la glucosa. La pueden digerir fácilmente y convertirla en energía química. Si la glucosa se encuentra en exceso, las bacterias suelen ignorar otras fuentes de carbono.

Las bacterias utilizan una modificación poco común del ATP para que la maquinaria celular sepa lo que toma exactamente: si la cantidad de glucosa cae, se activa una enzima unida a la membrana como "sensor de glucosa", la **adenilato ciclasa**. Ésta fragmenta dos restos de fosfato del ATP y comparte los extremos libres en una molécula pequeña, el **AMP cíclico (AMPc)**. El AMP cíclico se describe como segundo mensajero.

Las reacciones que suministran energía a la célula se denominan reacciones catabólicas o **catabolismo**. Las contrarias, las reacciones que utilizan energía, se llaman **anabolismo**.

La **proteína activadora de catabolitos** (*Catabolite Activator Protein, CAP*) (Fig. 4.12) se activa mediante AMPc y estimula enzimas que degradan alimentos distintos de la glucosa. Si se une al AMPc, la CAP cambia su configuración de manera insignificante y se une perfectamente al operador del DNA –en concreto cerca del gen de una enzima degradadora. La figura muestra cómo la RNA polimerasa "pesca" activamente el gen deseado.

En *E. coli* hay un gran número de CAP que se fijan a promotores para numerosas enzimas del metabolismo catabólico. Mientras *E. coli* crece en glucosa, la concentración de AMPc permanece pequeña y casi no se producen las otras enzimas para la degradación de azúcar. ¡Sintetizarlas sería un puro desperdicio! Pero si falla la glucosa y con ella aparecen otros azúcares, la célula cambia.

La denominada **represión de catabolitos** es positiva, por el contrario, para una inducción de lactosa negativa: el complejo de AMPc y CAP incrementa la lectura del DNA mediante la polimerasa aproximadamente 50 veces. En el operón lac, la expresión genética de las enzimas de degradación y de transporte de lactosa es entonces la más potente, si la lactosa o la alolactosa han suprimido la inhibición mediante el represor lac y al mismo tiempo la unión de la RNA polimerasa al complejo CAP-AMPc.

4.6 ¡Mohos en lugar de limones!

Nada menos que **Justus von Liebig** (Cap. 1) fue quien determinó en 1838 la estructura del ácido cítrico. En 1893, el microbiólogo **C. Wehmer**, en la Universidad de Hannover, observó que los mohos ceden citrato (estructura en Fig. 4.13) al medio durante su crecimiento, a partir de azúcar.

La necesidad de ácido cítrico aumentó tras la Primera Guerra Mundial, y la producción por microbios fue una auténtica alternativa al complejo aislamiento a partir de frutas cítricas y al encarecimiento de la importación de fruta (Cuadro 4.1). La búsqueda intensiva de los mejores formadores de ácido cítrico condujo finalmente al **moho con esporangios negros en forma de regadera** (*Aspergillus niger*), también denominado moho negro del pan (Fig. 4.14 y Cap. 1, Fig. 1.9).

Al principio se observó que el contenido en protones (H^+) o el grado de acidez (valor de pH, el valor negativo del logaritmo en base diez de la concentración de protones) del medio de alimentación tiene una influencia decisiva sobre la productividad del hongo. En medios muy ácidos es preferible eliminar el ácido cítrico de *Aspergillus niger*. La disminución de iones de hierro libres en la disolución de alimentación de 0,5 mg/L produjo un aumento de la producción posterior. Se asume que la enzima degradadora de ácido cítrico aconitasa se inhibe tanto por un pH bajo como por una deficiencia de hierro. No se degrada con ello el ácido cítrico formado. Se sospecha también que, además, con un contenido del medio bajo en protones se producen cambios en la estructura de la membrana de las células de los

mohos, y por lo tanto puede salir ligeramente ácido cítrico fuera de la célula. Un valor de pH bajo inhibe los gérmenes indeseados remanentes en la fermentación.

Añadiendo "sales alcalinas amarillas en sangre" (hexacianoferrato de potasio) a la disolución de fermentación se unen a los iones de hierro. Se forma el "azul de Berlín" poco soluble. Azul es también el color de los residuos de las fábricas de ácido cítrico.

Los procedimientos industriales para obtener ácido cítrico acabaron, en los años 1920, con la existencia de muchos campesinos italianos que vivían de sus campos de limoneros –un efecto social negativo de la biotecnología (Cuadro 4.1).

Hoy se obtiene en las instalaciones de biorreactores con agitación, o en torres de 100 a 500 m^3 de acero inoxidable, el 85% de la materia prima para producir ácido cítrico. Debe utilizarse acero inoxidable exento de corrosión, pues la disolución es fuertemente ácida. El ácido cítrico generado es químicamente idéntico al producto natural de las frutas cítricas. Se utiliza por su sabor afrutado en caramelos, limonadas, mermeladas y otros alimentos. El ácido cítrico es también un posible sustituto de los polifosfatos en detergentes y lavavajillas (Fig. 4.15), que afectan al medio ambiente, porque forman complejos con calcio y magnesio. Puesto que se une a los metales pesados, el ácido cítrico también se utiliza en medicina de urgencias para tratar intoxicaciones.

En todo el mundo se generan cada año unas 800 000 toneladas de ácido cítrico casi exclusivamente de microbios, con un valor en el mercado de cerca de 800 millones de dólares americanos. Las cepas de producción de *Aspergillus* son, por cierto, el tesoro mejor protegido de la industria de la fermentación.

En otro lugar de este libro se habla detalladamente de las posibilidades de las células como fábricas sintéticas y de la gran diversidad de sustancias, de su producción y utilización (Cap. 1 y 2).

Sin embargo, directamente conectada con el ciclo de Krebs (o del citrato) se encuentra la síntesis de aminoácidos.

4.7 Lisina en abundancia: la retroinhibición de la aspartato quinasa se burla con mutantes

La lisina es uno de los **ocho aminoácidos esenciales** (Fig. 4.17 mapa, 4.16 y 4.18 estructuras) que los humanos y muchos animales no pueden sintetizar y, por lo tanto, deben tomar de los alimentos: fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), triptófano (Trp), metionina (Met), leucina (Leu), valina (Val), lisina (Lys) y treonina (Thr).

Juntamente con la metionina y la treonina, la lisina es muy importante porque estos aminoácidos apenas se encuentran en los cereales (trigo, maíz, arroz). En el pienso, esto tiene un papel decisivo.

En el año 2001 se produjeron 550 000 toneladas de lisina, principalmente como aditivo para pienso. La lisina se utiliza también en alimentación humana.

Como productor de lisina se encontró *Corynebacterium* (Fig. 4.23). Tiene forma de mazo (en griego *koryne*, mazo). En primer lugar, se debía vencer una inhibición enzimática mediante retroacoplamiento (**inhibición *feedback***) en la producción del aminoácido lisina por *Corynebacterium glutamicum*.

En las cepas salvajes se forma lisina a partir del oxalacetato del ciclo de Krebs con piruvato por el aspartato mediante una cadena ramificada de reacciones enzimáticas, que empieza con la reacción que utiliza ATP de la enzima controladora alostérica **aspartato quinasa** y se originan después los aminoácidos treonina y metionina (Fig. 4.21). Las reacciones enzimáticas se controlan mediante inhibición *feedback*: la actividad de la aspartato quinasa se inhibe por exceso de los productos lisina y treo-



Fig. 4.14 El hongo que suplantó al limón, *Aspergillus niger*, se reprodujo visiblemente sobre el pan del autor. Cuidado: itambién puede formar micotoxinas!



Fig. 4.15 El ácido cítrico se añadió a los detergentes porque forma un complejo con el calcio y el magnesio, y con ello ablanda el agua. Los análisis de sangre en el laboratorio se realizan con citrato para inhibir la coagulación.

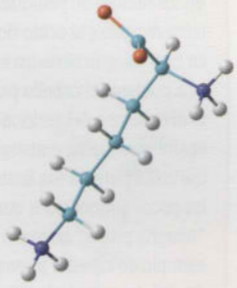


Fig. 4.16 Lisina (Lys), un aminoácido esencial decisivo para el pienso.

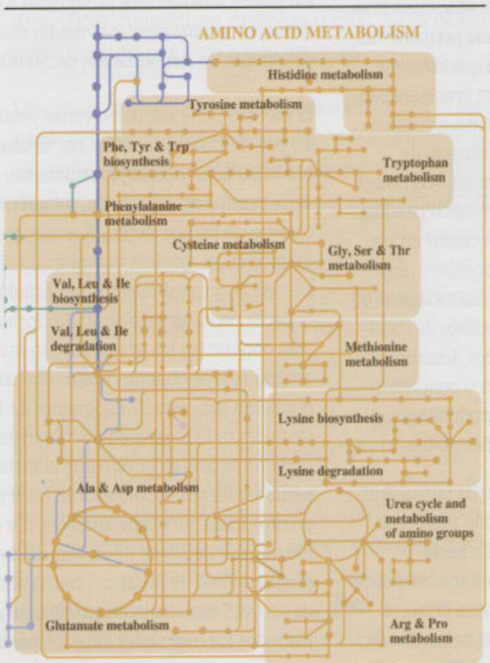
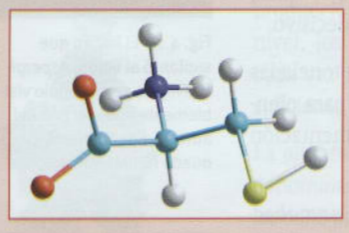


Fig. 4.17 Mapa fino del metabolismo de los aminoácidos (véase también Fig. 4.4).

Cuadro 4.2 Opiniones de expertos: La cisteína de buena calidad no se obtendrá más del cabello

Lo que hace tan único al aminoácido cisteína es el contenido de azufre del grupo sulfhidrilo, que es químicamente muy reactivo.



Así se pueden formar puentes disulfuro, que contribuyen a la estabilidad de las proteínas. Con ello se originan, por ejemplo, las hebras fibrosas estables del cabello, la lana y las plumas, y también de las uñas, las pezuñas y los cuernos. Su proteína (queratina) contiene cisteína en gran cantidad.

Los panaderos añaden cisteína a los ingredientes básicos del pan para descomponer el gluten unido a la harina. La masa se amasa entonces más fácilmente. En la elevada reactividad de la cisteína y sus derivados, como la acetilcisteína, se basan también los jarabes contra la tos: la acetilcisteína rompe las mucoproteínas de la mucosidad bronquial y >licua la secreción espesa.

En los salones de peluquería japoneses la cisteína remplaza al ácido tioglicólico habitual en Europa, que tiene un fuerte olor, cuando se va a preparar el cabello para una permanente. El diverso uso del aminoácido que contiene azufre genera, sin embargo, un problema contrario. La cisteína fue hasta hace poco uno de los pocos aminoácidos que se obtenía de "materia prima" animal o humana –como por ejemplo de cabello, plumas, cerdas o pezuñas. En Asia hay una industria floreciente: en las peluquerías de China, los recogedores profesionales barren cada año diez mil toneladas de cabello y lo llevan a los productores de cisteína, que extraen los aminoácidos deseados con carbón activo y ácido clorhídrico concentrado. Una tonelada de cabello produce aproximadamente 100 kilogramos de cisteína.

Si se considera que las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentación requieren actualmente en todo el mundo hasta 4000 toneladas de cisteína por año, se puede calcular qué cantidad de materia prima se necesita. Anualmente crece la demanda en cerca de un cuatro por ciento. Sin embargo, conseguir una mayor eficiencia y que no fuera contaminante fue más de una vez el motivo más importante para buscar un método de producción alternativo.

Era aún más importante para muchas aplicaciones la calidad del producto final en la industria farmacéutica. Para la industria farmacéutica es decisivo poder descartar contaminaciones peligrosas –como las causantes de la encefalitis espongiforme bovina, el síndrome respiratorio agudo grave o la gripe aviar. En los procedimientos biotecnológicos se descartan tales contaminaciones desde el comienzo.



El autor en su peluquería china. Uno se siente como un proveedor de materia prima si se sabe para qué sirven los cabellos.

Los investigadores de la compañía Wacker consiguieron, mediante una mutación y una selección dirigida, desconectar la proteína reguladora que normalmente obtura la producción de cisteína en *E. coli*. Las bacterias fabrican, por consiguiente, cisteína "como en una cinta transportadora", y pasan el exceso de aminoácidos producidos a través de su membrana celular al medio nutriente del tanque de fermentación de 50 000 litros.

El método tiene asimismo varias ventajas: el 90 por ciento de la cisteína bacteriana llega al producto final. Con el procedimiento clásico de la extracción del cabello, solamente se obtiene un 60 por ciento. Además, para la extracción se requiere menos ácido clorhídrico: con los procedimientos biotecnológicos se necesita un kilogramo de ácido clorhídrico para obtener un kilogramo de cisteína. Por el contrario, si se obtiene cisteína del cabello, se requieren para ello 27 kilogramos de ácido clorhídrico. El bioprocedimiento evita impurezas no deseadas: puesto que la materia de partida utilizada es sólo azúcar, sales y elementos traza, no puede aparecer, por ejemplo, ningún causante de enfermedad en el producto final. El producto consta al menos de un 98,5 por ciento de cisteína pura y cumple todos los estándares exigidos por la industria alimentaria y farmacéutica. Además, la cisteína es ideal para alimentos vegetarianos, por ejemplo si se quieren generar aromas de carne artificiales. Concretamente se une cisteína con azúcar, por ejemplo ribosa, y se desarrolla así por calefacción la materia aromática, que sabe a carne. En este caso se produce un aroma natural, que también aparece al asar por ejemplo un pollo, en el cual la cisteína existente reacciona de forma natural con el azúcar de la carne hasta una típica molécula aromática (reacción de Maillard).



Biorreactor con la cepa de *E. coli* productora de cisteína.

Tras el proceso se produjeron en el año 2004 más de 500 toneladas de cisteína –más de un octavo de las necesidades mundiales. Las proporciones de crecimiento anuales para la cisteína producida biotecnológicamente se encuentran por encima de un diez por ciento.



El gatito Mao-jai está entusiasmado con la cisteína de la permanente y grita: "¡sabroso!".

Sin embargo, los recogedores de cabello asiáticos no perderán su trabajo: todavía se extraen más de mil toneladas de cisteína por año según el método convencional –aunque se pospone cada vez más su participación en el mercado. Los compradores, que sólo están interesados en los precios más bajos y no en el origen de la mercancía, son por ejemplo los fabricantes de pienso para perros o gatos, que quieren "ennoblecer" sus productos con aromas de carne. Los mercados de este tipo seguramente seguirán usando durante mucho tiempo los procedimientos de producción antiguos.



El Dr. Christoph Winterhalter es director del proyecto para la cisteína en WACKER FINE CHEMICALS

nina. Ambas deben unirse a la aspartato quinasa para bloquearla.

Si se origina más lisina y treonina de lo que requiere la célula, se inhibe la aspartato quinasa; y al revés, si hay deficiencia de lisina y treonina, aumenta la síntesis. En la naturaleza esto es muy significativo, ¡pero nosotros queremos tener lisina en exceso! Hay pocas probabilidades de que las bacterias realicen una formación de lisina notable, salvo que se burle su regulación desconectando el mecanismo de control alostérico.

Se buscaron y encontraron dos **mutantes deficientes** de la bacteria. Una es deficiente en treonina (thr-) (Fig. 4.21). La enzima **homoserina deshidrogenasa** se inactiva por una mutación espontánea. La treonina –una de las dos sustancias inhibidoras de la aspartato quinasa– ya no se forma. Si ahora se colocan estas mutantes en un medio al que se ha añadido treonina artificial, que garantiza el buen crecimiento celular, pero con muy poca treonina, para cooperar en la desconexión de la aspartato quinasa (moraleja: "poco para vivir, demasiado para morir"), ¡entonces la producción de lisina funciona a toda máquina!

En la otra mutante se cambia el propio gen de la aspartato quinasa. La enzima, ligeramente modificada en su estructura, no se deja ya inhibir por la lisina –incluso con un enorme exceso.

La producción de lisina es un buen ejemplo de proceso industrial que fue posible gracias al conocimiento de las reacciones enzimáticas y una selección racional de mutantes. Tanto las mutantes de *Corynebacterium glutamicum* como las de *Brevibacterium flavum* convierten en lisina más de un tercio del azúcar aportado al medio, y logran con ello concentraciones de 120 gramos de lisina por cada litro de medio en 60 horas en biorreactores de 500 m^3.

Hoy se investiga para la ***ingeniería metabólica*** el desarrollo de cepas con la ayuda de la ingeniería genética. El grupo de investigación de **Alfred Pühler,** en la Universidad de Bielefeld, y los grandes productores de aminoácidos, están descifrando las 3,3 megabases del gran genoma de *Corynebacterium glutamicum* (Fig. 4.23).

La también esencial **metionina** tiene una posición especial entre los aminoácidos, pues la D-metionina puede convertirse en L-metionina en el cuerpo. Es posible, por lo tanto, producir metionina pura químicamente (de acroleína, metanotiol y ácido cianhídrico) como racemato (mezcla de D y L) (véase sección 4.9). En el año 2001 se produjeron así 370 000 toneladas de metionina.

Se sintetizan 30 000 toneladas al año de **L-treonina,** principalmente a partir de mutantes de alto rendimiento de *Escherichia coli* –a una concentración de 80 g/L en sólo 30 horas.

El precio de los tres aminoácidos fluctúa alrededor de 5000 dólares americanos por tonelada, de modo que en conjunto proporcionan un volumen de mercado de más de mil millones de dólares. Sobre todo en China, el crecimiento de este campo es muy dinámico. En un futuro se producirán cada vez más en **plantas transgénicas** (Cap. 7), con una gama de aminoácidos (por ejemplo más aminoácidos esenciales) en competencia con los producidos por fermentación.

4.8 L-glutamato: condimento de sopa "levorrotatorio" en exceso

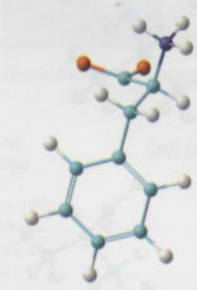
Umami es el quinto sabor que se puede nombrar, junto a los cuatro "de occidente" (amargo, dulce, ácido y salado). Puede describirse como un "condimento" o "sabor fuerte a carne". Procede del Lejano Oriente y era desconocido en Europa Central. La cocina mediterránea utiliza en sus ingredientes, sin embargo, una cantidad aceptable de *umami*.

Tres sustancias diferentes confieren el sabor *umami*: glutamato monosódico (MSG), inosinato disódico (DSI) y guanilato disódico (DSG), pero el glutamato desempeña un papel decisivo.

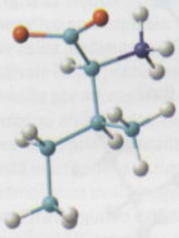
La sustancia que da sabor *umami* en el *Konbu*, el alga marina del Pacífico *Laminaria japonica*, la identificó en 1908 el japonés **Kikunae Ikeda** (1864-1936) (Fig. 4.20) como glutamato. La sal del aminoácido ácido L-glutámico (L-glutamato) (Fig. 4.19) potencia esencialmente el gusto de sopas y salsas. Nuestro cuerpo dispone de receptores de glutamato especiales para el L-glutamato, pero no para el D-glutamato (Fig. 4.26).

El L-glutamato se obtuvo en la década de 1920, y aún hoy se obtiene en parte, del trigo (Cap. 1). La compañía líder fue Ajinomoto Co. (en japonés *Ajino-moto*, esencia del gusto) (Fig. 4.20). La necesidad de glutamato aumentó enormemente tras la Segunda Guerra Mundial con la aparición de comidas preparadas, salsas en polvo y mezclas de condimentos. A principios de los años 1950, el japonés

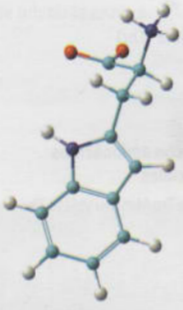
Fig. 4.18 Formas estructurales de los ocho aminoácidos esenciales (véase también pag. 94).



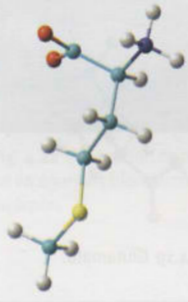
Fenilalanina (Phe)



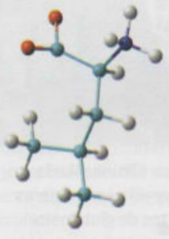
Isoleucina (Ile)



Triptófano (Trp)



Metionina (Met)



Leucina (Leu)

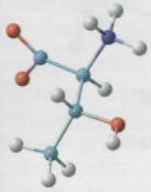
Fig. 4.18 (Continuación)



Valina (Val)



Lisina (Lys)



Treonina (Thr)

Los ocho aminoácidos esenciales

Phe Ile Trp Met Leu Val Lys Thr

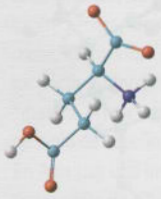


Fig. 4.19 Glutamato.



Fig. 4.20 Kikunae Ikeda (1864-1936) y los primeros productos de glutamato de Ajinomoto Co.

Kinoshita encontró unas bacterias capaces de acumular glutamato si crecían en presencia de glucosa. La bacteria –la conocemos ya como productora de lisina– finalmente se llamó, tras largas discusiones, *Corynebacterium glutamicum*. También se encontraron otros microorganismos productores de glutamato, especialmente de los géneros *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter* y *Microbacterium*.

La producción de glutamato por microorganismos excedió, sobre todo en la bioindustria japonesa y china, los 1,5 millones de toneladas y varios miles de millones de dólares por año.

El glutamato es un buen ejemplo de cómo cambian los conocimientos básicos de las reacciones enzimáticas del metabolismo con las tecnologías de producción: el L-glutamato proviene, como casi todos los 20 aminoácidos que se necesitan para la síntesis de proteínas, de precursores de la degradación de glucosa (glucólisis) y del ciclo de Krebs.

En *Corynebacterium glutamicum*, por causas genéticas, la oxoglutarato deshidrogenasa en el ciclo de Krebs presenta una actividad sumamente baja. Esta enzima es la encargada de una posterior transformación de 2-oxoglutarato en el ciclo de Krebs. Con ello se "obtura" el 2-oxoglutarato. Para que no se acumule demasiado se utiliza otra enzima, que está disponible con una elevada actividad en la célula como "salida" del ciclo de Krebs, la glutamato deshidrogenasa. El 2-oxoglutarato se convierte en L-glutamato al incorporar iones amonio (NH_4^+).

Para formar glutamato, al proceso se le deben proporcionar suficientes iones amonio para la conversión del 2-oxoglutarato. Esto ocurre mediante un "borboteo" de amoniaco gaseoso (NH_3), que en agua se protona al ion NH_4^+.

¿Cómo se logra la sobreproducción de glutamato en la célula en el líquido de cultivo? Destruir las células y aislar el glutamato de los miles de componentes celulares hace el proceso poco rentable. Se debe, pues, forzar a las células vivas para que cedan glutamato al medio.

La cepa de *Corynebacterium* mostró afortunadamente una rareza importante: no puede generar el importante cofactor biotina (una vitamina) para la formación de la membrana celular y, por lo tanto, depende del suministro de biotina en el medio de alimentación. Si el medio (por ejemplo melaza) contiene sólo cantidades mínimas de biotina, por un lado aún es posible el crecimiento celular, pero las paredes celulares se permeabilizan para el glutamato. Otras posibilidades para la liberación de glutamato son pequeños aportes de penicilina (véase más abajo) o el uso de detergentes.

¿Cuánto glutamato se tolera en las comidas? Se dice en Asia que los malos cocineros compensan su deficiencia en el arte con glutamato. Nuevos estudios (doble ciegos) sobre el glutamato y el "síndrome del restaurante chino" (a menudo los no asiáticos presentan alergias fuertes tras degustar la cocina china) indicaron, sin embargo, también un componente psicológico.

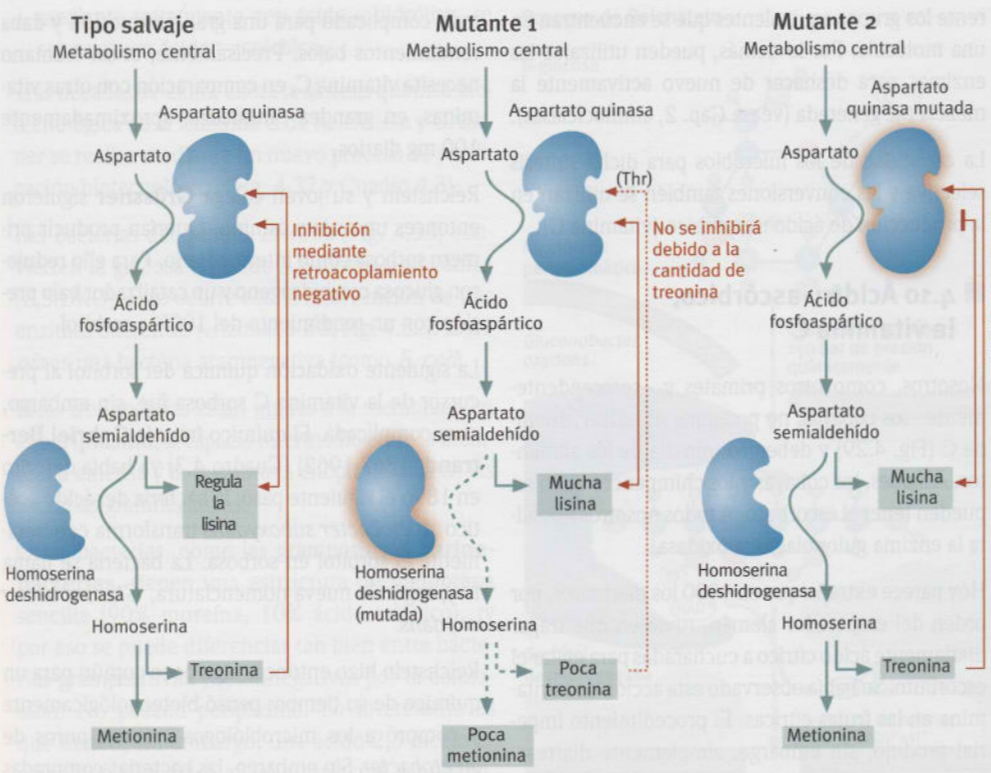
Existe otro aminoácido que cada vez interesa más a la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. Mundialmente se requieren cada año hasta 4000 toneladas de **L-cisteína** (Cuadro 4.2). Se obtenía del pelo, pero la compañía alemana Wacker-Chemie la produce ya por biotecnología con *E. coli*. Mediante mutación dirigida y selección se desconecta la proteína reguladora, que obtura normalmente la producción de cisteína en *E. coli*. Las bacterias fabrican entonces cisteína "como en una cinta transportadora" y transfieren las cantidades producidas de aminoácidos, demasiado altas, a través de su membrana celular hacia la disolución de nutrientes de los tanques de fermentación de 50 000 litros.

4.9 ¿Tienen que ser siempre microbios? La síntesis química contra la fermentación

¿Por qué se sintetiza L-glutamato y L-lisina en microorganismos? ¿No se puede producir de una forma igual de económica por purificación química?

En realidad, en Japón se explotó primero la síntesis química de glutamato a partir de acrilonitrilo con la ayuda de catalizadores de cobaltocarbonilo y la denominada síntesis de Strecker. La lisina se produce químicamente a partir de aminocaprolactama. Los productos eran una mezcla (**racémica**) de dos moléculas imágenes especulares de glutamato o de lisina, igual que nuestra mano derecha e izquierda tienen la misma estructura como imágenes especulares (Fig. 4.26).

Las dos imágenes especulares del glutamato se diferencian por análisis de su desviación óptica (hacia la derecha o hacia la izquierda) y se denominan según la





Corynebacterium glutamicum

Fig. 4.21 Retroacoplamiento negativo en la síntesis de lisina mediante la cepa salvaje de *Corynebacterium* (visión por microscopía electrónica, arriba) y dos mutantes. En el primer mutante está inactivada la enzima homoserina deshidrogenasa. En el segundo está tan cambiada la aspartato quinasa que, a pesar de haber un exceso de lisina, no puede inhibir la enzima.

posición en el espacio del grupo amino como **formas** D y L. Químicamente se forman cantidades iguales de las formas D y L, ¡pero el sabor del condimento se debe sólo al L-glutamato, que gira hacia la izquierda!

Nuestras células gustativas con sus receptores –como una enzima en el centro activo– sólo pueden reconocer una ordenación espacial de la pareja de reacción (igual que enseguida nos damos cuenta de si alguien nos da la mano derecha o la izquierda para saludarnos).

Las proteínas se sintetizan exclusivamente a partir de L-aminoácidos, y por lo tanto la máquina de síntesis de la célula está formada también sólo por la producción de L-aminoácidos. A propósito, se aplica el caso contrario a los azúcares: en los azúcares se forman sólo formas D y se reconoce, pues, por ejemplo la β-D-glucosa (azúcar de uva).

Las causas últimas de estos hechos aún no están claras. Probablemente la casualidad desempeñó un papel en el principio de la evolución. En teoría, se podrían presentar seres vivos de otro planeta, que estuviesen construidos de L-azúcares y D-aminoácidos. Se podrían parecer a nosotros externamente. Ambas formas no podrían, sin embargo, entremezclarse. La L-glucosa y el D-glutamato del otro planeta no tendrían valor nutritivo para nosotros, pues no "reconocerían" nuestras enzimas y no podrían convertirse. Inversamente, nosotros no seríamos interesantes para ellos como piezas de caza.

Lewis Carroll, con respecto a eso, hizo un experimento filosófico en "Alicia a través del espejo": la leche reflejada (Fig. 4.25) (con L-lactosa en lugar de D-lactosa) no le gustaría al gato normal, ¡pero quizá sí a un gato reflejado!

La desventaja de la síntesis química de aminoácidos es clara: la mitad del glutamato sintetizado químicamente (o sea el D-glutamato) no poseería ningún valor como condimento. En cambio, las corinebacterias forman exclusivamente L-glutamato. De la lisina y la treonina hay también formas L biológicamente activas, que las bacterias forman al 100%. La síntesis microbiológica es una síntesis estereoquímica complicada, y la conversión de la síntesis química va más allá, si se pueden ordenar de modo dife-



Fig. 4.22 Producción de lisina en enormes biorreactores en Japón.

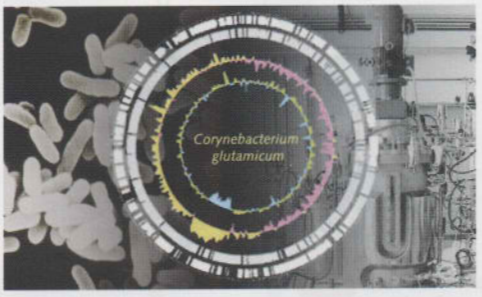


Fig. 4.23 *Corynebacterium glutamicum* está depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) con el Nº 13032. El círculo, que representa el genoma, son regiones codificadoras. Se muestran también los biorreactores.



Fig. 4.24 James Bond (Sean Connery) se camufló como hombre de negocios en "Sólo se vive dos veces" para encontrar en Japón una central de cohetes supersecreta. El espía principal pidió muy astutamente a un jefe gángster japonés que deletreara "m-o-n-o-s-o-d-i-o-g-l-u-t-a-m-a-t-o", para distraer la misión de salvar el mundo.



Fig. 4.25 En su libro "Alicia a través del espejo", publicado en 1871, Lewis Carroll describe cómo Alicia alcanza a través de un espejo un mundo de reflexión: "Ahora, si me prestas atención, gatito, en lugar de hablar tanto, te contaré cómo es la casa detrás del espejo. Primero está el cuarto, que se ve en el espejo y que es completamente igual a nuestro salón, sólo que con todas las cosas dispuestas a la inversa. ¿Te gustaría vivir en la casa del espejo, gatito? ¿Y si te diesen leche allí? Pero... ¡Quizás la leche del espejo no sea sabrosa para beberla!"

Fig. 4.26 Configuración de un aminoácido. Excepto la glicina (con R = H), los carbonos α de los aminoácidos poseen cuatro sustituyentes diferentes: COOH (verde), H (gris), NH_2 (amarillo) y R (rojo). Los L-aminoácidos poseen el grupo amino a la izquierda, mientras que sus imágenes especulares (D-aminoácidos) lo poseen a la derecha.

rente los grupos equivalentes que se encuentran en una molécula. Por lo demás, pueden utilizarse las enzimas para deshacer de nuevo activamente la mezcla D,L generada (véase Cap. 2, aminociclasas).

La capacidad de los microbios para dicha síntesis selectiva y las conversiones también se utilizan en la producción de ácido L-ascórbico (vitamina C).

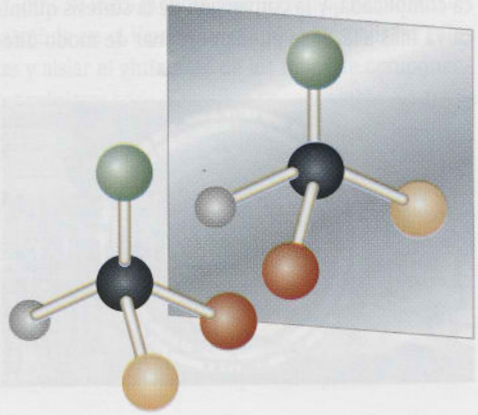
4.10 Ácido L-ascórbico, la vitamina C

Nosotros, como otros primates y –sorprendentemente– los cobayas, no podemos sintetizar vitamina C (Fig. 4.29) y debemos tomarla de los alimentos. Así pues, los cobayas y los chimpancés también pueden tener el escorbuto. A todos nosotros nos falta la enzima gulonolactona oxidasa.

Hoy parece extraño que en 1900 los marineros, por orden del emperador alemán, tuviesen que tragar diariamente ácido cítrico a cucharadas para evitar el escorbuto. Se había observado esta acción de la vitamina en las frutas cítricas. El procedimiento imperial produjo, sin embargo, simplemente diarreas. No se sabía entonces que era el ácido ascórbico (vitamina C) de los limones el que prevenía el escorbuto, no el ácido cítrico. El *chucrut* era, sin embargo, muy sano (mientras no se almacenara en latas tapadas con mercurio, véase Cuadro 4.8).

En 1933 se produjo un gran descubrimiento en el laboratorio del sótano del politécnico en la Escuela Técnica Confederada (ETH), de Zurich: la síntesis de vitamina C, el **ácido L-ascórbico** (Cuadro 4.3).

En el proceso de fabricación, el polaco **Tadeusz Reichstein** (1897-1996) degradó glucosa químicamente, con más de diez pasos intermedios, hasta L-xilulosa, y al final la convirtió con ácido cianhídrico (HCN) en vitamina C. Por desgracia, el método era muy complicado para una gran producción y daba rendimientos bajos. Precisamente, el ser humano necesita vitamina C, en comparación con otras vitaminas, en grandes cantidades, aproximadamente 100 mg diarios.



Reichstein y su joven colega **Grüssner** siguieron entonces un nuevo camino. Querían producir primero sorbosa como intermediario. Para ello redujeron glucosa con hidrógeno y un catalizador bajo presión con un rendimiento del 100% a sorbitol.

La siguiente oxidación química del sorbitol al precursor de la vitamina C sorbosa fue, sin embargo, muy complicada. El químico francés **Gabriel Bertrand** (1867-1962) (Cuadro 4.3) ya había descrito en 1896 el siguiente paso: la bacteria del ácido acético *Acetobacter suboxydans* transforma concretamente el sorbitol en sorbosa. La bacteria se llama hoy, según la nueva nomenclatura, *Gluconobacter oxydans*.

Reichstein hizo entonces algo poco común para un químico de su tiempo: pensó biotecnológicamente y compró a los microbiólogos cultivos puros de *Acetobacter*. Sin embargo, las bacterias compradas no querían estar al servicio de Reichstein, un profano en microbiología. No obstante, Bertrand había descrito con fortuna un método descabellado para capturar bacterias de sorbosa salvajes: ¡moscas del vinagre (*Drosophila*)!

Reichstein utilizó la combinación de síntesis química con los pasos biotecnológicos de la conversión de D-sorbitol a L-sorbosa (Fig. 4.27).

En 1933, Reichstein ofreció la idea a la compañía Hoffmann-La Roche, en Basilea. Roche estuvo a punto de adoptar el método de **Albert Szent-Gyoergyi** (1893-1986): el húngaro había aislado vitamina C del pimiento y había obtenido el premio Nobel en 1937.

El procedimiento de Reichstein (Fig. 4.27) se desarrolló en los siguientes pasos:

- Se reducía la D-glucosa catalíticamente (níquel como catalizador, 150 bar de presión) a D-sorbitol (sorbitol).
- Entonces las bacterias tomaban el sorbitol y lo convertían selectivamente mediante la **sorbitol deshidrogenasa** de *Acetobacter suboxidans*. Esto sucedía en una fermentación sumergida en una disolución de sorbitol al 20-30%, prácticamente por completo en uno a dos días.
- Definitivamente, la L-sorbosa se oxidaba químicamente a ácido 2-ceto-L-gulónico (2-KLG), y éste,

mediante tratamiento con ácido e hidrólisis, se convertía en ácido L-ascórbico.

Tras décadas de éxito, ahora la síntesis química-biotecnológica de la vitamina C de Reichstein y Grüssner se realiza mediante un nuevo proceso de purificación biotecnológico (Fig. 4.32 y Cuadro 4.3).

Las bacterias del género *Erwinia* (Fig. 4.33) convierten la glucosa en ácido 2,5-diceto-D-glucónico (2,5-DKG). Esto ocurre con la intervención de tres enzimas diferentes (enzimas 1 a 3, Fig. 4.32). *Erwinia* es una bacteria gramnegativa (como *E. coli*).

Estas tres enzimas están unidas a la membrana en el **periplasma**, el espacio intermedio entre la membrana externa y la membrana citoplasmática en las bacterias gramnegativas.

Otras bacterias, como las grampositivas **corinebacterias,** tienen una estructura de membrana sencilla (90% mureína, 10% ácido teicoico), ¡y por eso se puede diferenciar tan bien entre bacterias grampositivas y gramnegativas por la coloración! No poseen periplasma. Lo interesante es que tienen, sin embargo, una ácido 2,5-diceto-D-glucónico reductasa en el citoplasma y pueden, por lo tanto, convertir 2,5-DKG en ácido 2-ceto-L-gulónico (2-KLG), que asimismo se cicla fácilmente a vitamina C.

¡*Erwinia* une, pues, el producto de partida para *Corynebacterium*! Se debían juntar *Corynebacterium* y *Erwinia* en una cofermentación. Pero técnicamente es muy difícil unirlas (diferentes pH y temperatura óptima, velocidades de crecimiento y eliminar las otras cepas, diferentes medios nutrientes...).

Sin embargo, finalmente se logró, con métodos de ingeniería genética, unir el material genético de los dos tipos de bacterias en un único microorganismo: éste toma glucosa pura y segrega el precursor de la vitamina C directamente al medio.

Se decidió que el gen de la reductasa de las corinebacterias se insertaría en células de *Erwinia*. Esto es naturalmente adecuado, pues a *Erwinia* le falta sólo una enzima y las enzimas de *Erwinia* no se hallan en la membrana periplasmática de *Corynebacterium*. La **reductasa** de *Corynebacterium* no trabaja, por el contrario, en una membrana, sino que está libre en el plasma celular.

Ahora sucede lo siguiente en las células de *Erwinia* recombinantes (Fig. 4.32):

- La D-glucosa se toma del medio hacia el periplasma.

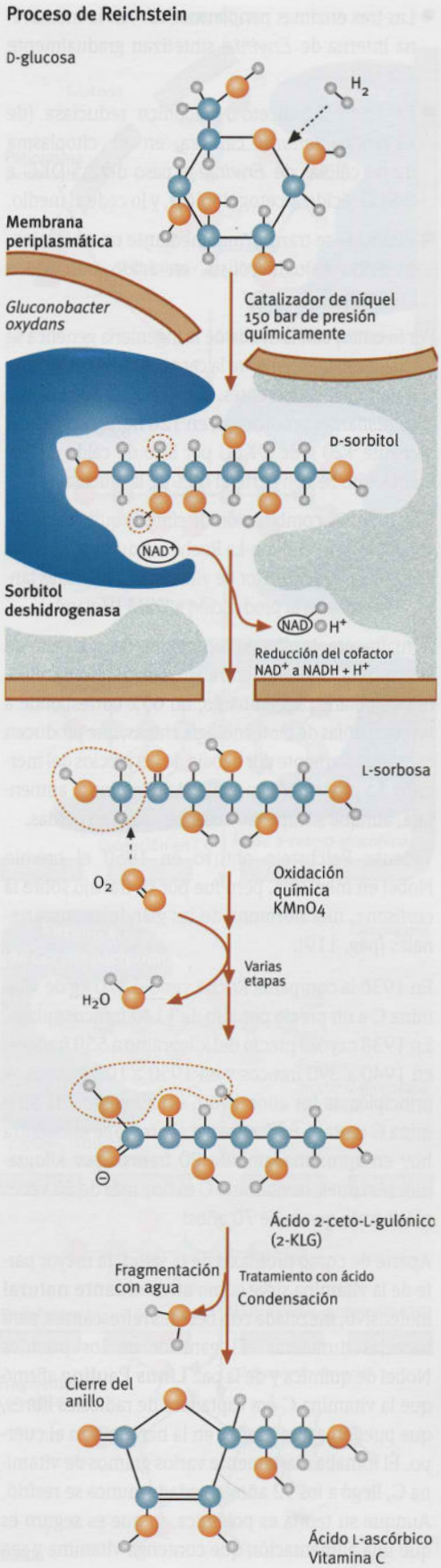


Fig. 4.27 Izquierda: síntesis de la vitamina C por Reichstein.

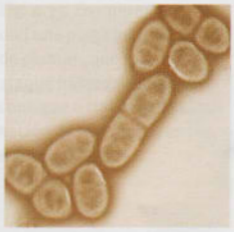


Fig. 4.28 *Gluconobacter oxydans* convierte L-sorbitol, con su sorbitol deshidrogenasa, en L-sorbosa.



Fig. 4.29 Cristales de ácido ascórbico (vitamina C) en un microscopio de polarización. Se observan interferencias por la doble refracción de la luz.



Fig. 4.30 El ascomiceto filamentoso *Ashbya gossypii* produce vitamina B_2 (riboflavina).

- Las tres enzimas periplasmáticas (en la membrana interna de *Erwinia*) sintetizan gradualmente 2,5-DKG.
- La ácido 2,5-diceto-D-glucónico reductasa (de *Corynebacterium*) cataliza en el citoplasma de las células de *Erwinia* el paso de 2,5-DKG a 2-KLG (ácido 2-cetogulónico), y lo cede al medio.
- El 2-KLG se transforma, mediante un tratamiento ácido bajo hidrólisis, en ácido L-ascórbico (vitamina C).

Por lo tanto, con la ayuda de la ingeniería genética se logró unir elegantemente la capacidad metabólica de dos microbios diferentes. Las células de *Erwinia* recombinantes produjeron, en 120 horas, aproximadamente 120 g de 2-KLG por litro de caldo de fermentación. Se convierte el 60% de la glucosa.

Con la genial combinación de síntesis química y biotecnológica, Hoffmann-La Roche fue durante muchos años el mayor productor de vitamina C. Mientras tanto, se encargaba la producción a DSM (Holanda).

Actualmente, la cifra de facturación del mercado de la vitamina C se encuentra alrededor de 400 millones de dólares; sin embargo, un 65% corresponde a las compañías de biotecnología chinas, que producen considerablemente por debajo de los precios del mercado. La producción mundial de vitamina C aumentará, aunque sin apenas variar las cifras de ventas.

Tadeusz Reichstein obtuvo en 1950 el premio Nobel en medicina, pero fue por su trabajo sobre la cortisona, una hormona de las glándulas suprarrenales (pág. 119).

En 1936 la compañía Roche vendió 370 kg de vitamina C a un precio por kilo de 1140 francos suizos. En 1938 cayó el precio del kilogramo a 550 francos, en 1940 a 390 francos y en 1950 a 102 francos. A principios de los años 1960, un kilogramo de vitamina C costaba 80 francos, y el precio se encuentra hoy en aproximadamente 20 francos por kilogramo. ¡Así pues, la vitamina C es hoy más de 50 veces más barata que hace 70 años!

Aparte de como profilaxis de la salud, la mayor parte de la vitamina sirve como **antioxidante natural** inofensivo, mezclada con bebidas refrescantes, para hacerlas duraderas. El ganador de los premios Nobel de química y de la paz **Linus Pauling** afirmó que la vitamina C era captadora de radicales libres, que pueden causar daños en la herencia en el cuerpo. Él tomaba diariamente varios gramos de vitamina C, llegó a los 92 años de edad y nunca se resfrió. Aunque su teoría es polémica, lo que es seguro es que una alimentación que contenga vitamina y sea rica en proteínas, en lugar de grasa y carne, aumenta la esperanza de vida.

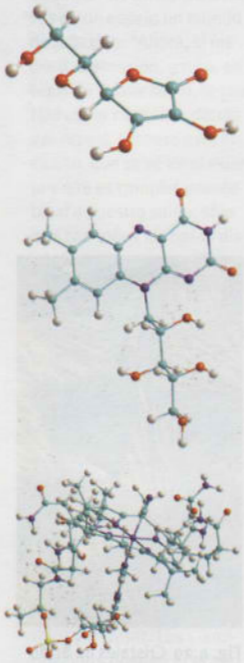


Fig. 4.31 Estructuras de la vitamina C (arriba), la vitamina B_2 (centro) y la vitamina B_{12} (abajo).

¿Cuánta vitamina C se debe tomar en realidad? La Sociedad Alemana para la Alimentación recomienda 150 mg al día. Los partidarios del "*forever young*" toman, sin embargo, uno a tres gramos diarios. Es difícil tomar una sobredosis y no es posible intoxicarse, pues la vitamina C es soluble en agua. No se acumula en el cuerpo como las vitaminas A, D, E y K solubles en lípidos, sino que se elimina en orina. El ácido en exceso puede, sin embargo, afectar al estómago (¡y al monedero!).

Las otras vitaminas principales se producen químicamente puras, por ejemplo el colorante de las zanahorias β-caroteno para el pienso, o de plantas, por ejemplo el tocoferol. Sólo las vitaminas C, B_2 y B_{12} (Fig. 4.31) se producen principalmente por biotecnología mediante microbios.

El hongo *Ashbya gossypii* (Fig. 4.30), un ascomiceto filamentoso, aporta **riboflavina**, la **vitamina B_2**. La cepa industrial intermedia reproducida genera hoy 20 000 veces más vitamina B_2 que su tipo habitual en la naturaleza. El proceso se llevó a cabo en 1947.

Al principio, *Ashbya* producía cantidades muy bajas de riboflavina. Mientras tanto se empezó a utilizar también un hongo relacionado, *Eremothecium ashbyii*, y la bacteria *Bacillus subtilis*, de una cepa determinada que sobreproduce la vitamina y la cede al medio. *B. subtilis* no es, en comparación con ambos hongos, un sobreproductor natural de vitamina; se manipuló por ingeniería genética dirigida.

La riboflavina se encuentra en la leche, el hígado, el pollo, los huevos, el pescado marino, las nueces y la lechuga. Influye esencialmente en la buena salud y la formación de los músculos, y participa en la producción de la hormona del estrés adrenalina.

Pseudomonas denitrificans y *Propionibacterium shermanii* unen cobalamina, el precursor de la **cianocobalamina (vitamina B_{12})** (Fig. 4.31), incluso en un exceso de producción de 50 000 veces en comparación con la cepa salvaje. En un proceso de un paso, *Pseudomonas denitrificans* genera aeróbicamente hasta 60 mg/L de cobalamina en cuatro días de crecimiento en una melaza de azúcar de remolacha. La cobalamina se cede al medio. La melaza contiene betaína, que aumenta esencialmente el rendimiento. Al final se calienta el cultivo en presencia de cianuro y se consigue así la cianocobalamina.

La carencia de vitamina B_{12} produce **anemia (anemia perniciosa)**. En 1926, la anemia perniciosa fue tratada con éxito con una a dos libras de

hígado de buey crudo por semana. En 1934 se concedió el premio Nobel de medicina a **George Hoyt Whipple**, **George Richards Minot** y **William Parry Murphy** por este descubrimiento.

La vitamina B_{12} se utiliza para la formación de sangre y como preparado protector del hígado, y aproximadamente la mitad de las 20 toneladas que se producen anualmente se utilizan en alimentos para animales, para el crecimiento y la formación de los huesos. En los humanos promueve, además, la potencia nerviosa y la lucidez mental.

4.11 Aspartamo – La marcha triunfal de un éster dipeptídico dulce

James Schlatter, químico de la compañía farmacéutica americana G.D. Searle Co., en 1965 analizó péptidos, cadenas cortas de diferentes aminoácidos, como preparados contra úlceras de estómago. Más tarde informó del hecho de que él se había mojado la mano inadvertidamente en el laboratorio con unas gotas de uno de sus preparados. Cuando se humedeció la punta de los dedos al leer unos papeles, notó un sabor dulce en el dedo. (¡Las malas lenguas dicen que le ocurrió al fumar en el laboratorio a pesar de estar prohibido!) La sustancia de análisis poseía, como se estableció después, 200 veces la fuerza endulzante del azúcar de remolacha o de caña.

El nuevo superazúcar **aspartamo** es un péptido, un éster de metilo de los dos aminoácidos aspartato y fenilalanina.

La fenilalanina y el aspartato pueden producirse mediante bacterias en biorreactores. Se unen a péptidos sólo químicamente o con la ayuda de la "reacción inversa" de proteasas (como la tripsina) en sistemas de dos fases con medios de disolución orgánicos (véase Cap. 2).

El aspartamo se fragmenta por las enzimas de la digestión en el intestino; un gramo de aspartamo, la necesidad diaria de un adulto, suministra sin embargo sólo cuatro kilocalorías, mucho menos que una centésima de la energía que un ser humano generalmente consume con el azúcar. La segunda ventaja del aspartamo: no sólo es pobre en calorías, sino que sabe también casi como el azúcar (no se nota la ausencia del "compuesto"), y no tiene el sabor de sus competidores sacarina y ciclamato.

El aspartamo llegó en el momento oportuno: a finales de los años 1970 se extendió la obsesión por estar en forma en todo Estados Unidos. Los productos *light* usan aspartamo puro o en mezclas (Fig. 4.35). El aspartamo tiene también otra ventaja: se degrada tras seis a nueve meses, pero para los refrescos es

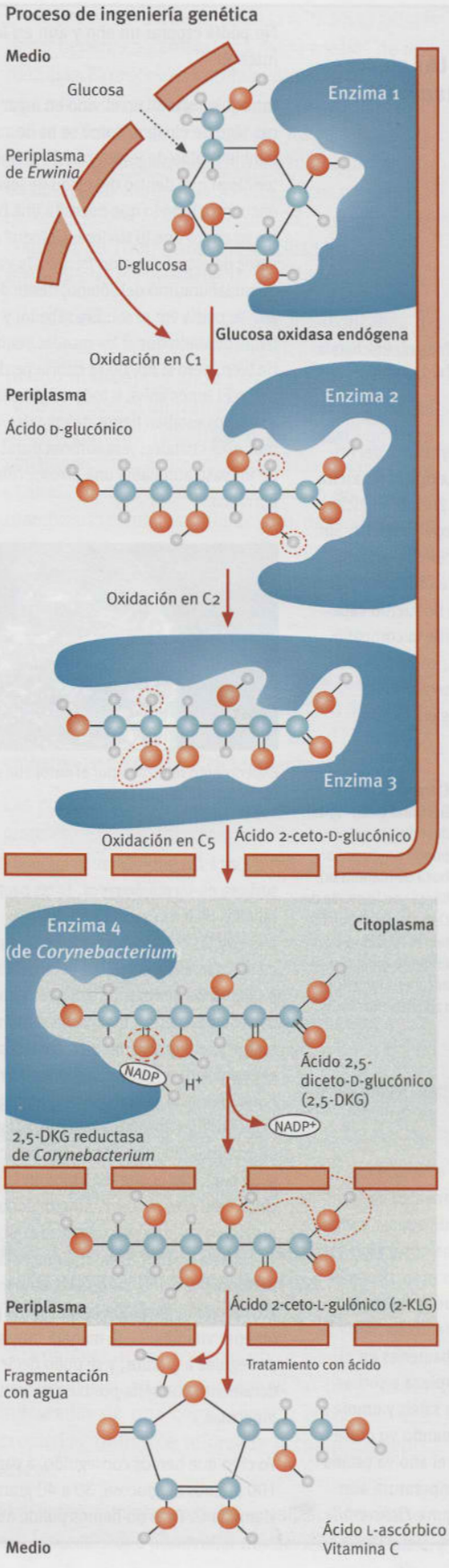


Fig. 4.32 Síntesis de la vitamina C con células de *Erwinia* manipuladas genéticamente.



Fig. 4.33 *Erwinia* es en realidad una plaga gramnegativa de plantas, que realiza un ataque húmedo y seco y se consigue a través de la eliminación de pectinasas en las células de plantas.



Fig. 4.34 Las corinebacterias liberan la enzima 2,5-DKG reductasa, que se expresa en el citoplasma de las células de *Erwinia*.

Cuadro 4.3 Historia de la biotecnología: Las moscas de Reichstein y la vitamina C



Tadeusz Reichstein (1897-1996)

Tadeusz Reichstein fue ayudante del brillante químico de síntesis **Leopold Ruzicka** (1887-1976) en el ETH de Zurich. Ruzicka ofreció su síntesis de hormonas a Roche. Sin embargo, "el poco convencional y original Ruzicka y el completamente ordenado y disciplinado Barell (de Roche) no fueron capaces de entenderse" (escrito de la compañía Roche). Ruzicka fue a Ciba, en Basilea, en 1929 (¡con éxito!). De manera similar, Reichstein probó con Roche en 1932.



El francés Gabriel Bertrand (1867-1962) describe cómo se puede producir sorbosa de manera brillante con la ayuda de *Drosophila*. A Reichstein le funcionó exactamente igual que al autor en Hong Kong 120 años más tarde.

Después de 50 años, Reichstein recordaba lo que sucedió entones:

"No conozco el protocolo exacto. Pero (según Gabriel Bertrand) era algo así: se toma vino, se coloca algo de azúcar y vinagre dentro, y se deja en una copa. Con esta mezcla se atraen pequeñas moscas con el nombre de *Drosophila*, que revolotean hacia allí. La *Drosophila*, también llamada mosca del vinagre, posee bacterias en el intestino, y si la mosca empieza a sorber ese jugo, algunas bacterias salen y empiezan a producir sorbosa. Cuando yo quise probarlo por primera vez, el año ya estaba muy avanzado, pero la temperatura aún era templada, y no vi ninguna *Drosophila*. No podía esperar un año y aun así lo intenté.

Introduje sorbitol en el vino en lugar de azúcar, algo de vinagre, como se ha descrito, y también caldo de levadura. Me dijo un bacteriólogo que dentro del caldo de levadura se encuentra todo lo que necesita una bacteria. No es cierto que lo tuviese. Coloqué cinco vasos de esta disolución frente a la ventana de mi laboratorio del sótano, desde donde aún se podía ver el sol. Era sábado, y yo había pensado que si las moscas venían estaría bien, pero si no, no se habría perdido nada. El lunes volví, y todo estaba seco. Pero dos vasos estaban llenos de cristales. Miramos esos cristales: ¡era sorbosa pura! Dentro de un vaso aún había una *Drosophila*, borracha.



Experimento realizado por el autor con sorbitol: la flecha roja señala la mosca

Y de esta *Drosophila* salían los cristales de sorbosa en forma de rayos. Estas bacterias salvajes hicieron sorbosa en dos días, mientras que las compradas no la podían producir en seis semanas, o sea, las mías debían ser las bacterias buenas. Inoculamos entonces con estas bacterias, que proliferaron rápidamente y, en efecto, también en el segundo experimento se obtuvo sorbosa en 24 a 48 horas. Por este método se pudieron generar en pocos días aproximadamente 50 gramos de sorbosa. Era, claro está, una mezcla salvaje de bacterias la que teníamos en la disolución. Pero esto no hacía ningún daño.
A pH 5, o sea una reacción ácida, alcanzaron su eficacia óptima. Y en una reacción tan fuertemente ácida, las otras bacterias u hongos crecieron poco. De la sorbosa se pudo obtener vitamina C de manera muy sencilla, en seguida a gramos, y se pudo decir verdaderamente que sería posible producirla a toneladas.

Yo creo que hemos conseguido, a partir de 100 gramos de glucosa, 30 a 40 gramos de vitamina C. Pero no hemos pulido aún la síntesis; se deben lograr, pues, resultados más seguros, optimizados y todavía mejores."



Redoxon®, antiguamente y en la actualidad como tableta efervescente, ahora también en China.

La compañía Roche, en Zurich, obtuvo la licencia de Reichstein, a pesar de que el jefe de la compañía, de la entonces aún muy pequeña compañía, creyó que esta reacción microbiológica con bacterias no era conveniente para ella, ya que era muy impopular entre los químicos. Reichstein le contestó: "... impopular o no, yo no lo puedo cambiar, esta bacteria es el único trabajador que a partir de sorbitol puede hacer sorbosa con un 90% de rendimiento. Esto no imita a ninguna persona. Y la bacteria lo consigue en dos días, con casi nada, sólo con aire. Se le debe dar simplemente un poco de levadura para comer".

En el escrito del 100 aniversario de la compañía Roche, en 1996, se dice: "el aislamiento de esta vitamina antiescorbuto tuvo éxito tras los largos estudios del húngaro **A. Szent-Györgyi**, y Roche se planteaba adoptar este método de obtención de la vitamina C a partir del pimiento. [...] Puesto que la síntesis genial de Reichstein demostró ser muy prometedora, con ella empezó en realidad la producción de la vitamina por Roche. [...] Sin embargo, Barrel juzgó entonces la vitamina C como un producto bioquímico utilizado raramente, del cual se podían vender como máximo 10 kg por año, y fue muy sorprendente que después de unos meses resultara ser un producto muy codiciado".

El preparado de vitamina C lanzado en 1934, *Redoxon®*, se encuentra aún hoy en el mercado.



Drosophila melanogaster

irrelevante, pues según las estadísticas el 95% de las bebidas no están en los estantes más de tres meses.

Actualmente el aspartamo todavía es más caro que la sacarina y que el jarabe de fructosa producido enzimáticamente (Cap. 2). Sin embargo, si se consigue producir microbios por ingeniería genética, para hacer en cierto modo el aspartamo más barato, "completo" o sus dos componentes en mayores cantidades, el aspartamo podría ser el vencedor. Puesto que su valor nutritivo es extremadamente bajo, se avecinaban malos tiempos para las bacterias de la caries, como *Streptococcus mutans*. Los expertos en alimentación, sin embargo, dudaron si se aplicaba también para la reserva grasa: las bebidas *light* proporcionan al cuerpo una espera de energía, que luego no llega y se produce un hambre feroz, que se calma de otra manera. Hay verdaderas advertencias sobre el aspartamo por parte de los científicos de la alimentación. En Estados Unidos se critica el aspartamo por parte de algunos colectivos, porque en su digestión se origina metanol que puede provocar ceguera; pero para eso se deberían ingerir grandes cantidades de aspartamo.

Mundialmente se producen 14 000 toneladas de aspartamo al año. En 2004, el aspartamo parece que tuvo una facturación de 850 millones de dólares.

Otras dos proteínas aún más dulces se descubrieron en unos arbustos del oeste de África: la **taumatina** y la **monelina** (Fig. 4.38). Constan de 208 y 94 aminoácidos, y son aproximadamente 2500 y hasta 100 000 veces más dulces que la caña de azúcar. Puesto que los costes para la obtención de estas materias dulces de plantas son elevados, se está intentando producirlas genéticamente a partir de microbios.

Muchos gatos adoran la taumatina. Existe el rumor insistente de que la taumatina o determinados aminoácidos hacen a los gatos prácticamente adictos a las marcas de comidas para gatos (Cuadro 4.2).

4.12 Las células inmovilizadas producen aminoácidos y ácidos orgánicos

Japón está especialmente muy avanzado en el campo de las células inmovilizadas (Cap. 2). **Ichiro Chibata** y **Tetsya Tosa** (Cap. 2, Fig. 2.23), en la compañía Tanabe Seiyaku en Osaka, pioneros en la inmovilización de enzimas, utilizaron en 1973 un proceso mediante el cual las células congeladas de *Escherichia coli* incluidas en gel sintetizaron anualmente 600 t del aminoácido **aspartato** (ácido aspártico, un componente del aspartamo) a partir de ácido fumárico. Tras 120 días bajó la actividad de la aspartasa de las bacterias coli a la mitad. Las células libres tienen, en cambio, una "vida media" de sólo diez días. El proceso con células inmovilizadas supone un 60% del coste de producción en comparación con la aplicación de células libres: los costes del catalizador se reducen desde aproximadamente un 30% en las células libres a un 3%, los costes en personal de servicio y la energía en un 15%. Un reactor en columna de 1000 litros de capacidad libera aproximadamente dos toneladas (!) de L-aspartato por día.

Un proceso similar con células inmovilizadas de *Brevibacterium* generó 180 toneladas de **L-malato (ácido málico)** por año a partir de ácido fumárico. Ambos procesos utilizan sólo una única enzima del microorganismo (aspartasa o fumarasa), que por consideraciones económico-prácticas se deja en las células. Se destruyen con precaución en parte las membranas celulares antes del uso, de modo que ya no estén disponibles como células vivas. Los sustratos no se sostienen por la membrana celular, pero las enzimas son estables.

Los microorganismos se utilizan en su forma natural más bien para **procesos de varias etapas**. Un buen uso es el ejemplo de la producción de alcohol con levaduras inmovilizadas (Cap. 1), que sin embargo ya no es lo suficientemente económico.

Las posibilidades de las células inmovilizadas son grandes. En comparación con las células libres, vivas, las inmovilizadas se separan claramente mejor en la mayoría de los casos.

Un proceso de Tanabe Seiyaku utilizó en 1982 dos microorganismos inmovilizados "colocados en fila" para la conversión de materia: primero las células inmovilizadas de *Escherichia coli* formaron, a partir de ácido fumárico en un biorreactor de 1000 L, **L-aspartato**, que posteriormente se convirtió en **L-alanina** con células de *Pseudomonas dacunhae* inmovilizadas en un reactor de 2000 L. La instalación piloto produjo mensualmente 100 toneladas de L-aspartato y diez toneladas de L-alanina.

4.13 Mutaciones: un camino hacia la programación selectiva de microbios

Para obtener un microorganismo a medida para su uso industrial, se deben eliminar las propiedades indeseadas de una cepa salvaje y conseguir una propiedad utilizable reforzada o completamente nueva.

Hay varios caminos adecuados: utilizar las mutaciones espontáneas o desarrollar mutaciones artificiales.



Fig. 4.35 ¡Cómo cambian los tiempos y los gustos! Hay 100 años entre los dos anuncios. Arriba: la original rica en calorías en Estados Unidos. Abajo: el producto "bio" bajo en calorías en Asia.



Fig. 4.36 En la lata de la Coca-Cola *light*, junto a la lista de ingredientes hay un aviso para enfermos de fenilcetonuria de la presencia de aspartamo.

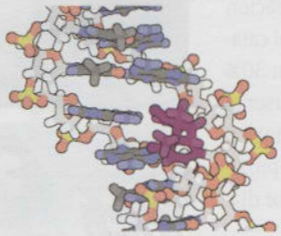


Fig. 4.37 El aspartamo es, actualmente, por su gusto similar al del azúcar, uno de los edulcorantes más populares.



Fig. 4.38 La taumatina se obtiene de las frutas del arbusto *Ketemfe* africano.

Cuadro 4.4 Por qué la luz UV mata los microbios



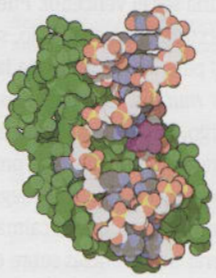
Mediante radiación UV se origina un dímero TT (violeta) en la doble hélice de DNA. Se forma un anillo de ciclobutano entre las dos bases de timina (arriba). El dímero produce una torsión en la hélice (abajo) y debilita la interacción con la correspondiente pareja adenina; se rompe ligeramente el esqueleto de DNA.

La luz ultravioleta se absorbe por un doble enlace en una base pirimidina (timina y citosina en el DNA), abre el enlace y permite que reaccione con las moléculas vecinas. La reacción más frecuente es una interacción directa con otra base, la timidina. Se produce así un enlace químicamente estable (covalente) y se origina un fuerte cuarto anillo. Cada célula irradiada sufre aproximadamente 50 a 100 de estas reacciones por segundo (!) con la luz solar; así se originan mutaciones.



La luz UV se utiliza para la esterilización de las campanas de cultivo (*Clean Bench*).

Por suerte para nosotros, estos daños desaparecen en general en segundos tras su formación. Docenas de proteínas cooperan para ello. Cortan en el llamado *nucleotide excision repair* un segmento de 30 pares de bases de longitud, que de nuevo se rellena con los nucleótidos correctos. Ésta es nuestra única protección contra los rayos UV (además de las cremas solares). Si esta reparación no se consigue con éxito, se produce cáncer de piel. Los microorganismos, en cambio, utilizan endonucleasas, que sencillamente en un paso cortan y eliminan la base dañada. La endonucleasa V del bacteriófago T4 envuelve muy fuertemente al DNA, y lo corrige. Se une al lugar que contiene un dímero TT.



Cómo una enzima reparadora de DNA (verde) encuentra el dímero TT (violeta), lo corrige y transporta la adenina a su bolsillo, a la izquierda cerca del DNA.

Asombrosamente, la enzima no reconoce el dímero sino la reducción de la hélice por el dímero. La enzima se enrosca (*kink*) al DNA en el lugar de la lesión y coloca una base adenina complementaria en su bolsillo.







Fig. 4.39 Placas de Petri con colonias de microorganismos. *Screening* de nuevos productores de antibióticos en Jena.

En el caso más sencillo, una **mutación puntual** reemplaza un par de bases del DNA por otro par. En otros casos se puede perder o insertar un par de bases o un fragmento corto del DNA. Tales cambios ocurren en la naturaleza en todos los DNA: seguramente se deslizan al copiarse.

Las **mutaciones espontáneas** en una determinada base son, sin embargo, muy raras: la proporción de mutación media en *E. coli* para una base reescrita (replicada) se encuentra en 10^{-10}, es decir, ¡de diez mil millones de bases muta como media una base! Tales mutaciones permanecen en general "mudas" o se reparan sencillamente mediante enzimas (Cuadro 4.5).

La proporción de mutación aumenta aproximadamente en un factor de 1000 si se tratan microorganismos con **mutágenos**. Entre ellos se encuentran la radiación ultravioleta (UV) (produce por ejemplo la formación de dímeros de dos timinas vecinas del DNA, Cuadro 4.4), la radiación ionizante (rayos X, gamma o de neutrones) y una enorme cantidad de moléculas químicas relacionadas que reaccionan con las bases del DNA (por ejemplo, el ácido nitroso reacciona con grupos amino) o interrumpen el proceso de la copia. Tales moléculas activan en primer lugar, mediante enzimas del hígado (como el citocromo P-450), a los mutágenos (por ejemplo aflatoxina de mohos sobre cacahuetes) (Fig. 4.10) formando epóxidos altamente reactivos, que entonces reaccionan con guanina del DNA para generar enlaces estables. El cáncer en los humanos y otros mamíferos se origina por mutaciones en genes que participan en el control del crecimiento y mediante una reparación del DNA defectuosa (en muchos tipos de cáncer intestinal).

En general, es imposible mutar un único gen diana. Para mejorar una cepa microbiana mediante mutación se debe disponer de un test sensible, con el cual se reconozcan los mutantes raros casuales "exactos".

Ya hemos visto en la producción de aminoácidos cómo se programan los microorganismos de la manera deseada mediante mutaciones (4.7): con la ayuda de mutaciones naturales y lecturas dirigidas se forma una cepa bacteriana que sobreproduce grandes cantidades del aminoácido lisina, tan importante para la vida.

La situación es otra en los hongos y las bacterias productores de antibióticos: la cantidad producida de antibiótico depende de una docena de genes. Así, es imposible encontrar una única mutación que haga

Cuadro 4.5 El *screening* (cribado), la mutagénesis y la selección logran potentes productores de antibióticos

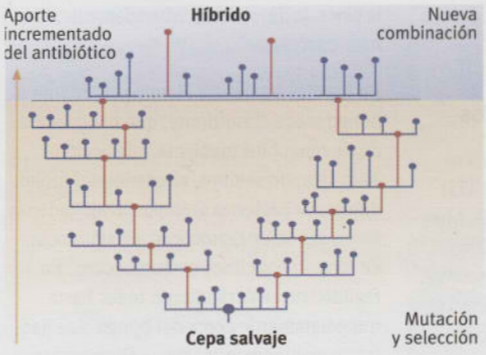
Primero se toma una muestra del hábitat de interés.

Puesto que en 1 cm^3 de tierra se encuentran millones de microbios, la muestra debe diluirse con agua. Se vierten muestras más o menos diluidas sobre placas y se dividen. Éstas son las placas de Petri, que contienen un nutriente. Entonces se incuban las placas de Petri a 25 °C o 37 °C en incubadoras durante seis días, hasta que los microorganismos individuales forman acumulaciones (colonias) pequeñas bien visibles. Si se encuentran colonias, forman antibióticos si no hay material inhibidor en el entorno. Si entonces se introducen, por ejemplo, estreptococos en las placas con las bacterias a analizar, éstas forman sobre las placas un césped espeso. Sólo las colonias productoras de antibióticos originan una zona muerta.



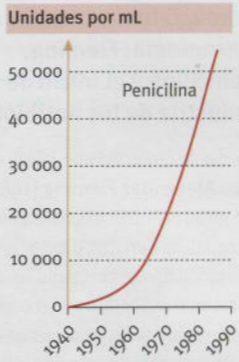
Screening visual de "zonas muertas" formadas por los productores de antibióticos

De estas colonias se toma una muestra con un hilo delgado, compuesto del metal noble platino y previamente hervido para dejarlo libre de gérmenes, y con él se hace un test de rayado realizando una línea sobre una nueva placa con nutriente. Tras una breve incubación se colocan verticalmente sobre la primera línea otras nuevas para realizar diferentes tests microbianos, por ejemplo para estafilococos, estreptococos, *Escherichia coli* o levaduras del género *Candida*. Las cepas de prueba que se inyectan sobre el nuevo antibiótico no crecen cerca de la primera línea de inoculación, mientras que las cepas no inyectadas cerca pueden crecer.



Ahora se cultiva el productor de antibióticos. Si crece bien, se intenta obtener el antibiótico en forma pura. Entonces se analiza la eficacia del antibiótico en animales de experimentación.

Mediante una mutación y una posterior selección de microorganismos productores de antibióticos se puede mejorar el rendimiento. Se eligen las colonias hijas, se selecciona otra vez un mutágeno y finalmente se analiza su productividad. Tras muchos ciclos de mutaciones y selecciones se pueden cruzar los mejores mutantes entre sí. Mediante una nueva combinación (recombinación) de genes pueden resultar miles de descendientes genéticamente diferentes, muchos de ellos con una mayor producción de antibióticos. La penicilina es el mejor ejemplo satisfactorio de *screening* (cribado), mutagénesis y selección, una moderna "evolución en la placa de Petri".



Se eligen las mejores colonias hijas (coloreadas) de la derecha. Aumento del rendimiento en penicilina mediante mutación y selección, así como la fermentación mejorada de la primera producción de penicilina, hasta los años 1990

Hoy las cepas industriales de *Penicillium chrysogenum* producen 150 000 unidades/mL (aproximadamente 100 mg), en comparación con las 4 unidades/mL del hongo de Fleming.

Mientras que a principios de los años 1940 se poseían 1200 cepas de mohos, la ARS Culture Collection, en Peoria, tiene hoy más de 80 000 cepas microbianas. A finales de la década de 1990, el microbiólogo **Stephen W. Peterson,** en Peoria, descubrió 39 nuevas especies de *Penicillium*, que se sumaron a las 102 especies de *Penicillium* antes conocidas, incluyendo la famosa cepa de los melones.



Microorganismos sembrados en placas de Petri

que una cepa salvaje dé enseguida un rendimiento eficiente, con valores económicos de quizás algunos miligramos por litro. Las cepas industriales altamente desarrolladas proporcionan hoy, por litro de medio nutriente, 20 o más gramos de antibiótico como resultado de varios pasos de mutaciones y selecciones (Cuadro 4.5).

En cada paso se trata un cultivo con un mutágeno y se analizan las colonias resultantes. Si entre miles de colonias se encuentra una mutante que desarrolla una productividad claramente elevada, ésta sirve como punto de partida para un nuevo ciclo de mutaciones y selecciones. De esta manera se conduce la evolución de un organismo en una dirección no natural, hasta que se crea una cepa que garantiza el rendimiento económico. Estos métodos son muy largos, requieren trabajo intensivo y sus resultados no son previsibles en ningún caso.

No sólo los genes, sino también las condiciones de cultivo, influyen en el rendimiento en antibiótico.



Fig. 4.40 En el biorreactor de laboratorio se optimizan las condiciones del cultivo para cada microorganismo.

Cuadro 4.6 Historia de la biotecnología: Fleming, la penicilina y el inicio de la industria de los antibióticos

En un día de otoño del año 1928, el microbiólogo **Alexander Fleming** (1881-1955) revisó en su pequeño laboratorio del St. Mary's Hospital, en Londres, diferentes cultivos de pus producido por bacterias (estafilococos). El laboratorio estaba lleno a rebosar de placas de Petri, en las cuales las bacterias crecían sobre un nutriente de agar-agar. ¡Pero el desorden puede ser provechoso!

Fleming había infectado algunas placas con bacterias antes de sus vacaciones de verano. Ahora estaban cubiertas de colonias bacterianas claramente visibles. En algunas placas de Petri también crecieron, sin embargo, mohos. Había sido un verano fresco, y las bacterias no habían crecido lo suficientemente rápido.

Melvin Pryce, colega de Fleming, fue testigo ocular del momento estelar de la ciencia. La historia está escrita en el libro de André Maurois "Alexander Fleming".

Fleming, durante la charla, cogió con la mano un par de placas con cultivos viejos y abrió la tapa. Varios de los geles estaban cubiertos con moho. Algo cotidiano. "Se necesita sólo abrir una placa –dijo Fleming– y aparece una alteración. Siempre entra algo de aire dentro". De repente la devolvió dentro, siguió un momento de observación en silencio, y entonces dijo con voz más indiferente: "*That is funny...*". En la placa que tenía delante crecía una colonia de moho especialmente magnífica.

Era extraño que alrededor de la colonia del hongo hubiera una zona libre de bacterias.

¿Ahí no asentaba ninguna bacteria, o es que morían? Evidentemente, los mohos prevenían la expansión del estafilococo.

Cuando Pryce percibió el interés de Fleming, dijo: "Así descubrió usted la lisozima en su momento, ¿verdad?" Fleming no dio ninguna respuesta. Cogió una muestra del moho con unas pinzas de platino y la trasladó a un tubo con gelatina como nutriente.

Fleming colocó la placa de Petri a un lado. La debía proteger durante toda su vida como un tesoro. "Mire usted esto, es interesante. Me gustan estas cosas: podrían ser importantes." Fleming la mostró a otros colegas. Vista la placa, la devolvieron educadamente: "Sí, muy interesante".

En los días siguientes Fleming reprodujo el hongo sobre el nutriente, que había liberado de microbios mediante calefacción. Acto seguido sembró, alrededor del moho, diferentes bacterias grampositivas: cadenas formadas de estreptococos, estafilococos en forma de racimos y neumococos. En realidad no se extendieron todas hasta inmediatamente cerca del hongo. Las bacterias gramnegativas, como *Escherichia coli* y tipos de *Salmonella*, siguieron creciendo más allá. Fleming denominó a "su" moho, representante de los mohos con esporangio en forma de pincel, del género *Penicillium*, más exactamente como *Penicillium notatum*.

Reprodujo entonces el hongo en un recipiente mayor, con un medio nutriente líquido. Una mancha verdosa de hongo cubrió pronto, como un césped, la superficie del medio, que tras algunos días se coloreó de amarillo dorado. En los nuevos experimentos con bacterias se vio que el medio nutriente solo también inhibía la proliferación de las bacterias. El moho con esporangio en forma de pincel debía, pues, de alguna manera, liberar al entorno materia hostil para las bacterias. Fleming la llamó penicilina por su productor.

Los estreptococos, los estafilococos, los causantes del carbunco (antrax), la difteria, la fiebre glandular de Pfeiffer y el tétanos se inhiben con penicilina.

Fleming no sospechaba que había hecho un importante descubrimiento con la penicilina, que iba a salvar la vida de millones de personas. Otros experimentos demostraron, sin embargo, que la penicilina sólo daña bacterias, pero no conejos vivos. Fleming no intentó por sí mismo obtenerla en forma pura y luchar contra las bacterias causantes de enfermedades en animales de laboratorio.

A su artículo en el *British Journal of Experimental Pathology* no se le dio apenas importancia. En 1940, Fleming todavía escribió que no valía la pena producir penicilina. Su interés principal por la penicilina era el aparente efecto selectivo de diferentes tipos de bacterias. Con su ayuda se pudieron clasificar mejor los tipos. En esa época, otros investigadores ya eran conscientes de la sustancia inhibidora de bacterias.

En 1938, **Ernst Boris Chain** (1906-1979), en la Universidad de la ciudad inglesa de Oxford, conocía el hongo. Con el comienzo de la Segunda Guerra Mundial, en 1939 se presentó de pronto una necesidad enorme de remedios para luchar contra las infecciones bacterianas de las heridas. En Oxford, el emigrante ucraniano-judío Chain empezó, bajo la dirección del australiano **Howard Florey** (1898-1998), un trabajo febril. Obtuvo penicilina, la purificó de los materiales acompañantes del medio nutriente y evaluó el polvo amarillo en ratones que habían sido infectados antes con bacterias causantes de enfermedades.



Ernst Boris Chain (1906-1979)



Howard Florey (1898-1998). Según la opinión de su biógrafo australiano, ha sido el único australiano que proporcionó algo útil para la humanidad.

Los ratones sanaban en un tiempo breve. ¡Esto era sensacional! Los gobiernos de Gran Bretaña y de Estados Unidos apoyaban ahora los esfuerzos para obtener penicilina en cantidades suficientes. Debido al significado militar, el proyecto se mantuvo absolutamente secreto.

En verano de 1941 se probó por primera vez la penicilina en un paciente de 43 años que sufría una peligrosa infección por estafilococos y estreptococos. Aunque primero consiguió mejorar brevemente, el paciente murió un mes más tarde. La cantidad de penicilina disponible era demasiado baja, aunque se obtenía de nuevo de la orina del enfermo, que la mujer de Florey llevaba cada día al laboratorio. Florey y Chain debían producir primero grandes cantidades de penicilina antes de poder curar con éxito a los primeros enfermos.

En julio de 1941 los británicos Howard Florey y **Norman Heatley** empezaron con el trabajo conjunto en Peoria, en Illinois. Pronto se llamó a compañías como Merck, Squibb, Lilly y Pfizer, sólo pocos meses antes de que Estados Unidos entrara en la guerra.

Cuando Heatley y Florey fueron a Estados Unidos, en 1941, no tuvieron grandes resultados para mostrar: 4 unidades/mL (1 unidad (*unit*) = 0,6 microgramos). Consultaron a la Academia Nacional de Ciencias y Charles Thom, un experto en *Penicillium*, les recomendó que fueran a la nueva unidad de fermentación del recién fundado Northern Regional Research Laboratory (NRRL), en Peoria, Illinois. **Charles Thom** (1872-1956) fue el primero en tener *Penicillium roqueforti* y *P. camemberti*, los hongos activos en la elaboración del queso (véase Cap. 1).



Norman Heatley (1911-2004) es en la práctica el héroe silencioso de la historia de la penicilina. Heatley inyectó a ocho ratones, el 25 de marzo de 1940, 110 millones de estreptococos a cada uno, y a la mitad de ellos les inyectó penicilina una hora más tarde: isobrevivieron! El comentario del jefe Florey, con cierta indiferencia ante los ratones vivos, fue "*Looks quite promising*" (parece muy prometedor).
Heatley no recibió el premio Nobel, pero en 1990 fue el primer doctor galardonado de la Universidad de Oxford en su historia de 800 años.



Laboratorio en Peoria.



Charles Thom (1913-1955) identificó la cepa de *Penicillium*.

Un problema: la cepa de Fleming crecía sólo en la superficie (emergente). En el mundo entero, el ejército americano buscaba ahora *P. chrysogenum*, causante de fiebre, que podía crecer sumergido.

Una simple ama de casa (la colaboradora del laboratorio **Mary Hunt**, la legendaria *Mouldy Mary*) llevó en 1943 un melón del mercado de Peoria enmohecido con *Penicillium chrysogenum*. Sumergido, este hongo produjo 70-80 unidades/mL; un mutante aislado de un único conidio, incluso 250 unidades/mL. La cepa de *Penicillium chrysogenum* NRRL, aislada del melón *cantaloupe* en 1951, fue la madre de las principales cepas modernas.

El equipo de la penicilina inventó, en lugar de un cultivo superficial, la tecnología *deep-tank* para la producción masiva de penicilina. Éste fue el momento del nacimiento de la industria de los antibióticos. A finales de noviembre de 1941, **Andrew J. Moyer**, experto en alimentos para mohos, con Norman Heatley pudo elevar el rendimiento 10 veces utilizando como sustrato agua de maíz (*corn steep liquor*). El maíz fue, para la economía americana, una planta dominante (véase también Cap. 3 para el jarabe de fructosa).

El laboratorio de Peoria se había creado, entre otros motivos, para encontrar una forma de eliminar estos desperdicios de maíz líquidos que en la producción del almidón de los granos de maíz se acumula en cantidades enormes como molesto producto colateral. El agua de maíz es una mezcla de almidón, azúcar y sustancia mineral.

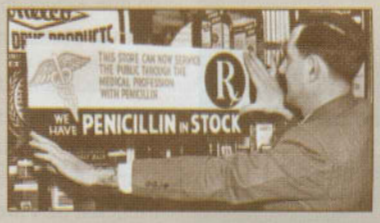
Más tarde se estableció que la nueva disolución de alimentación, además de azúcar, contiene una sustancia que es un precursor químico de la penicilina. Esto facilita la producción natural del moho.

La War Production Board de Estados Unidos empezó como proyecto en todas partes, por ejemplo en la Universidad de Wisconsin-Madison, donde **J.F. Stauffer** y **Myron Backus** analizaron miles de mutantes inducidos por radiación UV (véase Cuadro 4.5). Backus y Stauffer lograron elevar la producción de 250 a 900 unidades/mL. La mutagénesis adicional produjo 2500 unidades/mL. Otras universidades se involucraron: Stanford, Minnesota y la Carnegie Institution en Cold Spring Harbor.



Producción de penicilina en Oxford en 1940.

A finales de 1942, en Estados Unidos trabajaban con la penicilina 17 compañías.
El 1 de marzo de 1944 se inauguró la primera gran instalación con cultivo sumergido en Brooklyn, NY. La producción saltó de 210 millones de unidades en el año 1943 a más de 6,8 trillones de unidades en el año 1945. En mayo de 1943 se trataron con penicilina en un hospital 1500 militares. Sólo un año más tarde se salvaron innumerables heridos del día D (6 de junio de 1944) gracias a la penicilina. Las proporciones habían aumentado desde botellas de 1 litro con menos de un 1% a tanques de 10 000 galones (un galón son 3,8 litros) con un contenido en penicilina del 80 a 90%.

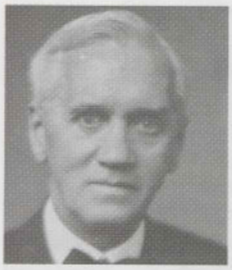


Cliente satisfecho: la penicilina se vendía en 1945 en todas las farmacias de Estados Unidos.

A partir del 15 de mayo de 1945 se tuvo libre acceso a la penicilina en todas las farmacias de Estados Unidos.

Fleming, Florey y Chain recibieron en 1945 el premio Nobel. Hasta el día de hoy se lamentan los británicos de haber persuadido a Florey de no registrar ninguna patente de la penicilina por motivos éticos.

La Universidad de Oxford no consiguió nunca una parte de la fantástica obtención de la penicilina de los americanos. Más grave aún: ¡el Reino tuvo que pagar durante años la cuota de licencia a las compañías de Estados Unidos!



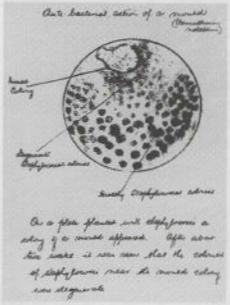


Fig. 4.41 Alexander Fleming y sus notas de laboratorio sobre las placas de Petri con bacterias lisadas con penicilina.



Fig. 4.42 Sobre un melón cantalupo (*cantaloupe*) se encontró el hasta entonces más potente productor de penicilina (experimento realizado por el autor).



Fig. 4.43 Moderna producción de penicilina en cultivo sumergido.

Al principio se encuentran fácilmente mutantes ventajosas, cuyo rendimiento se mide según las colonias individuales crecientes sobre las placas. Pero finalmente se mejoran las cepas en el laboratorio, también si es posible analizando condiciones similares a las de los enormes reactores. A pesar de estas dificultades se producen hoy más antibióticos, como la penicilina, a partir de cepas altamente productivas, que se desarrollaron en 20 o 30 ciclos de selección –un trabajo que duró dos o más décadas.

4.14 *Penicillium notatum*: el hongo milagroso de Alexander Fleming

La mayoría de nosotros no hemos vivido la época en que los médicos se enfrentaban casi sin recursos a las infecciones bacterianas graves. Una dermatitis bacteriana provocaba casi inevitablemente la muerte. Los pocos casos de meningitis causadas por meningococos que sobrevivían, sufrían discapacidades mentales. Las infecciones pulmonares producidas por neumococos se conocían con el nombre de "amigo del viejo" porque concedían una "muerte misericordiosa" a las personas ancianas.

Con este trasfondo, la penicilina debió aparecer como una medicina milagrosa, con su elevada eficacia contra un gran número de bacterias patógenas y su bajísima toxicidad. En 1928, el conocido microbiólogo **Alexander Fleming** (1881-1955), al cual conocíamos por la lisozima (Cap. 2), observó que *Penicillium notatum* inhibía determinados cultivos bacterianos (Fig. 4.41).

La penicilina marcó el principio de una nueva era en la lucha contra la enfermedad. El Cuadro 4.6 describe detalladamente este descubrimiento, que al principio infravaloró el propio Fleming, y la contribución de **Florey**, **Heatley**, **Chain** y otros. Las posteriores curaciones de infecciones bacterianas lindaban con el milagro. Pero la preparación de la penicilina era demasiado difícil y demasiado cara. Para tratar solamente un único paciente se debían obtener y procesar aproximadamente 1000 litros de "mezcla de hongo".

Se debían solucionar tres problemas:

- había que encontrar un tipo de moho con esporangio en forma de pincel con la mayor producción de penicilina (Cap. 4.15)
- generar el hongo en enormes cantidades (4.16)
- definitivamente, se necesitaban procedimientos para separar la penicilina pura del medio nutriente (4.17).

4.15 *Screening*: biotecnólogos a la caza de hongos

En el mundo entero se buscó con gran esfuerzo un mayor productor de penicilina que el *Penicillium notatum* de Fleming. Se cultivaron los hongos encontrados en medios de nutrición y se analizó la capacidad de producir penicilina. Para la búsqueda selectiva de microorganismos se desarrolló un programa de *screening*. La palabra inglesa *screening* significa filtrar con un colador (cribado) (Cuadro 4.5).

La búsqueda de los mejores productores empezó a avanzar después de que el gobierno estadounidense participara en el proyecto de la penicilina decisivo para la guerra. En el laboratorio de investigación americano de Peoria, Florey encontró el soporte activo. Hasta 1943, sin embargo, no se había podido encontrar un mejor productor de penicilina que el hongo de Fleming.

Precisamente en la puerta de casa, en la misma Peoria, se encontró el moho que más tarde se denominó ***Penicillium chrysogenum***, o sea, de otro tipo que el hongo de Fleming. Se encontró sobre el melón cantalupo (*cantaloupe*) (Fig. 4.42) y resultó ser un moho enormemente productivo. Actualmente se cultiva este moho. Aún hoy, la mayor parte del moho con esporangio en forma de pincel utilizado para fabricar penicilina procede del melón de Peoria.

De modo similar a la reproducción de animales y plantas, siempre son los mohos de mayor eficacia los que proliferan, y durante generaciones se han venido obteniendo hongos de gran eficacia.

En la década de 1920 se determinó que la composición genética se cambiaba artificialmente. Los rayos X y determinados productos químicos provocan grandes **mutaciones** en las células. En los mohos con esporangio en forma de pincel, los investigadores utilizaron los rayos X, la radiación ultravioleta y el tratamiento con productos químicos (gas mostaza), y se eligieron entonces los mejores formadores de penicilina. En conjunto, estos mohos se sometieron a tales procedimientos más de 20 veces (Cuadro 4.5). Los mejores mutantes de los hongos produjeron finalmente siete gramos de penicilina por litro.

El **hongo de alta eficacia** actual se diferencia mucho de su predecesor de principios de los años 1950. Forma como media 100 g de penicilina en un litro de caldo nutriente, que es 2000 veces más que la que podía formar el hongo unido al melón. ¡Se producen 20 000 veces más que la que produ-

Cuadro 4.7 Cómo funciona la penicilina: inhibidores de enzimas que actúan como moléculas sucedáneas

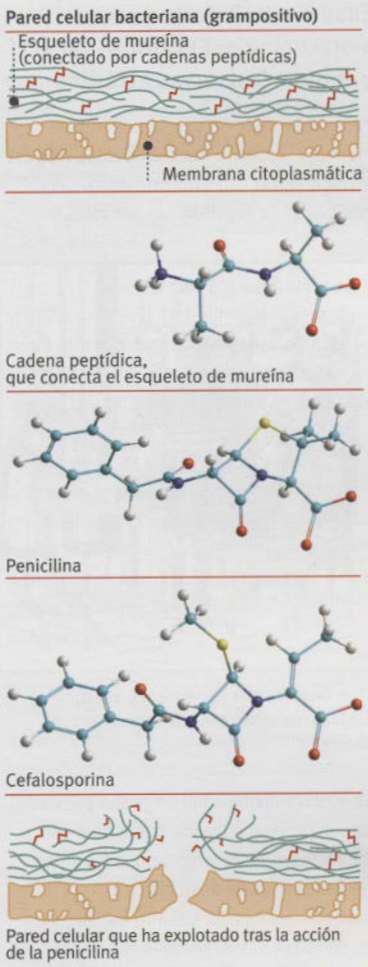
El desarrollo de la penicilina fue una etapa muy importante para el nacimiento de una bioindustria moderna. Sin embargo, por qué la penicilina mata a determinados microbios permaneció durante mucho tiempo sin aclararse.

Hoy sabemos que las bacterias, al crecer, toman penicilina junto con los medios nutrientes. Las bacterias deben unirse durante su división a las nuevas paredes celulares mediante cadenas laterales de aminoácidos con la ayuda de sus enzimas especiales constructoras de paredes. La penicilina inhibe estas enzimas durante su trabajo. Es una "molécula sucedánea", es decir, la penicilina ve su sustrato engañosamente similar, se une e impide así la transformación del sustrato "auténtico" en un elemento de la pared. Esto se denomina **inhibición competitiva**.

El mecanismo de acción lo aclaró en 1957 el posteriormente ganador del premio Nobel **Joshua Lederberg** (nacido en 1925). Mediante un experimento se demostró que la penicilina simplemente impide la unión de la pared celular bacteriana. En la disolución nutriente, que tenía un elevado contenido en sal, las bacterias pudieron crecer a pesar de la presencia de penicilina, pero no se formó ninguna pared celular. Se obtenían así protoplastos de bacterias "desnudas", sin pared celular, que si se transferían a un medio nutriente normal explotaban porque les faltaba la protección de la pared celular.

En 1965 **James Park** y **Jack Strominger** describieron el mecanismo de acción exacto de la penicilina: la pared celular de las bacterias consta de largas cadenas de azúcar (mureína) que están conectadas mediante cadenas polipeptídicas (peptidoglicanos). Esta formación de puentes se cataliza con la enzima **glicopéptido transpeptidasa**. La penicilina bloquea esta enzima, ofreciéndose como perfecta imitación de un puente proteico y causando de este modo el final de la producción de la pared celular de las bacterias. El resultado de la acción perturbadora de la penicilina es catastrófico para las bacterias: se originan lugares no estancos en las paredes celulares y éstas ya no pueden mantener la presión osmótica de la célula, que se hincha y explota.

La penicilina inhibe, pues, la proliferación de las bacterias, pero no mata las bacterias adultas. ¡Por ello no es suficiente tomar penicilina solamente durante el tiempo en que uno se siente enfermo! En el momento en que se divide una bacteria, la penicilina puede ejercer su acción inhibidora sobre el crecimiento bacteriano. Por ello, la penicilina se administra durante varios días y es muy peligroso interrumpir el tratamiento arbitrariamente, en contra de la prescripción médica, en cuanto uno experimenta una cierta mejoría. Los microbios supervivientes se recuperan entonces rápidamente, proliferan, y el paciente puede sufrir una grave recaída. Los microbios supervivientes incluso se han hecho en parte resistentes y aceleran la lucha entre humanos y microbios.



Acción de los antibióticos con un anillo de lactama: ambos impiden por su similitud a la cadena peptídica las conexiones cruzadas de las cadenas de mureína.

cía el hongo de Fleming! Los grupos de microbios de un tipo que se diferencian fuertemente en sus propiedades, y también las heredan, se denominan cepas. Las **cepas de alta eficacia** son generalmente tan delicadas y tan mimadas por los biotecnólogos que no podrían sobrevivir en condiciones normales naturales (al igual que muchos de nuestros animales domésticos).

El supermoho no utiliza su propia capacidad de formar 1000 veces más penicilina que su predecesor. Esta sobreproducción la fuerzan los humanos, modificando su programa hereditario y cambiando sus condiciones de vida, de la misma forma que un animal doméstico moderno puede existir y reproducirse sólo en un mundo artificial, a temperaturas agradables, con alimentación suficiente y apropiada, y protegido de competidores y enemigos naturales.

4.16 El menú de los microbios

¿Qué necesita un microorganismo para encontrarse bien? Primero, comida. Preferentemente los microbios "comen" las sustancias orgánicas fácilmente digeribles, elementos básicos como glucosa, ácidos grasos y aminoácidos. Las sustancias complejas, como almidón, celulosa, pectinas y proteínas, en general no pueden utilizarlas directamente. Se deben preparar fuera de la célula. Para ello sólo hay un camino para los microbios: las **enzimas extracelulares** (Cap. 2). Por ejemplo, para degradar almidón a glucosa, las células deben segregar amilasas a su entorno (el medio). Se podría ver como un tipo de digestión externa.

En el medio, las **amilasas** fragmentan el almidón hasta que los microbios están rodeados de glucosa,



Fig. 4.44 Pequeño fermentador para la producción de antibióticos en un trabajo preliminar de Jenapharm.

Cuadro 4.8 Historia de la biotecnología: El calor, el vacío y el frío – Conservas estériles

Ya 50 años antes del descubrimiento de Pasteur, el cocinero francés **Nicolas Appert** inventó –sin el conocimiento de los microbios vivos – la esterilización por calor.



El cocinero Nicolas Appert (1749-1841), fundador de la industria de conservas con Napoleón.

En 1795, Napoleón fijó un precio por encontrar un proceso utilizable para poder hacer duraderos durante largo tiempo los alimentos de la campaña de su ejército. Appert trabajó 14 años en ello. Calentó los alimentos en botellas y vasos, y tapó el contenido impermeable al aire con corchos. El principio obturador de vacío se consiguió con los experimentos realizados por **Otto von Guericke** (1602-1686) y **Denis Papin** (1647-1712).

Otto von Guericke se hizo famoso con el experimento histórico ante el Parlamento Alemán, en Regensburg, el año 1654, con los denominados "hemisferios de Magdeburgo", con los cuales demostró a sus asombrados espectadores el tamaño y la fuerza de la presión del aire. Para demostrar la capacidad de trabajo de la presión del aire, en 1657 Guericke intentó separar, hasta con 16 caballos, las dos mitades de una esfera vacía por bombeo. Él no sabía que había descubierto con ello una parte esencial del proceso de preparación de conservas: el cierre al vacío de los frascos.

Las conservas de Appert duraban meses; también las probó la marina francesa. En 1809, Appert consiguió 12 000 francos de oro, ¡una fortuna! Hoy serían, según los cálculos de algunos historiadores, 250 000 euros). Divulgó su método y con ello fue el fundador de la moderna industria de conservas.

En 1810, el británico **Peter Durand** solucionó el problema de la rotura del cristal en las conservas: fabricó latas de acero forradas con estaño. Había nacido la lata de conservas. Los británicos llamaron a la carne en conserva *embalmed meat* (carne embalsamada).

El 19 de mayo de 1845 partió de Londres una expedición. A bordo de dos embarcaciones se encontraban los 134 mejores oficiales y equipos de la marina británica bajo el mando del experto polar **Sir John Franklin**. Su objetivo era explorar el paso norte-oeste. Nunca antes se había equipado a una expedición de este tipo con tanto lujo: calderas de agua caliente para la calefacción, hélices de barco accionadas por presión de vapor, placas de hierro como protectores para el hielo, y conservas y combustible para al menos tres años. Nadie podía sospechar que ninguno volvería vivo de ese viaje. Una tragedia incomprensible del siglo XIX: ¿cómo no se pudo salvar un equipo tan experimentado? En 1986 se liberaron del hielo tres de los marinos enterrados en él y se investigaron cuidadosamente. La tripulación de Franklin no murió, como se había supuesto, de hambre, frío o escorbuto, sino de un masivo envenenamiento por plomo. Los asesinos fueron las latas de conserva de las provisiones, en ese momento todavía un nuevo descubrimiento. Se habían cargado 8000 latas en las embarcaciones, que estaban soldadas con plomo y, según el fabricante de estos suministros había confesado, debido a una obvia presión de tiempo, en el interior de las latas se habían hecho juntas de soldadura. Una gran cantidad del infinitamente venenoso plomo fue captado por los marinos con la alimentación diaria y produjo el envenenamiento. Los metales pesados destruyen los puentes disulfuro en las proteínas y actúan con ello como inhibidores de enzimas (véase Cap. 3). Los síntomas típicos de la enfermedad eran anorexia, agotamiento, irritabilidad, paranoia, pérdida de concentración, incapacidad para tomar decisiones claras... Se encontró la prueba en los análisis de los tejidos en los cadáveres encontrados: una sobredosis de plomo de aproximadamente diez veces.



Propaganda para el aparato de enlatar y un frasco de vidrio con piña del año 1897.

Casi 100 años tras la expedición de Franklin, el estadounidense **Clarence Birdseye** (1886-1956) fue a una expedición al Labrador para el Servicio Geográfico de Estados Unidos.



Fig. 4.45 El autoclave utiliza vapor a presión para esterilizar medios nutrientes.

que puede ser captada fácilmente. Si utilizan proteínas, las células liberan las proteasas fragmentadoras de proteína, y de la degradación de la celulosa en el medio se ocupan las celulasas (Cap. 2).

En la industria se utilizan, junto con la glucosa, también el almidón y el azúcar de remolacha. El almidón proviene de los cereales, el azúcar del maíz o de la melaza. La **melaza** es un residuo oscuro, viscoso, que se acumula en la producción de azúcar y contiene aproximadamente la mitad de azúcar de remolacha. El **almidón** insoluble en agua se cuece primero y con ello se hace soluble, y con la ayuda de las amilasas, que se obtienen de los microbios, se degrada a azúcar. Otros alimentos, como los aminoácidos, provienen de la harina de las habas de soja, del agua de maíz (*corn steep liquor*) o del concentrado, el producto residual de la fabricación de cerveza.

Finalmente, para su crecimiento los microorganismos también necesitan sales minerales (sales de amonio, nitrato, fosfato) y, según el tipo, más o

Notó que el pescado y la carne de caribú, expuestos al helado aire ártico, aún estaban frescos meses después de su cocción. Llegó a la conclusión de que la congelación rápida a temperaturas extremadamente bajas era el secreto de la frescura. Desarrolló entonces en Estados Unidos su *Multiplate Quick Freeze Machine*, patentada, y congeló en un instante carne a 40° Fahrenheit. En 1925 se produjo el primer filete de pescado congelado, y luego vinieron otros alimentos. Tras el desastre inicial, ya no era posible imaginar la vida de los americanos sin comida congelada.



Johann Weck (izquierda) y Georg van Eyck (derecha).

En la Segunda Guerra Mundial, el estaño era escaso debido al control inicial de los japoneses sobre el Pacífico. Además, todas las latas de estaño disponibles se desviaban en Estados Unidos para el consumo por parte del ejército –¡un inicio ideal para *Frozen Food* de Birdseye, pues no se necesitaban latas de estaño!

Una forma "muy alemana" de conserva es el enlatado; los inquietos americanos nunca habrían dedicado tiempo a eso.

En Alemania, **Rudolf Rempel** (1859-1893) consiguió una patente de su método en 1892. Su esposa escribió más tarde a la compañía Weck: "han pasado 50 años desde que mi difunto marido, el Dr. Rudolf Rempel, químico en la compañía para destilación del carbón en Gelsenkirchen, hizo los primeros experimentos para esterilizar los productos alimentarios. En ellos utilizó vasos de los laboratorios químicos, cuyo borde había pulido. Equipó los vasos con un anillo de goma y una tapa de hojalata y cocinó el alimento al baño María, colocando un objeto pesado (piedra o peso) sobre la tapa del vaso.

La leche esterilizada, que él abrió meses más tarde cuando fue de visita al laboratorio, para preparar café, sabía maravillosamente fresca. Entonces empezaron los experimentos en casa, los domingos en que no trabajaba, con fruta y verduras, que recogíamos en nuestro gran jardín. Yo pulí los vasos en el fregadero con la ayuda de polvo esmerilado, lo que no me dio poco trabajo, y probamos a esterilizar todos los posibles tipos de fruta y verdura con buena apariencia. Algunos vasos no cerraron, pero los cerrados mantuvieron fantásticamente su contenido. Ahora trataba de fabricar un aparato que mantuviese la tapa del vaso mientras se cocía. Un aparato en el que se enroscaran los vasos al cocer se aplicó en unos pocos casos. Construyó entonces un aparato que sostenía los vasos bajo presión elástica. (...)

Entre los primeros clientes había un tal señor **Johann Weck**. Él mostró un gran interés por el material y pidió un vagón entero de vasos. En el año 1895, Weck, tras comprar la patente de Rempel, se trasladó a la frontera suiza, hacia Öflingen, cerca de Säckingen, en Baden."

Un comerciante muy capacitado, **Georg van Eyck**, fundó junto con Johann Weck, el 1 de enero de 1900, la compañía J. Weck & Co.

El mismo Weck dijo: "No hubo paciencia, la compañía abandonó por razones personales y familiares pronto tras su fundación, en el año 1902, con un gran acuerdo" (citado de un escrito de la compañía). Georg van Eyck entrenó a sus compañeros de trabajo y organizó en todo el país con ahínco la introducción y la venta del vaso de Weck y del aparato de Weck. Introdujo profesoras de economía doméstica, que daban conferencias en escuelas de cocina, parroquias y hospitales con instrucciones prácticas sobre los vasos y aparatos, y mejoró constantemente los vasos de cocción, los anillos de goma, los aparatos de cocción, los termómetros y aparatos auxiliares, que se vendieron bajo la marca *Weck®*. Sus agradecidas destinatarias fueron las ahorradoras e industriosas amas de casa alemanas –¡un éxito completo!

Con la marca *Weck®*, Van Eyck creó uno de los primeros artículos de marca en Alemania y estableció un anuncio sumamente progresista, en el que como indicativo de marca (*Trademark*) se utilizó una fresa con la palabra Weck escrita.



Anuncio de la compañía Weck para preparados alimentarios.

menos oxígeno. Algunos microbios, como las metanobacterias, deben protegerse completamente del oxígeno, porque es tóxico para ellas.

Cuando se empezó a cultivarlos durante la Segunda Guerra Mundial, primero se utilizaron medios nutrientes que contenían glucosa y también sales minerales.

Los hongos utilizaban el azúcar y crecían rápidamente. Sin embargo, formaban poca penicilina. Casualmente se encontró, en el laboratorio de Peoria, un medio nutriente ideal, que es más barato y bueno para la producción de penicilina: el agua de maíz. Las ironías de la historia: en Peoria se había creado especialmente un departamento para buscar formas de eliminar el agua de maíz sin producir contaminación.

Igual que para los mohos con esporangio en forma de pincel, para cada tipo de microbio se debe encontrar la mezcla de alimentación apropiada; además, debe ser lo más barata posible. En realidad se dejan para el pienso todos los productos residuales que contienen azúcar, por ejemplo residuos de la agricultura o aguas



Fig. 4.46 Para cada microorganismo (aquí bacterias) debe encontrarse la apropiada mezcla de nutrientes.

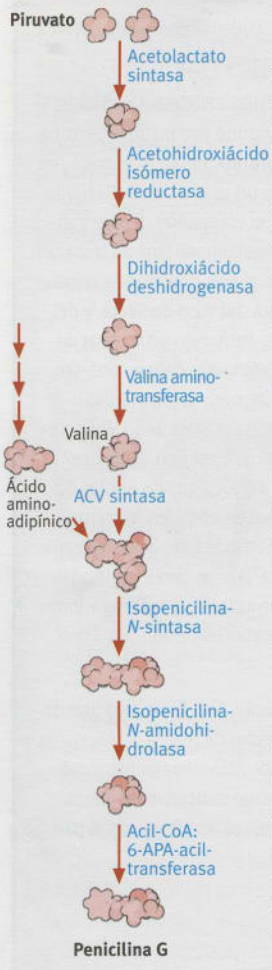


Fig. 4.47 Biosíntesis de penicilina en la célula a partir de piruvato.

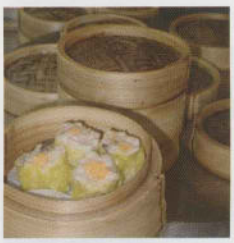


Fig. 4.48 Los paquetitos de masa chinos (*Dim sum*) se cocinan en cestos de bambú sobre vapor de agua, y con ello los microbios mueren de modo efectivo.

residuales de las fábricas de celulosa. Los microorganismos especiales son capaces incluso de utilizar materias difícilmente digeribles, como residuos del petróleo y productos de desecho plásticos. Con ello es posible utilizar materiales que, de lo contrario, alcanzarían las aguas residuales o intoxicarían de otra manera nuestro entorno. Estas materias no son sólo baratas sino que sería muy caro conseguirlas de otra manera. La biotecnología explota reservas de pienso que de lo contrario no se utilizarían, y ayuda al mismo tiempo a mantener limpio el medio ambiente.

4.17 La biofábrica moderna

¡Ninguna chimenea humeante! Contenedores de acero inoxidable colocados verticalmente en un espacio claro, soldado, de la medida de una cisterna, que están rodeados de un laberinto de gasoductos, válvulas y aparatos indicadores. Fuera, a cielo abierto, se encuentran otros colosos de acero, grandes como altos hornos. Los contenedores de acero se denominan **biorreactores** o **fermentadores**.

Los biorreactores modernos (Cuadro 4.10) son verdaderos prodigios de la técnica y el resultado de décadas de trabajo de investigación. Para su desarrollo, la "caza" de la penicilina fue un impulso decisivo. Cuando Florey, Chain y Heatley buscaron recipientes para reproducir los mohos con esporangio en forma de pincel, empezaron con un pequeño frasco plano de cristal.

En la superficie de la solución nutriente (**cultivo Emmer**) nadaban los hongos. Con ello nunca se pudo producir tanta penicilina como para cubrir la demanda para curar a personas enfermas. Los frascos de vidrio necesitaban un espacio. Los científicos se dijeron que el hongo no debía crecer solamente en la superficie, sino prosperar en el conjunto de la solución nutriente sumergidos, pues su reproducción sería sencilla y ahorraría espacio.

Sin embargo, la cepa salvaje de *Penicillium notatum* de Fleming se podía multiplicar solamente en la superficie. Por fortuna, se encontró en Peoria una nueva cepa de *Penicillium chrysogenum* que, al mismo tiempo, ¡era buena "buceadora"!

Crece también en un **cultivo sumergido** si se consigue enriquecerlo con oxígeno, como cuando se bombea oxígeno para los peces en un acuario. Para bucear, el hongo necesitó a **Andrew Moyer** en Peoria (véase Cuadro 4.6).

Para la producción de penicilina hoy se utilizan principalmente biorreactores con 100 000 a 200 000 litros de capacidad. En los reactores de laboratorio sólo caben algunos litros de solución nutriente, para producir nuevos descubrimientos sobre los microbios. El éxito depende del trabajo conjunto de científicos, ingenieros y constructores; un proceso biotecnológico que genera buenos resultados en el laboratorio, también funciona en biorreactores industriales 10 000 veces más grandes. Pero la ampliación del patrón (*scaling up*) suele ser un problema complicado (Cuadro 4.10).

Naturalmente, para que los microbios se encuentren bien también es importante la **temperatura** del medio. La "temperatura de confort" de los organismos principales se encuentra en un intervalo de 20 a 50 °C; se producen pues, preferentemente, a temperaturas desde normales hasta tropicales. Por ello descubrimos pocas chimeneas en la biofábrica. Por el contrario, para la producción de sustancias en la industria química se requieren temperaturas de más de 100 °C.

No obstante, los procesos biotecnológicos a menudo requieren **refrigeración**, y a veces ésta es más cara que la calefacción. Así, como muchos seres humanos en un pequeño espacio, los mohos y otras células en el biorreactor producen por su metabolismo un exceso de calefacción. Las paredes del biorreactor deben refrigerarse con agua para evitar un sobrecalentamiento mortal.

4.18 Calor, frío y sequedad nos mantienen los microbios en el cuello

En los biorreactores, las perturbaciones invisibles causan grandes preocupaciones al biotecnólogo (Cuadro 4.10).

¿Qué necesitan las mejores cepas de penicilina, si en el biorreactor los microbios indeseados se alimentan del medio nutriente, inhiben el crecimiento del hongo o ceden materias tóxicas a la disolución de alimentación? Todos los medios nutrientes y también el aire bombeado hacia dentro deben calentarse durante un corto tiempo y así hacerlos libres de microbios (estériles).

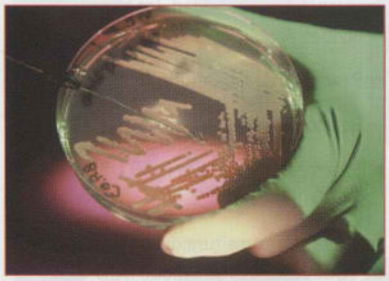
Los biorreactores también se esterilizan antes del inicio del crecimiento de los microbios. También el caldero se esteriliza con vapor. Hay otra estrategia para reducir el peligro de infección: si en el caldero existe una sobrepresión baja, a los gérmenes les es difícil entrar desde fuera. Especialmente grande es el peligro de infección en las válvulas de salida y entrada. Para garantizar aquí unas condiciones libres de gérmenes, se insufla vapor de agua caliente a través de los tubos de apertura de las válvulas.

El **calor** se aplica también al metabolismo (Fig. 4.48) y en la industria de alimentos para matar gérmenes,

Cuadro 4.9 Preparación biotecnológica de antibióticos - Cómo y dónde actúan

Hasta ahora se han aislado más de 8000 antibióticos de microorganismos y más de 4000 de organismos superiores.

Según su mecanismo de acción, los antibióticos pueden clasificarse a grandes rasgos en tres grandes grupos:



1. Inhibidores de la pared celular

Los **antibióticos β-lactama** (**penicilina, cefalosporina** y sus derivados), con un anillo lactama de cuatro miembros, son los más importantes. Se producen anualmente 30 000 t. Impiden el cruzamiento peptídico en la pared celular bacteriana. Los representantes más importantes son la penicilina G y la cefalosporina C, que se producen de forma semisintética.

Sobre la membrana celular de levaduras y hongos (no en bacterias) trabajan los **polienos**, que se unen preferentemente a estreptomicetos. Algunos, como la nistatina y la anfotericina B, se utilizan en las infecciones por *Candida*, y la pimaricina en la elaboración de queso. También el **glucopéptido** vancomicina, de *Amycolatopsis orientales*, inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana. Se aplica sobre todo como último recurso en infecciones por *Staphylococcus aureus* resistentes.

2. Inhibidores de la síntesis de proteínas

Las **tetraciclinas** son antibióticos de amplio espectro, y después de los β-lactama son los principales antibióticos que se utilizan. Tienen una cotización en el mercado de más de tres mil millones de dólares. Se unen a la subunidad 30S de los ribosomas (véase Cap. 3) y se forman exclusivamente de estreptomicetos.

Las **antraciclinas,** como la doxorrubicina, inhiben la replicación del DNA, sobre el cual se unen en el "surco" de la hélice e inhiben las topoisomerasas (las topoisomerasas modifican la "espiralización" de la hélice del DNA y desempeñan, por lo tanto, un papel decisivo en la replicación, la transcripción y la recombinación).

El **cloranfenicol** de *Streptomyces venezuelae* es el primer antibiótico históricamente de amplio espectro y bloquea la peptidil transferasa de los ribosomas.

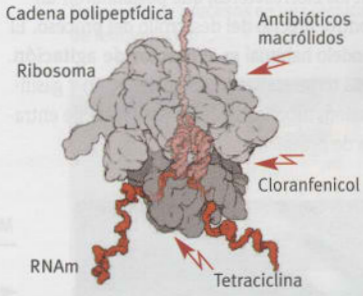
La **griseofulvina** es un antibiótico fungicida producido por fermentación que inhibe la división celular de hongos y la formación del huso celular. Se utiliza contra dermatosis y en plantas contra los hongos.

3. Inhibidores del DNA

Los **antibióticos macrólidos** inhiben las bacterias grampositivas uniéndose a la subunidad 50S de los ribosomas bacterianos, y con ello interrumpen la cadena polipeptídica creciente. La **eritromicina** y la **espiramicina** se utilizan en infecciones de las vías respiratorias. La eritromicina la produce *Streptomyces erythreus* (ahora *Saccharopolyspora erythrea*). La relacionada tilosina (contra micoplasmas) se utiliza en la disentería porcina (prohibida en la UE, permitida en China). Tienen una cotización en el mercado de 2600 millones de dólares americanos.

Las ansamicinas, como la **rifampicina**, un derivado semisintético, son los principales antibióticos contra la tuberculosis y la lepra. Inhiben la RNA polimerasa de las bacterias (pero no la de eucariotas, véase Cap. 3) mediante la unión a su subunidad β. La materia prima para la rifampicina se produce mediante *Nocardia mediterranei* (hoy *Amycolatopsis*). Los antibióticos peptídicos, como la bleomicina de *Streptomyces verticillus*, son importantes antibióticos cancerígenos. Para conseguir la inmunosupresión se utiliza la **ciclosporina**, que se forma en *Tolypocladium inflatum*. Anualmente se producen tres toneladas, con una cotización de 130 millones de dólares americanos.

Cada año se convierten cuatro toneladas de **bacitracina** de *Bacillus licheniformi*, por 100 millones de dólares, para curar heridas, y más de 200 toneladas por 20 millones de dólares para aditivos de pienso.



En el ribosoma se colocan la tetraciclina, el cloranfenicol y los antibióticos macrólidos. Inhiben la biosíntesis de proteínas de las células.

o sea microbios perjudiciales: pensemos sólo en el simple proceso de hervir o pasteurizar la leche, la elaboración de mermeladas de fruta o los procesos de conservas –en todos se matan bacterias y una gran parte de esporas de hongos mediante calor (Cuadro 4.8). Puesto que los recipientes están cerrados herméticamente al aire, no pueden entrar microbios ni tampoco el oxígeno que requieren los principales microorganismos para su crecimiento. Tan pronto como entra aire, se estropea el contenido. Nuestros padres recuerdan aún los tarros de conserva que no estaban bien cerrados y cuyo contenido se enmohecía.

Aparte de la temperatura elevada se puede utilizar también el **frío** (Fig. 4.49) para detener la proliferación indeseada de microorganismos. Puesto que los principales microbios requieren calor, los alimentos se protegen en la nevera o se congelan en el congelador. Así se inhibe el crecimiento de los microbios sólo temporalmente, pero no se matan. Muchos microorganismos sobreviven incluso a la temperatura del nitrógeno líquido, –196 °C, sin dañarse. Las comidas descongeladas deben utilizarse de inmediato para no ser un medio de alimentación ideal para los microbios que han despertado del sueño del frío.

Puesto que los microbios necesitan siempre **agua** para vivir, se puede impedir su crecimiento también mediante el secado (ciruelas secas, rosquillas, pescado seco). En la conserva en sal (arenques) o en una fuerte disolución de azúcar (jarabe) se extrae tam-



Fig. 4.49 Se usa el congelador (el que aquí se muestra alcanza –80 °C) para el almacenamiento durante largo tiempo de muestras bioquímicas infectadas. Para las células se utiliza nitrógeno líquido (–196 °C).

Cuadro 4.10 Biorreactores: Espacio para vivir y buenas condiciones para los microbios

En principio, el biorreactor, núcleo de toda instalación de producción biotecnológica, es una continuación del antiguo **tanque de fermentación**, con una periferia técnicamente compleja. El desarrollo del biorreactor empezó con sencillos fosos para desperdicios, y más tarde se utilizaron como contenedores recipientes de cuero, madera o cerámica, cubiertos, para la producción de alcohol y ácido acético. El auténtico avance se produjo primero con el trabajo de Pasteur y los conceptos de cultivo puro, esterilidad y producto puro.

Históricamente es significativo el **reactor superficial** para la producción de ácido cítrico y el **reactor de membrana**, que utilizan cuerpos de goteo en la purificación de aguas residuales aeróbicas. Ambos son fáciles de manejar, pero tienen un rendimiento espacio-tiempo bajo. Para la producción con levaduras de cocción de productos químicos orgánicos (acetona, butanol), y finalmente, de penicilina, fueron importantes en el siglo XX los biorreactores, que posibilitaron un control preciso del desarrollo del proceso. El modelo habitual es el **reactor de agitación**. Está termostatizado, tiene agitación y gasificación, tuberías estériles y válvulas de entrada de muestras.

Hoy se diferencian dos grandes grupos de procedimientos en los biorreactores: en el **procedimiento discontinuo** (procedimiento *Batch* o de cargas) se llena la caldera al principio con el material de partida completo y con los microorganismos. Entonces empieza la conversión bioquímica, que puede durar algunas horas o varios días. Finalmente se vacía el tanque y se purifica el producto de sustancias exógenas. Luego puede empezar un nuevo ciclo de producción.

En el **procedimiento continuo** se proporcionan constantemente al reactor los materiales de partida y se saca la cantidad correspondiente de la mezcla de reacción con el producto. Incorporación y salida deben igualarse una con otra, de modo que formen un equilibrio de flujo. Los procesos de producción continuos se parecen a los de una refinería de petróleo. La explotación por cargas se podría comparar, en cambio, con los métodos de producción en la cocción del pan.

Hay también una combinación de ambas: en la **producción semicontinua** los microbios permanecen hasta 90 días en el biorreactor, pero el medio se cambia a diario.

Finalmente, en la elección del procedimiento es crucial el punto de vista económico. En principio, los procedimientos continuos son más apropiados para grandes volúmenes de producción (por ejemplo en instalaciones de aguas residuales) que los discontinuos, a pesar de preferirse a menudo la explotación por cargas porque sólo se requieren pequeñas cantidades de producto. El biorreactor no se modifica en la fabricación de otros productos y puede mantenerse estéril fácilmente.

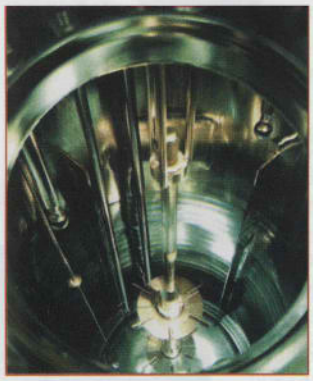
Hay diversos tipos de biorreactores, que pueden clasificarse de manera diferente.
En cuanto a su capacidad, los biorreactores se dividen en:

- Reactores de laboratorio (< 50 L)
- Reactores de investigación (50- 5000 L)
- Reactores industriales (>50 L hasta 1 500 000 L).

Según la relación altura:diámetro se diferencia entre reactores de tanque (A:D = 3) y reactores en columna (A:D > 3).

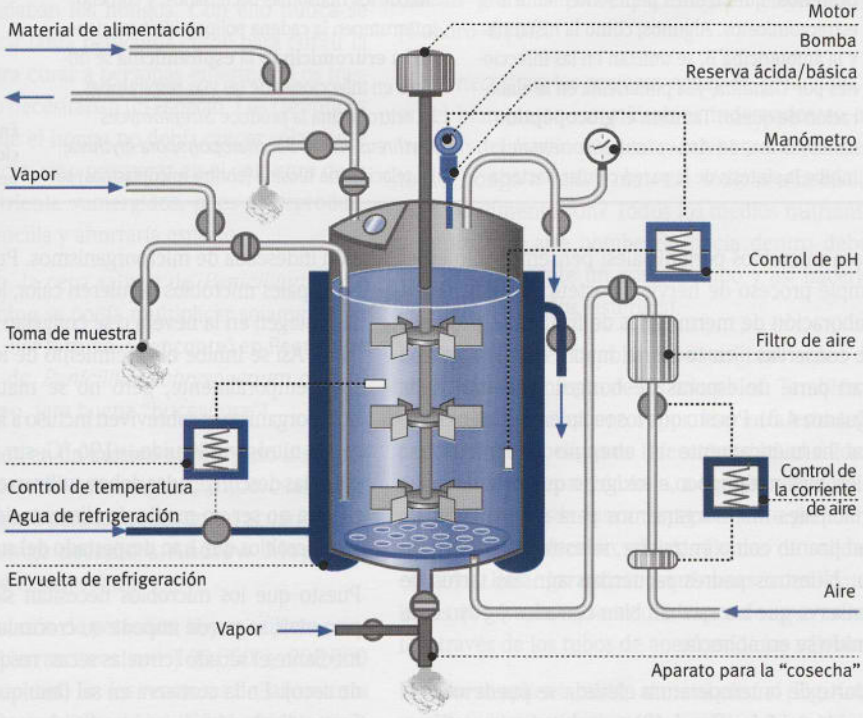
Según el tipo de rendimiento de energía, los reactores se pueden clasificar en:

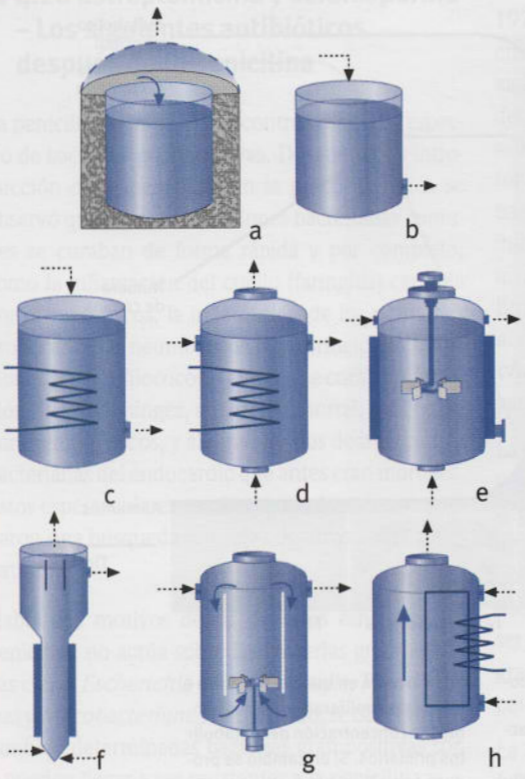
- Reactores agitados mecánicamente (reactores de calderos de agitación o reactores de tanques agitados), que son los más versátiles, por ejemplo para la producción de antibióticos
- Reactores con bomba de flujo colocada en el exterior (reactores de chorro de buceo),





Biorreactor de tanque de agitación





Desarrollo histórico de los biorreactores (fermentadores)

- **a** Hoyo con cubierta (deshechos humanos, biogás)
- **b** Contenedor sencillo de madera, cuero, metal, plástico (vino, cerveza, alcohol, vinagre, leche agria)
- **c** Reactor abierto (fabricación de cerveza) con control de temperatura
- **d** Reactor estéril para la fermentación controlada (levaduras, productos químicos especiales)
- **e** Reactor de tanque agitado (antibióticos)
- **f** Reactor en torre tubular (cerveza, vino, vinagre)
- **g** Reactor de ascensión de aire con circulación interna (levadura para componentes de petróleo)
- **h** Reactor de ascensión de aire con circulación externa (bacterias de metanol)

(Según Greenshields y Rothman, 1986.)

por ejemplo para la producción de levadura como pienso

- Reactores con producción de energía mediante compresión de gas (reactores de ascensión de aire con circulación interna y externa), por ejemplo para la producción de proteínas unicelulares (levadura de petróleo, bacterias de metanol) y la purificación de aguas residuales ("torre de biología").

Un problema crucial al cultivar células libres es la **mezcla ininterrumpida** del producto de fermentación conjunto. Normalmente se necesita también una buena ventilación, pues los procesos son en general aeróbicos. El **reactor de agitación** es el biorreactor utilizado con más frecuencia. La mezcla se consigue mediante agitación o bombeo. El reactor de agitación puede tener hélices o turbinas para agitar, que insuflan aire y lo dispersan. A menudo se combinan ambas. Especialmente si la relación de la altura del fermentador respecto a su diámetro es mayor de 1,4, se deben utilizar varios agitadores.

Las fermentaciones "toscas" (proceso de sumergir vinagre o levaduras y estación depuradora) utilizan **biorreactores sin distribución activa de aire**. El agitador (hélice o turbina) se ocupa entonces de las turbulencias y separa el aire al mismo tiempo. Para células de mamífero sensibles no son apropiados tales reactores (Cap. 3). En la fabricación de cerveza y la producción de levadura se utiliza la fermentación de los mismos gases (CO_2). El producto de la fermentación se mezcla neumáticamente mediante el CO_2 producido y el aire introducido. En los reactores agitadores hidráulicos se usan bombas para la mezcla.

Todos estos biorreactores trabajan con mezclas homogéneas de medio y células. En cambio, en los **reactores de membrana** se separa el catalizador (células o enzimas) del producto mediante una membrana, que no es permeable para el biocatalizador. Esto lo hemos visto en la producción enzimática de aminoácidos en el Cap. 2. De forma especial, en el **reactor de fibra hueca** las enzimas o las células se encuentran inmovilizadas sobre la superficie exterior de las fibras. El medio pasa a través de las fibras huecas por el biocatalizador. Utilizando haces de fibras huecas se obtiene un rendimiento elevado y, de este modo, una gran productividad en un espacio más pequeño. Los **reactores de lecho fijo** contienen un relleno de material de soporte (por ejemplo vidrio poroso o celulosa) con una mayor superficie. Se utilizan como reactores de enzimas (Cap. 2) y de células delicadas de formas de vida superiores (Cap. 3).



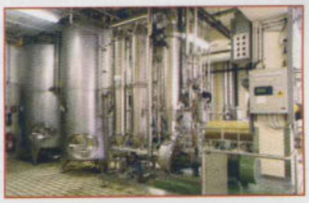
Cultivo de bacterias: *Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae* en agar de Levine



Instalación para el cultivo de microorganismos



Desarrollo de procesos en una técnica de fermentación



Las moléculas de diferente tamaño se separan unas de otras en una instalación de ultrafiltración a través de membranas



Separación de células del medio de fermentación mediante centrifugación



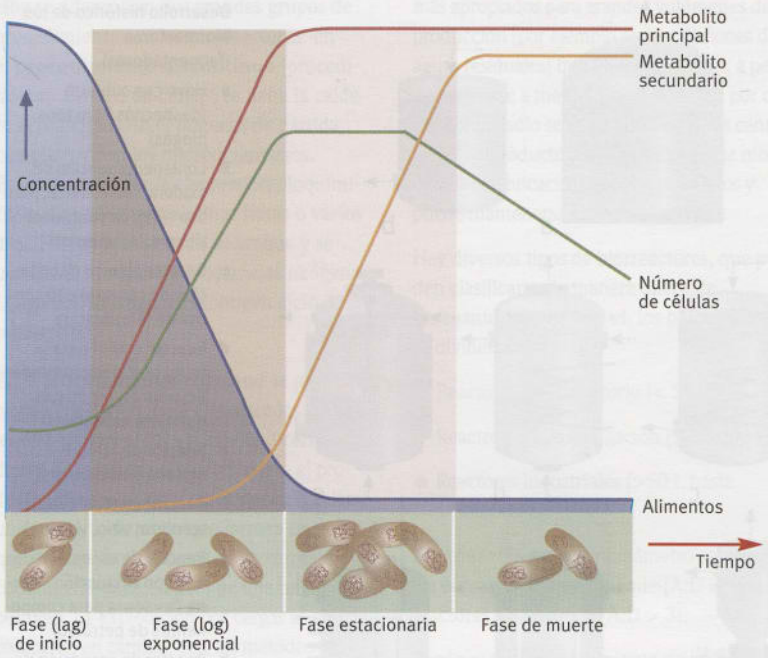
Embotellado libre de gérmenes al final del proceso de producción

Cuadro 4.11 Productos del metabolismo principal y secundario

En el Cap. 1 hemos visto los productos finales clásicos del metabolismo, como el etanol y el ácido láctico. Se originan "por necesidad" en los procesos de fermentación. Los productos del metabolismo primario esenciales se sintetizan, sin embargo, en las células, porque son innecesarios para su crecimiento. De importancia económica son los aminoácidos y sus derivados (treonina, lisina, fenilalanina, triptófano, glutamato), las vitaminas (B_2 y B_{12}) y los nucleósidos (inosina-5-monofosfato, IMP, guanosina-5-monofosfato, GMP).

Por naturaleza, los microbios no producen estos materiales en cantidades enormes, pues eso sería, debido al elevado consumo de energía y de carbono, una desventaja de selección contra ellos, que sólo los producen por necesidad. Se deben cambiar a la fuerza los mecanismos de regulación.

Los productos secundarios de las células se forman primero en una fase tardía del crecimiento; no son necesarios para el propio crecimiento y su función natural a menudo no es conocida. Muchos de estos productos secundarios, por ejemplo los antibióticos, inhiben otros microbios como ventaja propia. Se forman también otros materiales, como micotoxinas y colorantes.



Los productos primarios del metabolismo (por ejemplo etanol y aminoácidos) se enriquecen en el biorreactor en la medida en que crecen las células, mientras que la producción de los productos secundarios (por ejemplo la penicilina) alcanza su máximo en la fase de crecimiento.

Para la producción, esto tiene consecuencias decisivas.

Para los metabolitos primarios (como los aminoácidos) "sólo" se deben alcanzar las condiciones de crecimiento ideales.

En la medida en que las bacterias o levaduras proliferan aumenta también la concentración de metabolitos primarios. Si en cambio se produce penicilina, producto secundario de un moho, la concentración de ésta alcanza su nivel máximo cuando se ha detenido el crecimiento del hongo.

Se debe encontrar, pues, un equilibrio ideal entre cada una de las condiciones de crecimiento y de producción.



Fig. 4.50 El proceso de purificación requiere sumo cuidado.

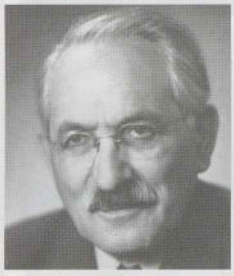


Fig. 4.51 Selman Abraham Waksman (1888-1973) descubrió la estreptomicina y creó el concepto "antibiótico".

bién el agua (ósmosis inversa) de las células del microbio, que se arrugan, se secan y por ello no crecen más. La **liofilización** es uno de los modernos métodos de conserva más habituales (Cuadro 4.7). El alcohol concentrado no aumenta sólo la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las bacterias (véase Cap. 1) y con ello inhibe su crecimiento, sino que extrae también agua de las células de los microbios.

Finalmente, el ser humano ha desarrollado también una larga serie de desinfectantes inhibidores de microbios.

4.19 Recuperación del producto: *downstream processing*

Si los gérmenes se mantienen bajo control y el proceso tiene éxito, el biorreactor puede aplicarse. Con ello, la espesa mezcla de los mohos segregaría material de alimentación y penicilina. Puesto que la penicilina está separada de los hongos en el entorno, su obtención es muy sencilla: se filtran las células de microorganismos. De la solución nutriente clara se hace precipitar la penicilina disuelta y se pueden separar fácilmente los cristales.

Análogamente a la preparación de un sustrato para el biorreactor (***upstream processing***), se realizan todos los pasos que son necesarios desde la disolución de fermentación hasta el producto final, como ***downstream processing***.

La mayoría de los productos (por ejemplo muchas proteínas) son eliminados por los microbios al medio. Por lo tanto, hay que romper a la fuerza las células de los microbios y los productos deseados se deben separar arduamente del contenido remanente de las células (por ejemplo mediante cromatografía de afinidad, Cap. 3). Por ello, la producción de estas sustancias es obviamente más cara.

4.20 Estreptomicina y cefalosporina – Los siguientes antibióticos después de la penicilina

La penicilina es muy eficaz contra un amplio espectro de bacterias grampositivas. Después de la introducción de la penicilina en la práctica clínica se observó que muchas infecciones bacterianas comunes se curaban de forma rápida y por completo, como la inflamación del cuello (faringitis) causada por estreptococos, la inflamación de los pulmones provocada por neumococos y las principales infecciones por estafilococos. También se curaba la infección de las meninges, a menudo mortal, producida por meningococos, y algunas formas de infecciones bacterianas del endocardio que antes eran mortales. Estos espectaculares resultados clínicos desencadenaron una búsqueda intensiva de otros antibióticos naturales.

Había dos motivos detrás de estos esfuerzos. La penicilina no actúa sobre las bacterias gramnegativas como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium*. Por otro lado, se observó que también determinadas bacterias grampositivas son o pueden llegar a ser resistentes a la penicilina.

Con la ayuda de una nueva técnica, con la que se revisaban sistemáticamente en los microorganismos de la tierra sus productos de metabolismo para observar su eficacia como antibióticos, en 1943 **Selman Abraham Waksman** (1888-1973) (Fig. 4.51) y sus colaboradores consiguieron, en la Universidad americana de Rutgers, aislar un nuevo antibiótico de actinomicetos del género ***Streptomyces***. Los actinomicetos son bacterias grampositivas, irregularmente unidas e inmóviles, que forman filamentos y ramificaciones.

La **estreptomicina** es un aminoglucósido, y por lo tanto consta de azúcares y aminoácidos. La estreptomicina actúa, de forma diferente a la penicilina, también contra algunas bacterias gramnegativas. Por primera vez fue eficaz una terapia contra la tuberculosis. Los antibióticos aminoglucósidos tienen un amplio espectro de acción, pero son ligeramente tóxicos. El típico olor a tierra fresca lo proporcionan los estreptomicetos habitantes del suelo.

Walksman y sus colaboradores descubrieron otros nuevos antibióticos: la actinomicina (1940), la clavacina, la estreptotricina (1942), la griseína (1946), la neomicina (1948), la fradicina, la candicidina, la candidina y otros. Dos de ellos, la estreptomicina y la neomicina, todavía se utilizan mucho hoy en día.

En 1945, el profesor **Giuseppe Brotzu** (1895-1976) (Fig. 4.54), del Instituto de Higiene italiano en Cagliari, se ocupó de un problema que ha alcanzado hoy una dimensión gigantesca con la polución del mar Mediterráneo. En las proximidades de la salida del sistema de alcantarillado de Cerdeña se tomó una muestra de agua. Brotzu especuló: si las bacterias de las aguas residuales pueden provocar infecciones del aparato digestivo, ¿no deberían incorporarse al medio sus enemigos naturales? Así Brotzu descubrió, en el moho *Cephalosporium acremonium* (hoy renombrado ***Acremonium chrysogenum***, Fig. 4.53), la sustancia inhibidora para una enorme cantidad de bacterias.

La publicación de Brotzu, en una revista de la Universidad italiana a la que se prestaba poca atención, llegó por una feliz casualidad a un grupo de Oxford de "cazadores de antibióticos". Estaba establecido que el hongo generaba varios anticuerpos relacionados. Uno de ellos, la **cefalosporina C**, demostró ser especialmente efectivo contra microorganismos grampositivos de enfermedades resistentes a la penicilina (véase Cuadro 4.9).

La penicilina, la cefalosporina y la estreptomicina fueron los descubrimientos más importantes en los primeros tiempos de la investigación en antibióticos, pero no los únicos. El número de nuevos antibióticos encontrados anualmente creció, entre finales de los años 1940 y principios de los 1970, de forma casi lineal, hasta casi 200. Hacia finales del siglo pasado se alcanzó el récord de 200 sustancias al año. Hasta hoy se han aislado 8000 antibióticos de microorganismos y 4000 de organismos superiores (Cuadro 4.9). Se producen mundialmente 30 000 toneladas de penicilina y cefalosporina. Las cefalosporinas se utilizan sólo en humanos; las penicilinas, en cambio, también en la mayoría de los animales útiles (a veces de modo inadecuado).

Poco después del primer éxito de la estrategia de humanos contra microbios, éstos iniciaron su desquite masivo. En realidad, demostraron cómo prosigue aún hoy la evolución.

4.21 La competencia con los microbios: resistencias

El gran Louis Pasteur escribió: "¡Las bacterias tendrán la última palabra, señores!" ¡Qué verdad en tantos sentidos!

La penicilina se venía aplicando desde hacía unos años con éxito. En 1972, sin embargo, se produjo una epidemia de disentería en México, y en

¿Grampositivo?

Grampositivo, gramnegativo y tinción de Gram deben su nombre al danés Hans Christian J. Gram



Fig. 4.52 Hans Christian J. Gram (1853-1938)

En 1884, parece que más bien por casualidad, en un laboratorio de medicina berlinés se descubrió que las bacterias grampositivas y gramnegativas poseen paredes celulares y en mayor o menor medida son capaces de retener el violeta de genciana después de lavarlo con una disolución de yodo en yoduro potásico y alcohol. El color azul oscuro (grampositivo) aparece principalmente en las bacterias en forma de esfera (neumococos, estreptococos), y el rosa pálido o rojo (gramnegativo) en los bacilos (*E. coli* y salmonelas).



Fig. 4.53 *Acremonium* produce cefalosporina.



Fig. 4.54 Giuseppe Brotzu (1895-1976) descubrió la cefalosporina.

Cuadro 4.12 Opinión de expertos: Biotecnología blanca en Alemania

La biotecnología blanca o industrial no es una nueva disciplina, sino que significa "recurrir a la caja de herramientas de la naturaleza", como la define la Unión Europea de Biotecnología. Utiliza material renovable y aplica los mecanismos de acción de eficacia probada de la naturaleza. Con ella se cuidan los recursos, bajan las cargas para el entorno y se producen procesos convencionales pero mucho más eficientes. Además, la biotecnología blanca proporciona soluciones a problemas técnicos y permite obtener productos completamente nuevos.

Actualmente, los productos biotecnológicos tienen una participación en la facturación mundial de la industria química del 5%. Los estudios de McKinsey, así como los de Festel, indican que esta influencia crecerá más en el futuro: en el año 2010 se producirá por biotecnología hasta un 20% de todos los productos químicos, con una magnitud de alrededor de 310 000 millones de dólares americanos. La biotecnología blanca será la clave y la causa principal para la potenciación de la competitividad de la industria química. Nuevas materias primas, nuevos procesos de producción, nuevos productos: éstos son factores de éxito esenciales de la biotecnología blanca. Las crecientes materias primas secundarias sustituyen a muchas materias primas fósiles. Los procesos de producción eficientes son superiores, tanto económicamente como en cuanto a ecología, por biocatálisis, biotransformación o fermentación, reemplazando a la síntesis química. Con la ayuda de nuevas rutas de síntesis se desarrollan productos innovadores y así aumentan las ventajas de la innovación –un beneficio decisivo en la competición internacional.

Ejemplos de éxito de la industria química

La biotecnología blanca hace mucho que ha abandonado la fase del trabajo en el laboratorio. Hoy tiene éxito una creación más inteligente, de moléculas útiles para los humanos, utilizando la combinación de una serie de bacterias modificadas genéticamente a partir de una sola pala de tierra del parque municipal. De este modo, la empresa Henkel tiene hoy, entre otros productos, los detergentes más eficaces y líderes en el mercado mundial, porque ha investigado con excelentes resultados sistemas enzimáticos optimizados para diferentes tipos de suciedad, los ha trasladado a la escala de la producción y los ha integrado en sus productos. La industria farmacéutica y agraria no se concibe ya sin la biotecnología blanca. Las sustancias activas con centros quirales pueden producirse con frecuencia de modo económico sólo con métodos biotecnológicos, rindiendo enantiómeros puros. Esto es muy importante, ya que el 50% de los primeros cien medicamentos contiene sustancias activas como enantiómeros puros y tiene una facturación de más de 100 millones de dólares americanos. De este modo crece el número de enantiómeros puros en las sustancias activas farmacéuticas.



E. coli, el burro de carga de la industria

En las especialidades químicas ocurre algo parecido. Aquí se menciona la síntesis de la vitamina B_2 de BASF AG basándose en materias primas reproducidas: un proceso de síntesis químico de ocho etapas se sustituye por un proceso de fermentación de una etapa utilizando un hongo especial sobre la materia prima (aceite de soja) inicial para convertirlo en el producto final. La vitamina B_2 se obtiene en forma de cristales amarillos directamente de la mezcla de fermentación.
En el proceso biotecnológico disminuyen los costes de producción (*overall costs*) en un 40%, y también los efectos sobre el entorno (*environmental impact*) en un 40%. McKinsey utilizó, de acuerdo con BASF, la biocatálisis o fermentación para producir alrededor de un tercio de sus productos químicos finos.

En DSM, según McKinsey, aumenta la porción incluso un 50%. Así, por ejemplo, en la producción del antibiótico cefalexina realizada en DSM se sustituyó un proceso de síntesis de 10 etapas realizado a gran escala por un proceso biotecnológico consistente en una combinación de fermentación y una reacción enzimática posterior. La nueva ruta de síntesis se posibilita mediante ***ingeniería metabólica***. Los costes variables relacionados con el proceso se reducen alrededor del 50%, mientras que el uso de energía y la utilización de material se reducen en un 65%. La ruta de síntesis química tiene lugar en un medio de disolución orgánico que realiza un proceso biotecnológico en un medio acuoso.

Degussa AG se dedica en todo el mundo a la producción de aminoácidos esenciales, que contribuyen en gran medida a garantizar una alimentación sana para humanos y animales. Los aminoácidos se producen por fermentación, es decir, con la ayuda de la biotecnología blanca. Junto a la "gran" industria química ha habido al frente jóvenes compañías biotecnológicas que han marcado el desarrollo de forma decisiva. Muchas innovaciones en las empresas químicas no son posibles sin la asociación de las compañías biotecnológicas o las instituciones académicas. Estas compañías de biotecnología industrial, como Maxygen, Codexis, Diversa, Genencor o BRAIN, disponen de una amplia red de sociedades que, según el proyecto, desarrollan estratégicas alianzas o *joint ventures*. A menudo, los modernos modelos de cooperación son, en la biotecnología blanca, precisamente la clave del éxito.

Nuevas perspectivas en Alemania

Después de la biotecnología roja, orientada a la medicina (Cap. 9), y la biotecnología verde, destinada al sector agrario (Cap. 7), apuntamos con la biotecnología blanca al principio de una tercera ola biotecnológica. Sin embargo, la biotecnología industrial y su potencial científico, pero sobre todo económico, aún no han quedado anclados en nuestras cabezas, ni en las de los investigadores y científicos, ni en las de los ejecutivos o jugadores del mercado de capitales, y mucho menos en la gran opinión pública.

En una alianza, poco común a primera vista, de las mayores organizaciones medioambientales de Europa, la Fundación Federal Alemana del Entorno (DBU), una asociación industrial, la Asociación Industrial de Biotecnología Alemana en colaboración con la Industria Química (DIB/VCI) y de Empresarios Biotecnológicos, de BRAIN AG, allanaron el camino para que todos los grupos sociales utilizasen bien las oportunidades únicas de la biotecnología blanca. Con la iniciativa de DBU, DIB/VCI y BRAIN se estableció, a finales de febrero de 2005, una

"Plataforma Nacional de Biotecnología Blanca", cuya meta es enfocar las actividades y fuerzas nacionales en el campo de la biotecnología blanca y comunicarlas al público. Al mismo tiempo se intensifica la interacción con la correspondiente plataforma europea y se facilita el diálogo entre investigadores en la Comisión Europea. Mediante un acuerdo conjunto de líneas de acción y objetivos debe conseguirse una contribución más contundente a la seguridad y al desarrollo competitivo de la capacidad futura de ubicación de la industria en Alemania.

Bibliografía:

Bachmann R, Budde F, Riese J (2004): Die dritte Welle – Die Biotechnologie erobert die Chemieindustrie. Chemie Ingenieur Technik 76: 1155-1158.

Festel G, Knöll J, Götz H, Zinke H (2004): Der Einfluß der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie. Chemie Ingenieur Technik 76: 307-312.



El Dr. Rainer Erb, del Centro para Comunicaciones Ambientales de la Fundación Federal de Alemania GmbH, Osnabrück.



La Prof. Dra. Stefanie Heiden, de la Fundación Federal de Alemania, Osnabrück.



El Dr. Ricardo Gent, de la Unión Industrial Alemana de Biotecnología (DIB) en conexión con la Industria Química e.V. (VCI), Frankfurt/Main.



El Dr. Holger Zinke, de BRAIN AG, Zwingenberg.

1975 una extensión epidémica de gonorrea de las Filipinas se propagó mediante la creciente prostitución. Para la gonorrea (en griego, flujo de esperma) se utiliza en alemán la palabra *Tripper*, que viene del bajo alemán *drippen* ("*tropfen*", gotear). Ambos nombres demuestran los síntomas característicos.

La gonorrea, una enfermedad venérea conocida desde hacía siglos, pudo curarse por primera vez con los antibióticos.

Se estableció, sin embargo, que las prostitutas tomaran penicilina profiláctica en grandes cantidades durante un largo tiempo, para protegerse de la gonorrea. Así, *Neisseria gonorrhoeae* se encontró en una situación que condujo a la selección de células capaces de sobrevivir. Pronto aparecieron **cepas de bacterias resistentes a la penicilina.** La "insensibilidad" de las bacterias se basó en la producción de enzimas que inactivan la penicilina (**β-lactamasas**). Estas hidrolasas rompen el llamado anillo β-lactama de la penicilina y de la cefalosporina (Cuadro 04.7) mediante hidrólisis enzimática, y lo convierten en el inefectivo ácido penicilínico. Sobre todo en los hospitales, los pacientes se infectan con frecuencia con estas cepas bacterianas (hospitalismo). En Alemania mueren por ello 20 000 pacientes al año.

Se investiga ahora cómo engañar a los microbios. Del tipo *Penicillium* se produce principalmente en la industria farmacéutica la denominada penicilina G, que lleva una cadena lateral de bencilo. Se rompe esta cadena lateral con enzimas inmovilizadas (penicilina amidasas), se acoplan entonces nuevos grupos y se obtienen así nuevos tipos de **antibióticos semisintéticos**, contra los que no son resistentes los microbios (¡aún!) (Cap. 2).

Es una lucha entre las bacterias y los masivos antibióticos generados que consiguen la mejora del crecimiento y la profilaxis en los animales útiles o humanos. Hemos visto ya que las bacterias intercambian **plásmidos**, que llevan genes que codifican resistencia a los antibióticos (Fig. 4.56).

Básicamente, en las bacterias y los antibióticos vemos cómo funciona también hoy la evolución en el sentido de Darwin y Wallace: mutación, selección y supervivencia del mejor y del más adaptado.

4.22 Ciclosporina – Un producto microbiano para trasplantes

Desde 1957, siempre que los colaboradores de Sandoz Ltd. de Basilea se iban de vacaciones, o por asuntos de negocios, se les pedía que trajeran bol-



Fig. 4.55 Propaganda estadounidense de los años 1950 sobre el abuso de antibióticos: los antibióticos actúan sólo en enfermedades bacterianas, no en las virales. Es, pues, absurdo recetar antibióticos para infecciones virales.



Fig. 4.56 Las bacterias pueden intercambiar plásmidos mediante los *pili* sexuales, y así se transfieren las resistencias.

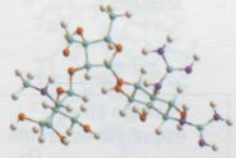


Fig. 4.57 Estreptomicina.

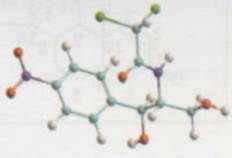


Fig. 4.58 Cloranfenicol.



Fig. 4.59 *Tolypocladium inflatum.*

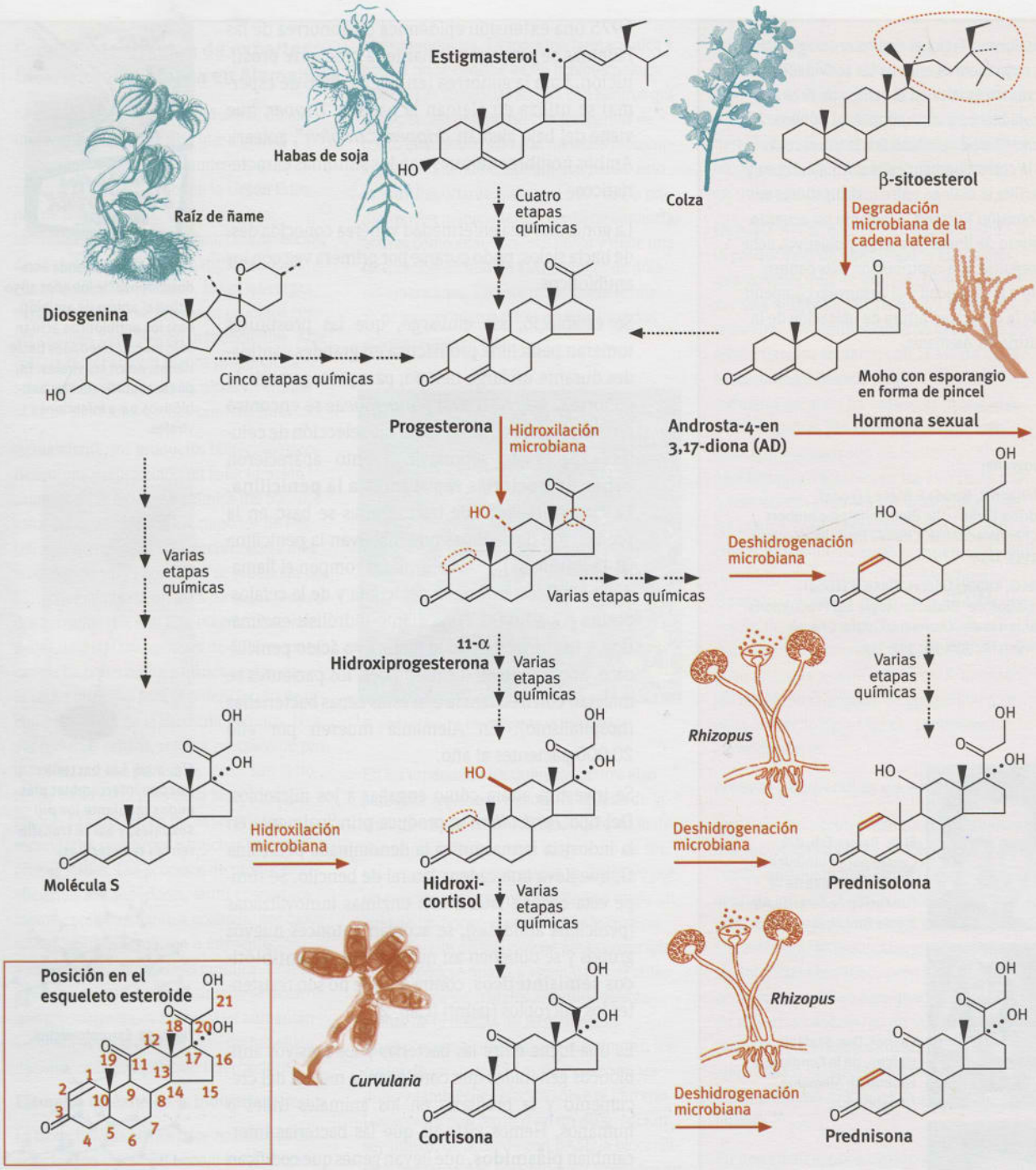
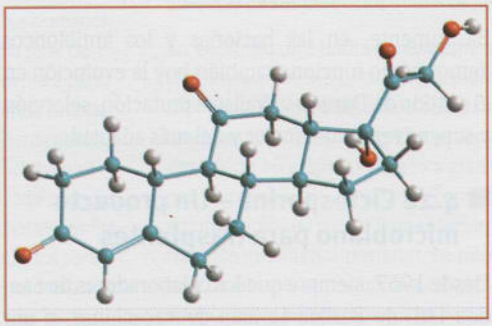


Fig. 4.60 Participación de los microorganismos en la producción terapéutica de los esteroides más importantes (arriba). Estructura espacial de la cortisona (abajo a la derecha).



sas de plástico con muestras de suelo de todas las partes del mundo. Éstas se catalogaban y se "revisaban" buscando nuevos productores de antibióticos. Hasta marzo de 1970, sin embargo, los científicos no hallaron ninguno: ***Tolypocladium inflatum*** (Fig. 4.59) se aisló en tierra de Wisconsin, Estados Unidos, y Hardanger Vidda en Noruega.

En principio, los investigadores de Basilea sólo descubrieron, para su decepción, una sustancia que era eficaz simplemente contra unos pocos

Cuadro 4.13 Historia de la biotecnología: La diosgenina de la raíz de ñame y la píldora anticonceptiva





Carl Djerassi (segundo por la derecha) en 1951 con la raíz de ñame durante la síntesis de la "píldora" (a la izquierda George Rosenkrantz). Al lado: Carl Djerassi.

El "padre de la píldora anticonceptiva" y hoy conocido escritor de ciencia-ficción **Carl Djerassi** (nacido en 1923), trabajó en la década de 1950 en México. En la importante compañía Syntex se aisló diosgenina, un esteroide con propiedades de jabón, de la raíz del ñame silvestre (*Discorea*) incomestible. Esta raíz se había utilizado por los indios para lavar la ropa y matar peces. **Russell Marker** había transformado químicamente diosgenina en la hormona sexual femenina progesterona, y **Georg Rosenkrantz** convirtió diosgenina en testosterona. Ellos mantuvieron un duro combate con los químicos más importantes del mundo para producir químicamente la deseada cortisona a partir de la raíz de ñame. Al final lo consiguieron con arduo trabajo, y entonces recibieron una carta de la compañía Upjohn. En ella preguntaban si Djerassi podría suministrar diez toneladas (!) de progesterona. En todo el mundo se producía entonces un 1% de esa cantidad.

¡Parecía un pedido totalmente sin sentido! Después de noches sin dormir, Carl Djerassi pensó que Upjohn probablemente planeaba utilizar la progesterona como producto intermediario. En realidad, dos científicos, **Durey H. Peterson** y **Herbert C. Murray**, habían hecho el sensacional descubrimiento de que una cepa del moho del pan *Rhizopus arrhizus* era capaz de colocar un grupo hidroxilo en la posición 11 del anillo C de la progesterona.



Raíz de ñame (*Dioscorea*) salvaje, tubérculo incomestible lleno de diosgenina.

"Lo que nosotros, químicos en la ciudad de México, Cambridge y Rahway, habíamos alcanzado mediante una complicada secuencia de conversiones químicas, lo conseguían los microbios de Upjohn en horas con unas pocas reacciones." Como él escribe en su autobiografía, "La madre de la píldora", Carl Djerassi encontró consuelo unos meses después al sintetizar con éxito el primer anticonceptivo oral, junto con George Rosenkrantz. La "píldora" lo hizo millonario y patrocinador de arte.

hongos –y ni siquiera era especialmente buena para ellos. El antibiótico producido por el hongo, con el nombre de laboratorio 24-556, tenía sin embargo una propiedad extraordinaria: por un lado era poco efectivo contra hongos, pero de baja toxicidad contra los animales de experimentación. Sólo se debía proseguir, por lo tanto, el análisis completo.

En 1972 se observó algo inesperado en el análisis: el nuevo material, un péptido de once aminoácidos cerrado en forma de anillo, inhibió el sistema inmunitario de los humanos, actuó como **inmunosupresor**, impidiendo así las reacciones de rechazo naturales contra los órganos trasplantados de donantes. Si un inmunosupresor está en acción durante largo tiempo, destruye el sistema de defensa entero. Con ello, cualquier pequeña infección puede ser mortal.

Pero no ocurría así con la sustancia 24-556, la actualmente conocida en todo el mundo como **ciclosporina** (Fig. 4.61). Si la ciclosporina se captura por el cuerpo, se acumula en determinados receptores de los linfocitos T. Las células T son las más importantes en la defensa específica del cuerpo (véase Cap. 5). La sustancia activa, en varias etapas de reacciones, hace que la importante **interleuquina 2** no se produzca en las células T. La interleuquina 2 es un mensajero (linfoquina) y se requiere para activar el sistema inmunitario. Participa en la generación de la respuesta inflamatoria.

La ciclosporina A produce finalmente una inhibición de los linfocitos T y un bloqueo de la producción de interleuquina 2, y evita así la supresión del sistema inmunitario.

Gracias al producto microbiano ciclosporina aumentaron desde los inicios de los años 1980 los versátiles trasplantes de corazón, riñones y pulmones con buenos resultados. La ciclosporina es uno de los pocos péptidos que se traga cómodamente, o sea, que se puede administrar por vía oral.



Fig. 4.61 Estructura de la ciclosporina.

4.23 Hormonas esteroideas: la cortisona y la píldora anticonceptiva

Mientras que en la producción industrial de antibióticos los microorganismos son los burros de carga para todos los trabajos, también se utilizan en la elaboración de otros fármacos sólo para algunos pasos de un proceso de producción mucho más largo, que consiste predominantemente en síntesis no biológi-



Fig. 4.62 Edward Kendall (sentado) y su equipo de la cortisona.

Fig. 4.63 Plantas y microorganismos para la obtención de esteroides.



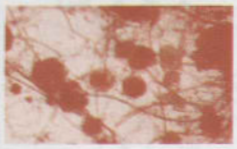
Soja



Raíz de ñame



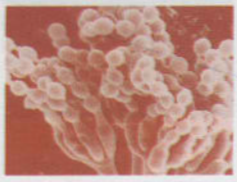
Colza



Rhizopus



Curvularia



Penicillium

cas. Un ejemplo típico es la producción de **hormonas esteroideas**.

A principios de los años 1930, **Edward C. Kendall** (1866-1972), de la Fundación Mayo, y **Tadeusz Reichstein** (que también desarrolló la síntesis de la vitamina C; véase más arriba), de la Universidad de Basilea, aislaron la **cortisona**, una de las hormonas esteroideas, de las glándulas suprarrenales del toro. Este hallazgo fue recompensado en 1950 con el premio Nobel. Aproximadamente un año más tarde se descubrió que la cortisona alivia el dolor en las personas que sufren artritis reumatoide. Enseguida surgió la cuestión de cómo obtener una considerable cantidad del medicamento.

A la vista del gran mercado esperado, se procedió a desarrollar una síntesis química. Sin embargo, era bastante inadecuada. La compañía Merck & Co. lo hacía en 37 pasos, de los cuales muchos se producían sólo en condiciones extremas, para obtener cortisona del ácido biliar de los toros. ¡De esta manera se producía cortisona que costaba casi 400 marcos alemanes por gramo! (Cuadro 4.12).

Con la ayuda de una **hidroxilación microbiana**, para la cual se utilizó industrialmente el hongo *Rhizopus arrhizus* (Fig. 4.63), se acorta la síntesis de 37 a 11 pasos. El precio de la cortisona bajó con ello a aproximadamente 15 marcos alemanes por gramo.

La hidroxilación microbiana no sólo produjo un acortamiento de la síntesis. Antes eran necesarias elevadas presiones y temperaturas, así como caros medios de disolución no acuosos. Ahora la síntesis se realizaba a 37 °C y a la presión atmosférica habitualmente en agua. Esto también contribuyó de forma decisiva a reducir los costes de producción. En 1980, gracias a una mejora en la productividad, el precio bajó por debajo de dos marcos alemanes por gramo.

Sólo la raíz del ñame (*Discorea*) mejicano proporciona la materia prima para la cortisona: la diosgenina. Hasta 1975, las cantidades eran superiores a 2000 toneladas cada año. El gobierno de México quería, por ello, poseer el monopolio para la materia prima. Inspirada en el éxito de los entonces miembros de la OPEP con los precios del petróleo, la empresa mejicana Proquivenex decidió en 1975 subir diez veces el precio de la diosgenina. Los acuerdos farmacológicos internacionales contraatacaron con la ayuda de sus biotecnólogos: desarrollaron métodos alternativos, sobre todo la degradación microbiana de los residuos acumulados en la producción de aceite de habas de soja. Éstos son ricos en los esteroides sitosterol y estigmasterol (Fig. 4.60). Con ello se pudo sustituir muy rápidamente la diosgenina.

Dos años después del aumento de precio, los mejicanos tuvieron que bajarlo de nuevo drásticamente. Pero ya nadie quiso depender más de esta fuente: el mercado para la diosgenina se había desplomado. ¡Esta experiencia muestra que ninguna materia es insustituible en biotecnología!

El caso de la cortisona muestra también claramente, como ya pasó con la vitamina C, que **la biotecnología y la química son alternativas una a la otra**. Precisamente, la combinación de procesos biológicos y químicos experimentarán un fuerte crecimiento en la siguiente década. Para ello, los microbios o sus enzimas realizarán algunos pasos en la síntesis que químicamente serían muy caros o inadecuados (Fig. 4.60).

Plegaria secreta de un químico orgánico:

¡Oh, Señor!,
concédeme el honor,
mediante mi noble labor,
de nuevas moléculas crear.
¡No dejes a las bacterias triunfar!

Hanswerner Dellweg, uno de los mentores de biotecnología en Alemania; según D.E. Eveleigh.

Bibliografía utilizada y aplicada

- El clásico alemán de biotecnología:
  Dellweg H (1987) Biotechnologie. VCH, Weinheim.
- La biblia de bolsillo de la biotecnología:
  Schmid RD (2002) Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH, Weinheim.
- Antiguo, pero bueno; una buena introducción:
  Gruss P, Herrmann R, Klein A, Schaller H (Hrsg.) (1987) Industrielle Mikrobiologie. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg.
- Especialmente para interesados en tecnología:
  Crueger W, Crueger A (1989) Biotechnologie – Lehrbuch der Angewandten Mikrobiologie. 3. Aufl. Oldenbourg, München.
- Sucinto y muy didáctico, especialmente para universitarios:
  Leuchtenberger A (1998) Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie. B.G. Teubner Stuttgart, Leipzig.
- El mejor libro de bolsillo de microbiología:
  Schlegel HG (1992) Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl. Thieme, Stuttgart.
- Información presentada como léxico:
  Wiley-VCH (eds.) (2002) Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. 6th Edition, Wiley-VCH, Weinheim.
- Precioso y sólido:
  Ratledge C, Kristiansen B (Hrsg.) (2001) Basic Biotechnology. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, New York.
- Una visión completa y muy interesante de las biotransformaciones enzimáticas y microbianas:
  Liese A, Seelbach K, Wandrey C (2005) Industrial Biotransformations. 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim.
- La autobiografía cautivadora del padre de la píldora:
  Djerassi C (2001) Die Mutter der Pille. Heyne, München.
- La historia completa de Fleming, y también de la lisozima, algo idealizada:
  Maurois A (1962) Alexander Fleming. Paul List Verlag, Leipzig.
- Dos presentaciones realistas del descubrimiento de la penicilina:
  Goldsworthy PD, McFarlane AC (2002) Howard Florey, Alexander Fleming and the Fairy Tale of Penicillin. *The Medical Journal of Australia* 176, 4: 176-178.
  Emsley J (2003) Sonne, Sex und Schokolade. Wiley-VCH, Weinheim.
- Magníficas miniaturas históricas de microbiología, ¡es necesario leerlo!
  Dixon B (1998) Der Pilz, der John F. Kennedy zum Präsidenten machte. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Michal, G (1998) Biochemical Pathways. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

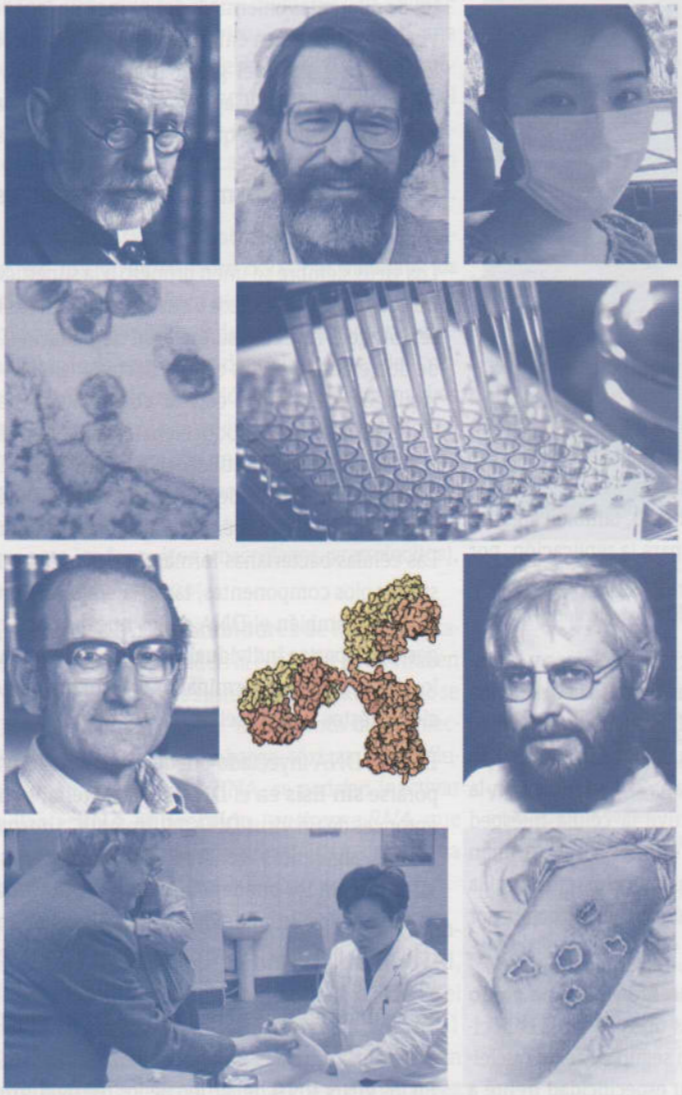
Enlaces de Web

- Información en alemán del Secretariado de Información de Biotecnología: *www.i-s-b.org*
- Buscador de Biotecnología en Internet: *www.biotechfind.com*
- Todo sobre microorganismos: *www.microbes.info*
- Una mina para las estructuras de proteínas de este libro: *www.scripps.edu/mb/goodsell/pdb*
- La historia de la penicilina para seguir jugando en el ordenador: *http://nobelprize.org/medicine/educational/penicillin/index.html*

Ocho preguntas de autoevaluación

1. ¿Qué es el *umami* y por qué no se puede generar significativamente por síntesis química?
2. ¿Cómo un sencillo moho negro del pan pudo arruinar la industria del limón en poco tiempo?
3. ¿De qué manera ayudó la lisozima (Cap. 2) al descubrimiento de la penicilina?
4. ¿Mediante qué fenómeno puede una simple lactosa "utilizar y detener" la producción del transportador de lactosa y de las proteínas degradadoras de lactosa en *Escherichia coli*?
5. ¿Cómo consiguió la compañía Roche en Basilea hacer de la mosca del vinagre *Drosophila* la mayor productora de vitamina C del mundo? ¿Puede alguien envenenarse con vitamina C?
6. ¿Cómo actúa realmente la penicilina? ¿Cómo puede luchar una bacteria contra la penicilina? ¿Por qué se debe tomar la penicilina según la prescripción y no interrumpir el tratamiento antes de tiempo?
7. ¿Cómo se llaman los ocho aminoácidos esenciales? ¿Por qué son esenciales?
8. ¿Por qué mueren los microbios con luz ultravioleta y por qué ésta puede producir cáncer de piel en los humanos?

Virus, anticuerpos y vacunas



5.1 Virus – La vida prestada 124

5.2 De qué forma atacan los virus a las células 124

5.3 Cómo se defiende el cuerpo de las infecciones: respuesta inmunitaria humoral mediante anticuerpos 127

5.4 Respuesta inmunitaria celular: células T asesinas 129

5.5 La primera vacuna: la viruela vacuna contra la viruela humana 134

5.6 Las vacunas modernas 137

5.7 Las vacunas vivas 139

5.8 Anticuerpos monoclonales: balas mágicas de un biorreactor altamente específicas y uniformes 140

5.9 Anticuerpos catalíticos 141

5.10 Anticuerpos recombinantes 142

5.11 Bibliotecas de anticuerpos combinatorias 143

5.12 "A cuestas" o visualización de fagos — La próxima revolución 144

5.13 Visualización de fagos para la hormona del crecimiento de alta afinidad 144

5.14 Nuevas esperanzas en el cáncer: rituximab, un anticuerpo recombinante 145

Capítulo 5



Fig. 5.1 Los nuevos virus amenazan la humanidad global. La epidemia de SARS paralizó la ciudad de Hong Kong durante dos meses. Los habitantes de Hong Kong derrotaron el virus con la mayor disciplina y también con encanto.



Fig. 5.2 ¡El SARS se ha erradicado! Pero las conferencias sobre biotecnología continuaban en Hong Kong; naturalmente, el tema era la "detección de virus".

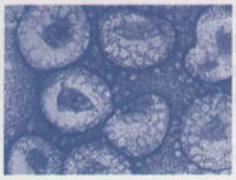


Fig. 5.3 El virus del SARS (*Severe Acute Respiratory Virus*) es un coronavirus. Actúa de forma diferente a por ejemplo el virus del sida. El virus lleva su hebra individual de RNA a la célula huésped y la copia con una RNA polimerasa dependiente de RNA en copias imagen.



Fig. 5.4 Puede producirse una nueva amenaza global con la combinación de gripe aviaria y humana.

5.1 Virus – La vida prestada

Los virus no son seres vivos, no tienen un metabolismo propio y utilizan para reproducirse la maquinaria celular de los animales, las plantas o las bacterias, que ellos atacan. Básicamente sólo pueden multiplicarse en una célula huésped y por lo tanto no pueden sobrevivir por sí mismos. Por ello no cumplen las propiedades de la definición de "vida".

En principio los virus son un pequeño "programa" que se instala en los genes de sus huéspedes y utiliza su maquinaria para producir nuevos virus. Los programas de interrupción de los "virus de ordenador" tienen un mecanismo muy similar.

Debido a que los virus no tienen un metabolismo propio, lamentablemente tampoco se puede luchar con inhibidores como los antibióticos ni paralizar su metabolismo. Simplemente se les puede atacar en el momento de las interacciones con el huésped.

Se distingue entre virus "con envoltura" (*enveloped*) y virus desnudos. Los virus desnudos, sin cubierta, encierran su genoma sólo en una **cápside** (en inglés *core*) formada de proteína. Los virus con envoltura poseen en cambio una cubierta cortada de la membrana celular del huésped mediante brotes (*budding*), o sea, una membrana lipídica en la que se encuentran las proteínas adicionales codificadas por el virus. Esta **membrana de lípidos y proteínas que recubre a los virus** envuelve también, pues, la cápside existente en ellos (Fig. 5.8).

Los virus se diferencian de los microorganismos en que, para su multiplicación, en realidad sólo necesitan su ácido nucleico y una célula del huésped. Algunos virus llevan, sin embargo, también algunas enzimas que son necesarias para la replicación, por ejemplo los retrovirus, que liberan **transcriptasa inversa** (Cap. 3) en su cápside.

Para la duplicación de los ácidos nucleicos y la síntesis de las proteínas, un virus siempre necesita una **célula huésped** (*host*). Se diferencia un ciclo lítico (del griego *lysis*, deshacer; la misma raíz que utilizó Fleming para la lisozima, Cap. 2), en el cual en la liberación de virus se destruye la célula huésped y pasa a uno no lítico, en que los virus se unen mediante brotes de la membrana celular (de aquí la regulación de la envoltura de los virus, como por ejemplo los virus de la gripe o el VIH).

Todos los virus contienen un único tipo de **ácido nucleico** (RNA o DNA). Los tipos de virus conocidos actualmente se clasifican según su ácido nucleico, su envuelta proteica y su especificidad frente a los huéspedes (Fig. 5.5).

A los **virus RNA** pertenecen, entre otros, el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) causante del sida, el virus de la gripe, el virus del sarampión y el virus de la rabia, así como el que ataca a las plantas, virus del mosaico del tabaco (VMT, Cap. 3; los dos últimos mencionados tienen forma de palo), y los picornavirus (por ejemplo el virus de la polio, que causa parálisis infantil, y los rinovirus que producen el resfriado común (Figs. 5.3 a 5.5). El **virus del SARS** (*Severe Acute Respiratory Syndrom*), que provocó pánico en Hong Kong y China especialmente en el año 2003 (Figs. 5.1 a 5.3), es también un virus RNA, el denominado coronavirus, porque su superficie recuerda a una corona.

A los **virus DNA** pertenecen, por ejemplo, los papovavirus (virus de verrugas y otros que producen cáncer), el virus de la viruela (*variolavirus*) y de la viruela vacuna (*vacciniavirus*), los virus herpes (causantes de diferentes enfermedades de la piel), los adenovirus (que producen enfermedades de las mucosas), los bacteriófagos (del griego *phagein*, comer; por ejemplo T4 y M13, Cap. 3) que atacan a las bacterias, y los baculovirus que sólo atacan a insectos.

5.2 De qué forma atacan los virus a las células

Los virus siempre se unen primero a la superficie de las células (Fig. 5.6). Los virus DNA, como los **bacteriófagos**, inyectan su material hereditario (DNA de doble hélice) en las células bacterianas (Fig. 5.6, izquierda). Entonces con la colaboración de las células bacterianas produce enzimas (DNA polimerasa de T4) que son utilizadas para sintetizar DNA y RNAm. El RNAm del virus producido del RNA bacteriano se expresa en los ribosomas bacterianos. Las células bacterianas forman con ello, a partir de sus propios componentes, tanto la envoltura proteica como también el DNA de los nuevos bacteriófagos. Las "partes individuales" se colocan juntas en los bacteriófagos terminados (aproximadamente cien) y éstos lisan la célula.

El virus DNA inyectado puede, sin embargo, incorporarse **sin lisis** en el DNA de la bacteria; se habla entonces de un virus DNA "durmiente" (*dormant*). En las siguientes generaciones bacterianas los virus integrados pueden liberarse para multiplicarse de nuevo. En el ataque a las células animales (Fig. 5.6, derecha) los virus se unen a los receptores sobre la superficie celular. La envoltura proteica se funde entonces con la membrana celular y el virus penetra.

En los **virus RNA** del grupo de los retrovirus (como el VIH) se coloca la hebra sencilla del RNA en la célu-

la. Se convierte en una doble hebra de DNA mediante una enzima introducida con el virus (**transcriptasa inversa**, Cap. 3). El DNA del virus reescrito se introduce en el DNA cromosómico del núcleo de la célula. La maquinaria de transcripción de la célula huésped (RNA polimerasa) copia al principio un RNAm. Tras esta presentación se sintetizan las proteínas virales con la ayuda de los ribosomas. Además, se forman también proteínas no estructurales, que en muchos virus son las que les confieren la patogenicidad. Los nuevos virus RNA formados y las proteínas de la cápside se unen para formar nuevos virus completos y abandonan finalmente las células.

Sólo en unas pocas familias de virus tiene lugar una **integración** del genoma viral. Entre ellas se encuentran los virus herpes y los retrovirus. Mediante la integración, el virus puede permanecer estable en la célula huésped durante generaciones de divisiones celulares, o sea, quedarse hasta que se activa de nuevo. En los virus que consiguen una integración en el genoma del huésped hay una "integración abortiva", como ocurre por ejemplo en el virus de la hepatitis B y en el papilomavirus, causada en el origen del tumor. La integración produce en estos casos la pérdida de la capacidad de replicación.

Se buscan intensamente **estrategias contra el ataque de los virus** (Cuadro 5.1). Por ejemplo, los **anticuerpos** específicos (ver en un apartado posterior de este capítulo) pueden neutralizar virus mediante una red entrecruzada incluso antes del contacto celular y la introducción en la célula diana. Los anticuerpos también pueden actuar por enmascaramiento de los lugares de unión correspondientes de los virus para dificultar que reconozcan sus células diana (Fig. 5.9). Los anticuerpos también marcan los virus para los **fagocitos** (macrófagos, granulocitos), y así pueden eliminarlos.

En los virus RNA, los **inhibidores** de la transcriptasa inversa (Cap. 3) impiden la copia del RNA viral en DNA. Muchas de estas sustancias inhibidoras que se aplican actualmente en el tratamiento de la infección por el VIH son, sin embargo, tóxicas. Si las células forman nuevos virus RNA, se podrían inactivar mediante **RNA antisentido** (*antisense-RNA*, que se corresponde químicamente al RNA como una imagen en el espejo, Cap. 10).

Una nueva estrategia es la aplicación de **fragmentos cortos de la doble hebra de RNA** (**RNAi**, donde "i" se utiliza por interferencia; detallado en el Cap. 10). Con RNAi generado artificialmente de 21 a 23 nucleótidos de longitud, el investigador alemán **Tom Tuschl** consiguió paralizar por primera vez genes de mamífero sin disparar la respuesta del inter-



Fig. 5.5 Virus DNA y RNA (no a escala). De arriba abajo y de izquierda a derecha:

Virus del sida (VIH), un retrovirus con envoltura y una hebra simple de RNA, y largo tiempo de latencia.

Virus de la gripe, un ortomixovirus, con varias hebras de RNA y envoltura. Hay tres tipos: A, B y C.

Virus de la rubéola (*Rubella*), pequeños y rojos, con una hebra única de RNA y envoltura. Es un togavirus.

Papovavirus (papilomavirus y poliomavirus), con DNA de doble hebra, desnudo. Los papilomavirus provocan, por ejemplo, la formación de verrugas, y algunos poliomavirus, como SV40, pueden causar cáncer en animales.

Virus del herpes, con DNA de doble hebra y envoltura.

Virus de las paperas, con RNA de una única hebra, de la familia de los paramixovirus. Ataca las membranas de las mucosas, así como los sistemas inmunitario y nervioso.

Bacteriófago T4, con DNA de doble hebra. Ataca las bacterias como *E. coli*.

Adenovirus, con DNA de doble hebra, desnudo. Producen enfermedades del sistema respiratorio.

Virus de la rabia (*Rabies*), con RNA de una única hebra, es un rabdovirus.

Virus del mosaico del tabaco (VMT), con RNA de una única hebra, en forma de palo. Cultivos enteros de chiles y pimentón se pierden por el VMT, con las típicas manchas marrones sobre las hojas.

Virus de la polio, perteneciente a los picornavirus, con RNA de una única hebra y desnudo. Produce poliomielitis, una grave enfermedad del sistema nervioso.

Virus de la viruela (*Variola*), con DNA de doble hebra y envoltura. Es un virus muy grande.

Cuadro 5.1 Medicamentos contra virus

Pueden utilizarse muchas estrategias para prevenir la extensión del VIH. Se intenta atacar al virus en todas las fases de replicación:

1. En el **acoplamiento** a las células no infectadas: el virus se une con la gp120 de su envoltura al **receptor CD4** de la superficie celular de los linfocitos T colaboradores. Si se tuviesen anticuerpos contra CD4, los lugares de anclaje de la célula podrían estar saturados. Por otro lado, se pueden sintetizar moléculas CD4 que, si se inyectan en la sangre, se unen a la gp120 de la envoltura del virus y con ello podrían impedir una infección. En el laboratorio funcionan ambos métodos. Sin embargo, son de esperar complicaciones inmunitarias porque cada CD4 o anti-CD4 impide la interacción del CD4 con su ligando natural.

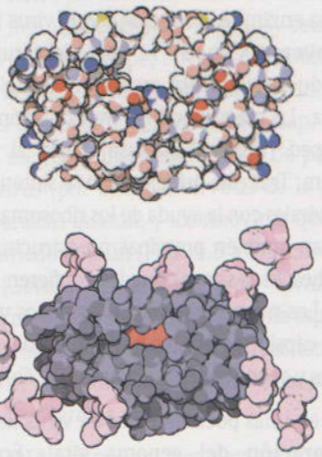
2. La inhibición de la **transcriptasa inversa** es un método efectivo. El VIH es un retrovirus y su RNA debe, en principio, reescribirse a DNA. Las sustancias como la azidotimidina (AZT, también denominada zidovudina), la lamivudina y la didesoxiinosina (DDI) se desarrollan análogamente a los nucleótidos y se instalan "erróneamente" por las enzimas en la cadena de polinucleótido.

La primera sustancia activa potente contra el herpes, el aciclovir, también actúa como inhibidor, análogo a los nucleótidos, de la transcriptasa inversa. Aplicado en crema es muy efectivo en el herpes simple y el herpes zóster (cinturón rosa), y es relativamente poco tóxico. Otros inhibidores bloquean el centro activo de la transcriptasa inversa (como la neviragina y la delavirdina).

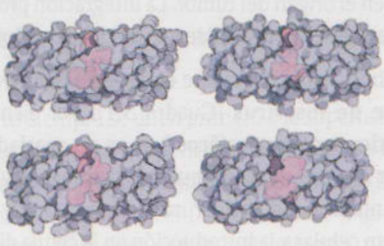
3. El RNA antisentido (*antisense-RNA*) es una copia del RNA que es exactamente complementaria al genoma del VIH. El RNA antisentido no codifica para proteínas y por ello no tiene función en la célula. Puesto que el genoma del virus es un RNA de una única hebra, que se libera en una infección, el RNA viral se puede unir rápidamente con el RNA antisentido "esperado" para formar un híbrido RNA/RNA estable "sin sentido", que no puede formar ningún provirus. Esto se podría lograr mediante terapia génica o células madre (Cap. 10).

El fármaco antisentido fomivirsen ya se utiliza hoy con éxito en pacientes con sida para el tratamiento de una infección ocular viral que si no se trata produce siempre ceguera.

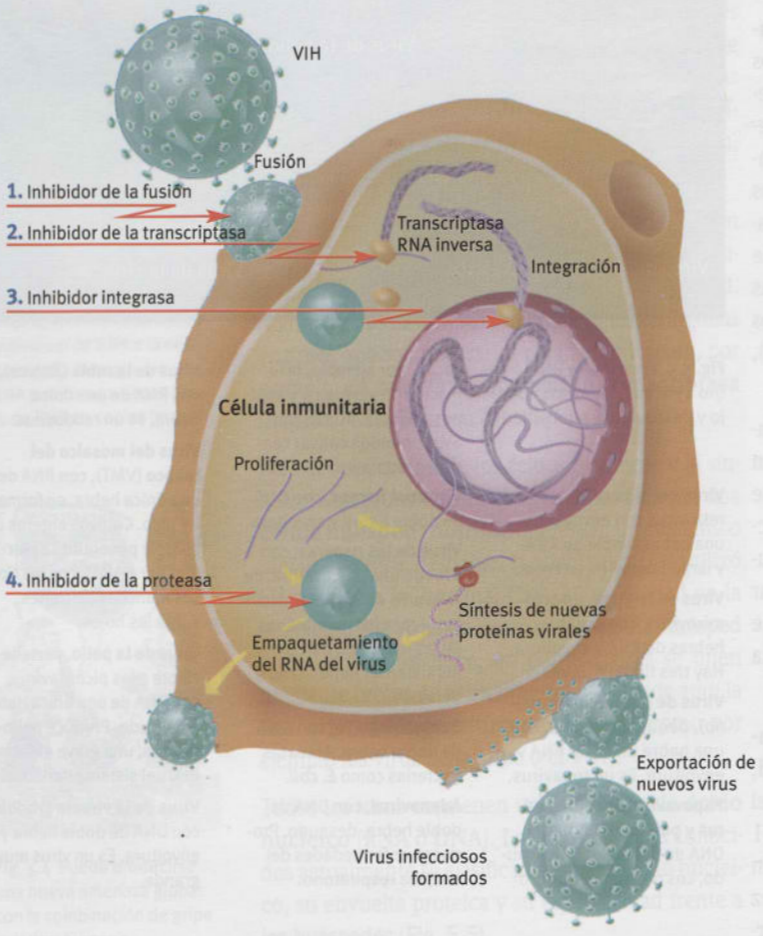
4. Inhibición de la **proteasa del VIH**. Los medicamentos que bloquean la proteasa del VIH son un triunfo de la medicina moderna y del diseño molecular. La proteasa fragmenta el polipéptido producido por el virus en largas cadenas, exactamente en el tiempo correcto, en trozos cortos que se utilizan para el empaquetamiento de nuevos virus. Si los fármacos se unen fuertemente a la proteasa y se bloquea su acción, el virus no puede madurar a la forma contagiosa.



Diseño de fármacos asistido por ordenador (Computer aided drug design): los fármacos pueden diseñarse por ordenador y analizarse. Los métodos de anclaje automáticos se utilizan para encontrar los mejores lugares en la biomolécula para anclarse. Si la unión anteriormente comentada es lo suficientemente fuerte, se puede sintetizar la molécula y analizar su actividad. El mejor lugar para el saquinavir se indica aquí en rojo.



Proteasa del VIH (arriba) y fármacos contra el sida: indinavir, saquinavir, ritnavir y nelfinavir (de arriba abajo y de izquierda a derecha).



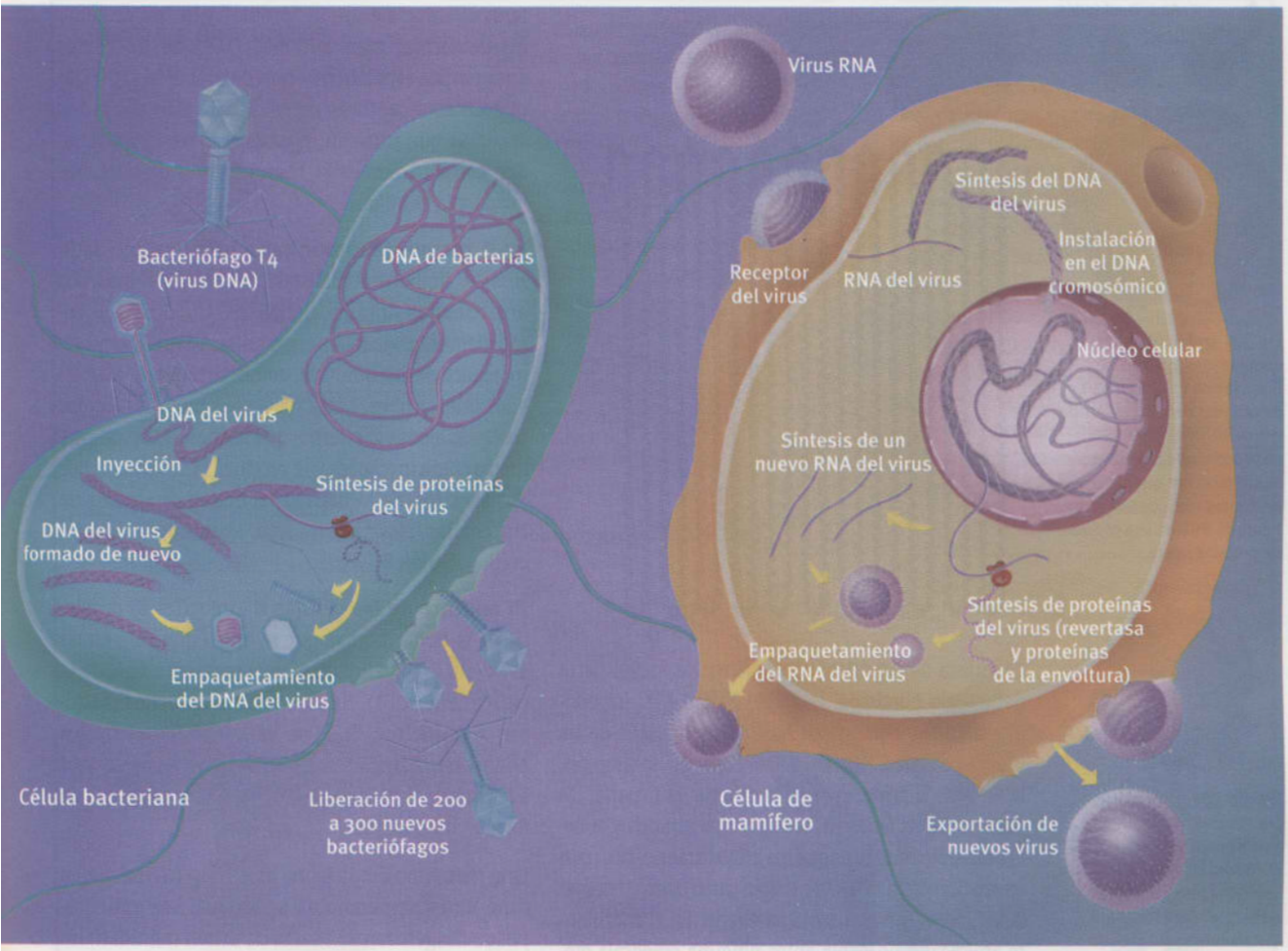


Fig. 5.6 Cómo los virus atacan las células. Izquierda: los bacteriófagos atacan *Escherichia coli*. Derecha: el VIH ataca una célula humana.

ferón modificado (esto conduce a la degradación de cada RNA). Desde entonces se ha conseguido, por ejemplo, paralizar determinados genes específicos (nef, rev, gag, pol) en el VIH, el causante del sida. Los primeros éxitos se están obteniendo en la lucha contra el virus de la gripe y el de la hepatitis C.

Los inhibidores de las **proteasas** codificadas por el virus, que desempeñan un importante papel en la maduración de las proteínas virales, se utilizan también en el tratamiento contra el VIH. Todas estas estrategias de defensa se siguen actualmente en la investigación del sida (Cuadro 5.1).

Puesto que el VIH ataca principalmente a las denominadas **células T cooperadoras**, que son importantes para la defensa del organismo, se podría fortalecer el cuerpo produciendo por ingeniería genética **citoquinas** (por ejemplo interleuquina 2). Primeramente, el virus "daría mate" por medios químicos y sólo después se estimularían las células inmunitarias mediante el aporte de interleuquina 2.

En otras infecciones virales se producen **interferones**. Las células infectadas por virus producen interferones de forma natural y los eliminan (secreción, Cap. 9). El interferón liberado o el introducido artificialmente en el cuerpo se une a una molécula receptora específica en la superficie de otras células y cambia la actividad celular. Se llega a la síntesis de proteínas, que hacen resistentes a las células frente a las infecciones virales.

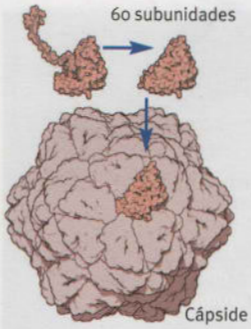
Al igual que la linfoquina **interleuquina 2 (IL-2)**, los interferones también se recibieron con gran entusiasmo como medicina maravillosa del futuro que podría sanar muchas enfermedades, desde el habitual resfriado hasta el cáncer. Estas expectativas, poco realistas, no se cumplieron. El efecto curativo es en general sólo débil, y los efectos secundarios a menudo son graves. Los interferones son, igual que la IL-2, valiosos para el tratamiento de algunas enfermedades humanas, pero normalmente sólo en combinación con otros tratamientos (Cap. 9).

5.3 Cómo se defiende el cuerpo de las infecciones: respuesta inmunitaria humoral mediante anticuerpos

En un principio, las bacterias y los virus fueron, sin saberlo, las armas biológicas de los europeos en la



Fig. 5.7 Cómo el cuerpo se opone a las infecciones. Descripción detallada en el Cap. 9. Aquí se ven macrófagos, anticuerpos y células T.



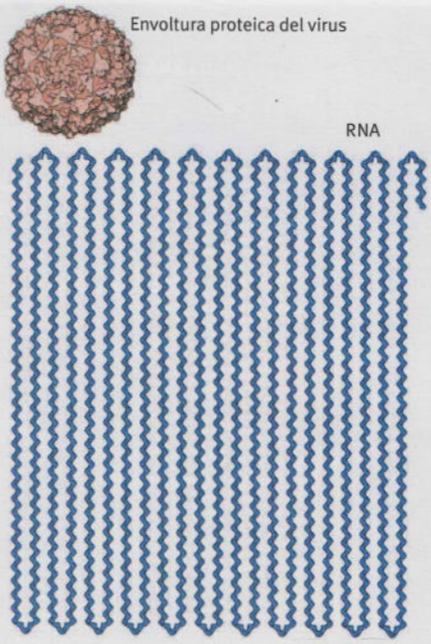


Fig. 5.8 Arriba: cómo las subunidades forman una cápside de virus a partir de cadenas peptídicas. Arriba a la derecha: el virus de la polio, que básicamente se sintetizó por completo en 2002, consta de una larga hebra de RNA en una cápside de proteína hueca.

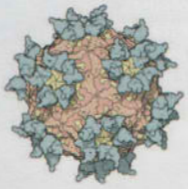


Fig. 5.9 Cómo los anticuerpos neutralizan un virus: aquí se muestran en verde claro sólo los brazos de unión (fragmentos Fab), no el "pie" del anticuerpo. Claramente se cubren con el anticuerpo los pinchos del virus y con ello se neutraliza.



Fig. 5.10 Cómo los anticuerpos se unen al antígeno: una cavidad profunda une una pequeña molécula por completo (arriba, totalmente introducido); una superficie grande, plana, del lugar de unión del antígeno, une la proteína lisozima (abajo).

conquista de América: consiguieron la mayor parte del trabajo homicida. Del siglo XVI al XIX, los conquistadores y colonos de América, y también de las islas oceánicas, llevaron consigo el sarampión, la viruela, la gripe, el tifus, la difteria, la malaria, las paperas, la tos ferina, la peste, la tuberculosis y la fiebre amarilla, mientras que los indios americanos (con excepción de la sífilis, de origen poco claro), "por su lado", no tenían ni un solo patógeno. En el continente americano no había antes ninguna epidemia evidente. Según Jared Diamond, esta "descompensación de armas" entre los indianos (osea los indios) y los europeos se debió a los grandes rebaños de ganado de los campesinos de Eurasia, que desarrollaron enfermedades agudas y endémicas que eran propias de animales y que más tarde también atacaron de manera similar a la población humana.

Asombrosamente, los brotes de las enfermedades infecciosas conocidas hoy datan de hace poco tiempo: ¡la viruela se produjo por primera vez en el año 1600 de nuestra era, las paperas y la peste en el 400, y el cólera y el tifus en el siglo XVI! Los pueblos eurasiáticos pudieron desarrollar durante siglos la **inmunidad** contra ellas y forzaron "tablas" en el juego contra las epidemias. Los habitantes del Nuevo Mundo, en cambio, no tuvieron tiempo para crear "genes de resistencia" y, sin preparación, cayeron víctimas de los gérmenes en masa.

¿Cómo nos protege el sistema inmunitario? Debemos contentarnos con una respuesta simple: el sistema inmunitario es tan complejo, que su representación supera el marco de un libro para principiantes en biotecnología. El sistema inmunitario diferencia entre lo "propio" y lo "no propio". Puede formar cien millones (10^8) de diferentes anticuerpos específicos y más de un billón (10^{12}) de diferentes receptores de células T. Consta de dos sistemas que trabajan en paralelo, pero relacionados estrechamente: la respuesta inmunitaria humoral y la celular.

En la **respuesta inmunitaria humoral** (del latín *humor*, líquido) actúan las proteínas solubles, los **anticuerpos** (inmunoglobulinas, Cuadro 5.2), como elementos de reconocimiento. Además, hay factores de defensa humoral, como la lisozima (Cap. 2) y los interferones. Los anticuerpos unen moléculas o células ajenas al cuerpo, que se identifican de este modo como invasores y se produce la fagocitosis por los fagocitos. Se forman los anticuerpos a partir de las células plasmáticas, que asimismo aparecen como **células B**.

El nombre de las células B (linfocitos B) proviene de la *bursa fabricii*, que se encuentra sólo en las aves –un órgano linfático en el segmento final de la cloaca (Fig. 5.11). En la *bursa* los linfocitos maduran a **linfocitos B**. Si se extraía la *bursa* de los pollos, éstos quedaban extremadamente expuestos a las infecciones bacterianas. Ya no eran capaces de formar anticuerpos.

Una macromolécula ajena al cuerpo (o una célula o un virus) se denomina **antígeno**. Los anticuerpos se dirigen con su fuerza de unión (afinidad) no contra el antígeno entero sino sólo contra un lugar la molécula, que se conoce como **epítopo** o **determinante antigénico**.

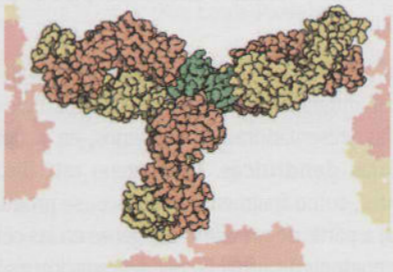
Una **infección** moviliza varias poblaciones de células inmunitarias en cooperación. Los linfocitos B llevan anticuerpos como moléculas de reconocimiento sobre su superficie (receptores de superficie). En general, sin embargo, no se activan por los antígenos circulantes. Primero el antígeno debe ser recogido por una **célula presentadora de antígeno**. Esta función la realiza un **macrófago** o una **célula dendrítica**. El antígeno es procesado (procesamiento) por estas células, aparece entonces sobre la superficie celular y se "presenta" a una célula T colaboradora. Ésta se une mediante el estímulo de la interleuquina 2 y activa con ello las células B, que antes también habían tenido contacto con el antígeno. Ahora estas células B proliferan mucho, se unen a un clon celular (**selección clonal**) y se diferencian: algunos descendientes llegan a ser **células de memoria**, las cuales posibilitan una reacción inmunitaria más rápida en una nueva infección, y otras se desarrollan hasta convertirse en células plasmáticas productoras de anticuerpos.

Cuadro 5.2 Anticuerpos



Las dos cadenas ligeras (ocre) forman, con las dos cadenas pesadas (oscuro y rosa), un dominio variable (*fragment variable*) que se une al antígeno, por así decirlo, como dos manos que pudieran agarrar al antígeno. En la región variable los 20 aminoácidos son hipervariables y permiten billones de combinaciones para el reconocimiento de antígenos.

Los anticuerpos son componentes del sistema inmunitario de los vertebrados, que debe defender contra los invasores. Su función es identificar y unir específicamente los patógenos y con ello marcarlos para el sistema inmunitario, así como neutralizar toxinas. Muchos patógenos dañan por liberación de toxinas.



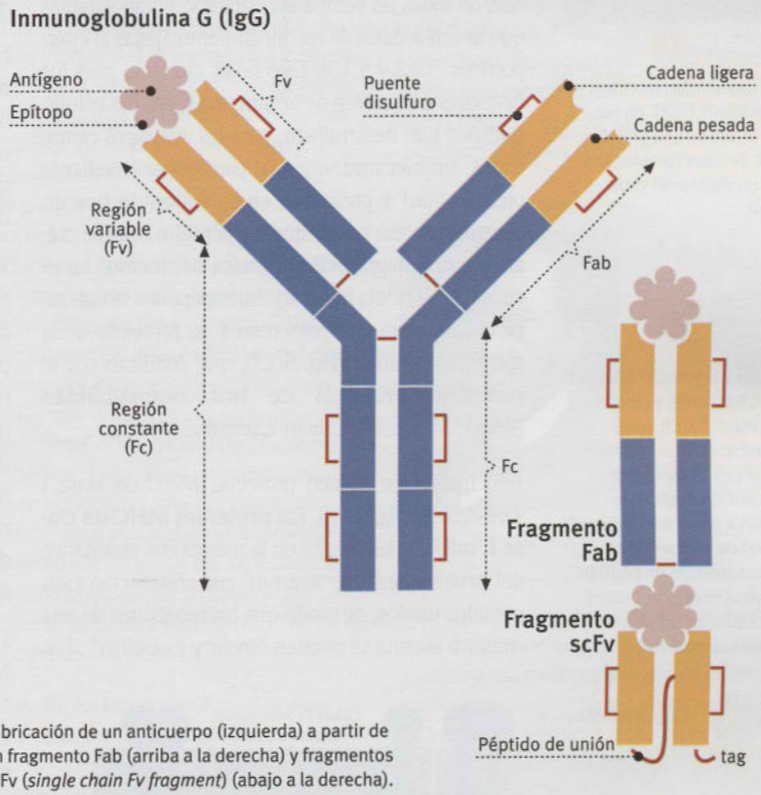
Cómo se unen al mismo tiempo tres fragmentos (Fab) del anticuerpo al epítopo de un antígeno (verde). Aquí se ilustra nuestra conocida enzima lisozima (véase también Cap. 2). El segundo Fab y el "pie" del anticuerpo (parte Fc) se muestran sombreados.

Las moléculas de anticuerpos constan de cuatro cadenas proteicas: dos cadenas L ligeras (*light*, peso molecular de 25 kD) y dos cadenas H pesadas (*heavy*, MW 55 kD). Se mantienen unidas por puentes disulfuro.

El "pie" es igual para todos los anticuerpos, y se denomina también región constante (Fc, *fragment constant*). Con la parte Fc el anticuerpo se mantiene fijo en la superficie de la célula B.

¿Cómo puede el organismo fabricar anticuerpos específicos contra prácticamente cualquier material exógeno? ¿Cómo es posible reconocerlos a todos, con ese número tan increíblemente grande de antígenos? Sería demasiado complejo tener preparado un gen para cada uno de los aproximadamente cien millones de anticuerpos diferentes. El sistema inmunitario utiliza, por lo tanto, un truco genial.

Los ingenieros inmunólogos Frank Breitling y Stefan Dübel lo describen de este modo: "Así como con unos pocos componentes normales se puede llegar a construir diferentes casas, las células consiguen formar con los componentes polipeptídicos los anticuerpos modulares. Para ello se deben codificar en el genoma sólo un par de cientos de esos componentes polipeptídicos. Unos pocos componentes (grandes) codifican para la zona constante del anticuerpo. La especificidad de unión del antígeno a un anticuerpo, sin embargo, está mediada sólo por una pequeña parte de la proteína conjunta, las regiones variables. También ésta consta de nuevo de tres a cuatro módulos diferentes, que se agrupan de distinta manera en cada célula durante la diferenciación de los linfocitos B."



Fabricación de un anticuerpo (izquierda) a partir de un fragmento Fab (arriba a la derecha) y fragmentos scFv (*single chain Fv fragment*) (abajo a la derecha).

Los anticuerpos circulantes libres se unen al antígeno y con ello lo marcan para su destrucción por otros componentes del sistema inmunitario.

Junto a estos mecanismos comentados actúa el **sistema del complemento** propio del cuerpo, una cascada de aproximadamente 30 proteínas.

Están disueltas en el plasma sanguíneo o unidas a las células, y sirven para la defensa contra los microorganismos (bacterias, hongos, parásitos...). Tienen propiedades fuertemente destructoras de células y pueden, si no están bien reguladas, causar daños tisulares en muchas enfermedades (infarto cardiaco, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide). Mediante el sistema del complemento se destruye entonces la membrana celular, y con ella las bacterias o las células dañadas y degeneradas (Cap. 9).

5.4 Respuesta inmunitaria celular: células T asesinas

Si se separa en mamíferos jóvenes el **timo** (mollejas, glándula pectoral) se provoca, igual que en la separación de la *bursa* en los pollos, la predisposición a las infecciones. Después de una timectomía



Fig. 5.11 Las células B (linfocitos B) recibieron su nombre de la *bursa fabricii*, que se encuentra en las aves (es un órgano en la sección final de la cloaca).

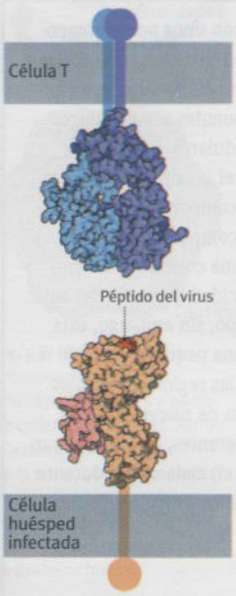


Fig. 5.12 Arriba: receptor de células T (TCR). Abajo: estructura de una proteína MHC de clase I presentada con el péptido del virus (rojo).

disminuye en gran medida el número de linfocitos (glóbulos blancos). Puesto que las células T se desarrollan en el timo, se denominaron **linfocitos T** o **células T.**

Los anticuerpos solubles (Sección 5.3) actúan muy bien contra los patógenos que se encuentran fuera de las células, pero apenas ofrecen protección contra los virus y las micobacterias (como la lepra y la tuberculosis). Éstos se protegen de los anticuerpos mediante las membranas de sus células huésped. Por ello, la evolución ha desarrollado una estrategia de defensa refinada: la **respuesta inmunitaria mediada por células.**

Los **linfocitos T citotóxicos** (también denominados células T asesinas) buscan constantemente la superficie de todas las células accesibles y matan aquellas que llevan señales de reconocimiento ajenas al cuerpo (Figs. 5.12 y 5.13). Esto no es tan fácil, pues los invasores no quieren dejar ninguna pista. Las células huésped han desarrollado, para los invasores camuflados, un mecanismo genial para cortar (mediante proteasomas) y presentar: en su superficie hay un control sorpresa con pequeños péptidos, que se crean por una degradación proteica del invasor en el citosol de la célula huésped. Estos péptidos se conducen hacia fuera y se presentan a las proteínas de la membrana celular (Fig. 5.12), que codifican por el **complejo principal de histocompatibilidad** (*Major Histocompatibility Complex*, **MHC**).

Principalmente existen proteínas MHC de clase I y de clase II (Fig. 5.13). Las **proteínas MHC de clase I**, unidas a las células en la membrana plasmática del virus atacante, se "agarran" con obstinación a sus péptidos unidos, de modo que los receptores de una célula T asesina se pueden "tocar y examinar". Los cuerpos extraños unidos a péptidos son la "señal asesina" y causan la **apoptosis**, la muerte celular programada, un "suicidio" en interés del organismo completo.

Las células T citotóxicas poseen adicionalmente una proteína, conocida como **CD8** (CD significa *cluster of differentiation*), que sirve para reconocer el complejo de la proteína MHC de clase I y el péptido que se presenta. En el reconocimiento de este complejo se entrega la proteína **perforina**, que forma poros de 10 nm de diámetro en la membrana celular diana y la hace permeable. Entonces las proteasas (granzimas) se seccionan. Las células diana se agujerean, mueren y rompen con ello el DNA propio y el del virus. Las mismas células T se despegan y se estimulan para proliferar, después de haber demostrado ser armas apropiadas contra el invasor.

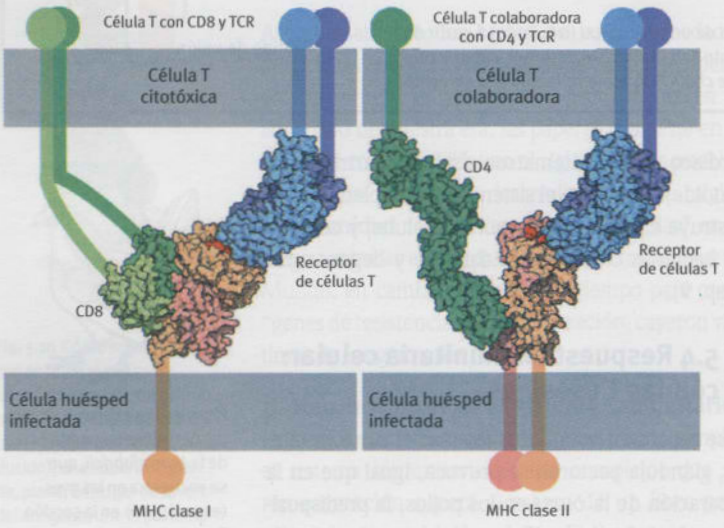
No todas las células T son citotóxicas, o sea asesinas. Las **células T colaboradoras** son imprescindibles para la defensa contra agentes patógenos, tanto extracelulares como intracelulares. Estimulan linfocitos B y células T citotóxicas para su proliferación.

También las células T colaboradoras se activan al reconocer antígenos exógenos sobre la superficie de las células presentadoras de antígenos, en general por **células dendríticas**. El antígeno está disponible, pues, como fragmento peptídico, se produce (procesa) a partir de proteínas exógenas en las células presentadoras de antígeno por degradación y sólo se presentan en la superficie de las células T colaboradoras. El reconocimiento del antígeno depende decisivamente de las **proteínas MHC de clase II** sobre las células presentadoras de antígeno.

La función de un péptido mediante las proteínas MHC de clase II es señalizar una llamada de ayuda: "¡las células entran en contacto con el patógeno!" Las de clase I, en cambio, llevan el mensaje: "¡las células matan al patógeno! ¡Presentan un mecanismo de autodestrucción!"

Las células T colaboradoras se sirven de sus **receptores de células T** y de una proteína (**CD4**) sobre su superficie, que lleva un dominio (construido como anticuerpo) similar a una inmunoglobulina extracelular (Fig. 5.13). El reconocimiento del complejo no desencadena procesos que conducen a la muerte de la célula, sino que estimula para ello a las células T colaboradoras, segregando **linfoquinas** –entre ellas la interleuquina 2 y el interferón γ. La IL-2 estimula las células B, que también antes tenían contacto con el antígeno, para proliferar y formar células plasmáticas que unen anticuerpos. Las células plasmáticas

Fig. 5.13 Izquierda: células T con CD8 (verde) y receptor de células T (TCR, azul). Derecha: células T colaboradoras con CD_4 y receptor de células T. Ambas se anclan a una célula huésped infectada, que presenta en su superficie un péptido del virus (rojo) y lo "notan" las células T y las células T colaboradoras (arriba).



Cuadro 5.3 Historia de la biotecnología: Vacunas

"Una persona que no es médico utiliza material de composición y toxicidad desconocidas y trata con ella a pacientes, entre otros un niño, que posiblemente sufren una enfermedad mortal. Intenta no sólo obtener la comprensión de sus pacientes, sino que publica su nombre y dirección para divulgar algunas afirmaciones asombrosas. Además, al igual que hacen generalmente los curanderos, oculta a los afectados las particularidades del tratamiento, de modo que su sentido y valor no se puedan juzgar por separado. Tal vez lo peor de todo es que esta persona poco escrupulosa inyecta un microbio extraordinariamente virulento antes de haber realizado un análisis en animales. Algunos pacientes mueren y un médico involucrado se distancia de las maquinaciones de su colaborador. El hombre asumió estos riesgos, para luego dejar celebrar a voz en grito su éxito en la lucha contra la rabia. ¡Fue **Louis Pasteur!**"

Ésta es la cita de Bernard Dixon, historiador de Biotecnología en el libro de Spektrum "El hongo que convirtió en presidente a John F. Kennedy". Pasteur tuvo mucha suerte, como él mismo dijo: "la suerte favorece al espíritu preparado" –exactamente como en sus otros aspectos pioneros. Violó –como anteriormente **Edward Jenner** en la vacuna de la viruela– algunos principios éticos. Postuló que el causante debía encontrarse en la médula espinal, a pesar de que el microbio aún era desconocido. Lo pudo debilitar, "atenuar", extrayendo la médula espinal de liebres y dejándola envejecer.

El 6 de julio de 1885 administró al pequeño Joseph Meister médula espinal de liebre envejecida sin saber si el virus podía encontrarse en ella. Hoy se puede ver el virus de la rabia, en forma de proyectil, que pertenece a los rabdovirus, con el microscopio electrónico (Fig. 5.5). En los tiempos de Pasteur, sin embargo, el virus era invisible. Al contrario que la vacuna de Jenner, la de Pasteur se creó en el laboratorio.

Jenner estaba en realidad "en el lado seguro": había notado que la viruela de las vacas era inofensiva. En el siglo XI, los médicos chinos observaron que las personas que habían superado una enfermedad de viruela eran resistentes a una nueva infección. En la antigua China se infectaba ya a los niños pequeños artificialmente con viruela, para que en su vida posterior estuvieran protegidos contra la enfermedad. Los altos riesgos unidos a esta vacuna parecían soportables, dada la mortalidad infantil. En China existía la diosa viruela *Chuan Hsing Hua Chien*, para los hindúes *Shitala mata*. Las reacciones a la vacuna de la viruela más leves aparecían cuando la vacuna de la viruela se aislaba de casos de viruela especialmente leves. Esta técnica de vacunación contra la viruela se extendió más tarde también a Europa. En la segunda mitad del siglo XVIII la "variolización" estaba ampliamente extendida.

Lady Mary Wortley Montagu dejó "variolizar" a su hija en 1721, y de este modo fue la primera persona en Inglaterra vacunada oficialmente. Experimentos con presos y huérfanos (!) dieron a los médicos británicos la seguridad, e incluso los miembros de la familia real se vacunaron contra la viruela. En 1756 el Colegio de Médicos recomendó la variolización. Pero antes, Edward Jenner demostró un método en gran parte inofensivo. Éste fue uno de los motivos para la disminución de la viruela y finalmente uno de los requisitos esenciales para la revolución industrial. El significado especial del descubrimiento de Jenner, sin embargo, solamente fue considerado por Pasteur. Trabajó en experimentos con el causante del cólera de las aves (*Pasteurella multocida*). Pasteur usó, en pollos, un cultivo con el patógeno, que se había dejado durante varias semanas en el laboratorio, y observó que los pollos del experimento de infección no sólo sobrevivían sino que también eran inmunes a posteriores infecciones del cólera de las aves.

Antes, sin embargo, Pasteur había demostrado abiertamente en 1881 la eficacia de una vacuna protectora de las ovejas contra el carbunco (*Bacillus anthracis*), la protección de la reproducción del gusano de seda y la fermentación del vino según los principios científicos. ¡Pasteur tuvo éxito! El éxito contra la rabia fue la base del Instituto Pasteur en París. La reacción inmunitaria del organismo, que concluyó Pasteur, condujo al desarrollo de diferentes tipos de vacunas.

Robert Koch (1843-1910) fundó la bacteriología médica. Él fue el primero en demostrar (en controversia con el belicoso Pasteur) que el cólera, el carbunco, la tuberculosis y la peste las causan bacterias especiales. Por su desarrollo de los estudios sobre la tuberculosis, Koch obtuvo en 1905 el premio Nobel de Medicina o Fisiología.

De numerosas expediciones de investigación a India, Japón y países africanos se realizaron experimentos higiénicos trópicos y parasitológicos, que permitieron el conocimiento del patógeno de la peste, la peste vacuna, la malaria, la enfermedad del sueño y el cólera.

Emil von Behring (1854-1917) llevó a cabo entonces el proceso de **inmunización pasiva** mediante la administración de antisueros (**seroterapia**). Desde 1880 hasta 1889 Behring estuvo trabajando en Berlín como director médico, antes de que en 1888 pasara al Instituto de Higiene y a partir de 1889 finalmente al Instituto para Enfermedades Infecciosas como asistente de Robert Koch. Aquí trabajó en estrecha colaboración con el médico y microbiólogo japonés **Shibasaburo Kitasato** (1856-1931).



Emil von Behring (1854-1917).

Behring obtuvo en 1890 los primeros éxitos en el tratamiento de la difteria en animales. La difteria era entonces una terrible enfermedad infecciosa, el "ángel exterminador de los niños". Mediante el trabajo de cooperación con **Paul Ehrlich**, Behring consiguió finalmente el antisuero, en 1893 , y con ello salvó la vida de muchos niños.

En 1895 Emil Behring fue nombrado director del Instituto de Higiene de Marburg. En el año 1901 obtuvo (cuatro años antes que su admirado maestro Robert Koch) el premio Nobel de Medicina o Fisiología y se le concedió un título nobiliario por el desarrollo del anticuerpo y la producción de vacunas.

Él fundó en 1904 la "factoría de Behring" en Marburg, que producía sueros contra la difteria y el tétanos en grandes cantidades.

Cuadro 5.4 Opinión de los expertos: ¿Por qué no hay aún una vacuna contra el VIH?

A primera vista parece que una vacuna segura, eficaz y barata puede ser realmente el instrumento ideal de la medicina epidémica para lograr oponer resistencia al sida. ¿Por qué no existe aún este instrumento? El sida nos acompaña desde hace casi 20 años, y en los últimos años se han invertido 300 millones de dólares en la investigación de vacunas.



Campaña contra el sida en China.

La respuesta banal es que el VIH plantea al investigador de la vacuna problemas nunca conocidos. No hay sólo uno, sino dos "tipos" de virus (VIH-1 y VIH-2) y al menos diez subtipos de VIH-1 (con diferente distribución geográfica). El causante parece tener también una prácticamente inagotable capacidad de modificar importantes características superficiales constantemente, y así deja que "se produzca un vacío" en el sistema inmunitario. Es evidente que las vacunas convencionales, que tienen como objetivo crear anticuerpos contra una característica fija del causante, en este caso no pueden conseguir nada. Es indiscutible, mientras tanto, que una vacuna eficaz contra el VIH debe activar los dos brazos del sistema de defensa –la formación de anticuerpos y los denominados mecanismos inmunitarios mediados por células.

Sin embargo, aún no se sabe qué anticuerpos y qué células representan la "tropa" más fuerte. La situación es aún más complicada porque los mecanismos de defensa que son eficaces en sangre y los que deben atacar en el tracto genital, en "primera línea de combate", están constituidos de manera totalmente diferente. Por desgracia, los modelos animales utilizados hasta ahora reflejan el curso de la infección en humanos de forma poco fiable. Mientras que los estudios con vacunas en monos tienen el problema de que los diversos primates se protegen mejor contra el VIH que contra su homólogo VIS (que provoca en los monos un síndrome similar al sida), sus expectativas, mejores que las que se despiertan mediante experimentos en ratones, no están confirmadas ("*mice tells lies*", es mientras tanto el comentario estándar, si de nuevo se publican nuevos datos de experimentos con roedores).

Al investigador le falta aún una etiqueta –o sea un marcador que pueda leer, con un simple procedimiento de prueba, el efecto de protección de una vacuna. Esto hace difícil de nuevo el estudio de la vacuna en humanos, lo que significa una respuesta inmunitaria potente de la vacuna no significa que la vacuna en realidad sea capaz "en casos serios" de prevenir una infección.





Arriba: el procedimiento del test rápido en el banco de sangre de Guangzhou (China). Abajo: todos los donantes de sangre deben ser analizados para el VIH y diferentes formas de hepatitis, para obtener sangre segura. Anuncio en un autobús de donantes de sangre en China.

Los investigadores del sida tienen, pues, que corregir también sus objetivos con el transcurso de los años. Así, una vacuna que confiera un 60% de protección se considera ya un gran éxito. Como comparación, la vacuna contra el virus de la hepatitis B, que se transmite también mediante productos de la sangre y relaciones sexuales, actúa en casi el 100% de los casos.

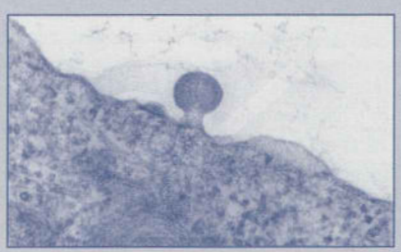
Ninguna vacuna para todas las ocasiones

Partiendo de la observación de que las personas que se infectan con un VIH "lisiado" no desarrollan sida durante mucho tiempo (en un caso durante 17 años), se tuvo la esperanza de conseguir una vacuna viva atenuada. Efectivamente, las variantes del virus a las que les faltaba el denominado gen nef (u otras secciones del gen que son importantes para la proliferación del virus) protegen a los monos, en un elevado porcentaje, contra las habituales variedades de los causantes de la enfermedad por VIH.

Sin embargo, desde principios de 2006 está claro que las variantes propias a las que faltan tres secciones de genes esenciales pueden representar una bomba de tiempo biológica en las vacunas. Así, **Ruth M. Ruprecht** y sus colegas del Dana Faber Cancer Institute, en Boston, demostraron que también las variantes del VIH modificadas artificialmente podían hacer enfermar y finalmente matar a los animales de experimentación. La vacuna viva debilitada está, por lo tanto, excluida definitivamente.

También considerada durante mucho tiempo la vacuna *non plus ultra*, la vacuna DNA-gp120 se está revelando cada vez más como una sofisticación que consume mucho tiempo. Los planos constructivos de no menos de 20 000 variantes de las moléculas gp120, por ejemplo, los quiere dirigir al organismo **Michael Schreiter**, del Instituto Bernhard-Nocht de Hamburg, mediante la vacuna DNA.

Otros investigadores también estudian, además de la información específica de los virus, determinados genes para provocar la deficiencia celular del sistema inmunitario con sustancias transmisoras activadas en la vacuna sintética. El número casi ilimitado de posibilidades de combinación exige una prueba de eficacia igualmente amplia en estudios experimentales en animales, y ello hace que la introducción en la práctica de tales vacunas se vaya retrasando.



Infección de una célula por el VIH.

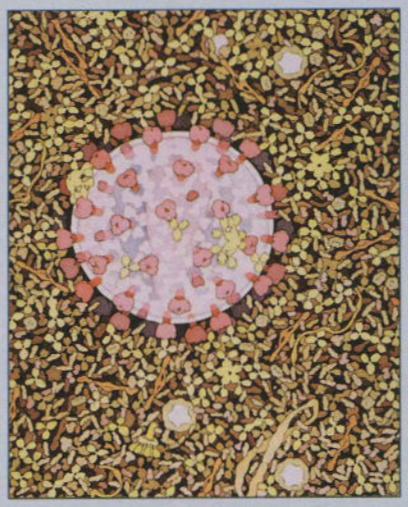
La vacuna del VIH para "todas las ocasiones", por lo tanto, presumiblemente nunca podrá existir. Se puede pensar en una gama de vacunas que se ajusten a las necesidades de diferentes grupos de riesgo: para los homosexuales no infectados, para jóvenes en zonas endémicas de sida o para los portadores del VIH como una vacuna frente al desarrollo de sida. En el mono Rhesus ya se ha probado con éxito una vacuna concebible, que por un lado impide la infección por el virus y por otro potencia tanto el sistema inmunitario que se puede mantener controlado el virus sin que se observe la enfermedad.

Problemas éticos sin resolver

Con ello está claro que las expectativas del presidente Clinton de tener, en el año 2007, una vacuna en funcionamiento, no eran realistas. También el cálculo aproximado del productor farmacéutico, de ocho a diez años, es presumiblemente demasiado optimista. Actualmente sólo hay una vacuna en ensayo clínico, y dos están en la etapa previa a los ensayos de fase II. Casi otras 30 sustancias están en "proceso de investigación" –tras 15 años de investigación de la vacuna del sida no exactamente satisfactorios. Entre la ilusión y la realidad, el hecho es que se tarda once años en llegar desde una fase I de estudio (exclusión de los efectos secundarios) hasta un "auténtico uso en clínica" (fase III).

La verdadera eficacia de una vacuna y los efectos colaterales graves, que sin embargo aparecen raramente, pueden calcularse o determinarse exactamente si se vacunan más de 10 000 personas en diferentes regiones. Estos estudios se denominan multicéntricos, y se deben planear, dar el visto bueno, realizar y valorar. Lo que significa de nuevo que aún debemos tener paciencia durante 15 a 20 años hasta disponer de una vacuna contra el VIH realmente segura y exenta de efectos secundarios.

Incluso si los problemas biomédicos se llegan a solucionar más deprisa de lo esperado, hay otra clase de obstáculos que no siempre dejan el camino libre mediante nuevos trucos inmunológicos en laboratorios de alta tecnología. Para que la duración del estudio sea lo más breve posible, así como por motivos estadísticos y de coste, los estudios con vacunas deben realizarse donde significativamente se encuentren muchas personas infectadas por unidad de tiempo –o sea, en los países en vías de desarrollo. Sin embargo, esto lleva implícitos problemas éticos que hasta ahora sólo se estudian de manera adicional.



Virus del sida en sangre rodeado de anticuerpos en forma de y.

En realidad, es obvio que los países cuyas personas "mueren" primero la "manzana" de prueba de una vacuna son también los primeros en aprovecharse de ello, suponiendo que la vacuna resulte eficaz.

La experiencia muestra, sin embargo, que las nuevas vacunas desarrolladas estuvieron disponibles con un retraso de 10 a 15 años, cuando se requerían con más urgencia. Además, las compañías farmacéuticas quieren ganar dinero con sus vacunas, pero ni las personas en los países en vías de desarrollo ni tampoco su sistema de salud pueden pagar su precio habitual en el mercado. La mayor ironía sería, según José Esparza, director del Departamento de Vacunas de VIH y Sida de la ONU, que una vacuna que ha llegado al mercado mediante estudios en un país en vías de desarrollo, por motivos financieros sólo se entregue para su uso en países industrializados. Esto hace aún más grande el existente "abismo del sida".

Otro problema ético es que personas sin información del principio –ni del riesgo asociado– participen en estudios doble ciego (en los cuales ni el médico ni el paciente saben quién ha recibido la vacuna y quién el placebo).

¿Quién debe pagar esto?

Para que los países pobres con los *AIDS-hot-spots* no favorezcan los "lugares de análisis" baratos para la vacuna del sida, los institutos de investigación de los países en vías de desarrollo se involucran por igual en los estudios de las vacunas. En muchos países del tercer mundo, sin embargo, se debe crear primero la infraestructura correspondiente, y no se ha establecido de dónde deberían provenir los medios financieros requeridos. Las compañías farmacéuticas no tienen interés en unos "costes de producción que superen el 10% del precio límite", como se exige de los países desarrollados. Para dar forma a la investigación en una vacuna contra el VIH lucrativa para la industria farmacéutica, se propuso desde diferentes ámbitos organizar unas reservas de varios miles de millones de las vacunas de todo tipo para poder comprarlas en los países en vías de desarrollo a un precio del mercado habitual. Pero quién debe aportar estas reservas – y mantenerlas– tampoco está claro.

Incluso si los diversos obstáculos se solucionan durante el largo camino hacia la vacuna del VIH, esto no significa aún que las personas se infectan también, por ejemplo, en lo más profundo del Congo. Por lo tanto, la riqueza de los países se agota ya al cuidar su población con las vacunas estándar.

Finalmente, los expertos advierten que centrarse en la "maravillosa arma de la vacuna del VIH" puede hacer fracasar estrategias de otro tipo que podrían controlar la epidemia. El dinero destinado a la vacuna dejaría de utilizarse en las medidas de lucha favoritas hasta ahora. "La extensión del VIH puede disminuir ya mañana con los conocimientos actuales", se comentó en la revista *The Lancet* en un artículo de fondo, "y con un gasto financiero claramente inferior que con la vacuna del sida."



El Dr. Hermann Feldmeier es director de departamento en el Instituto de Medicina Infecciosa de la Caridad en Berlín.

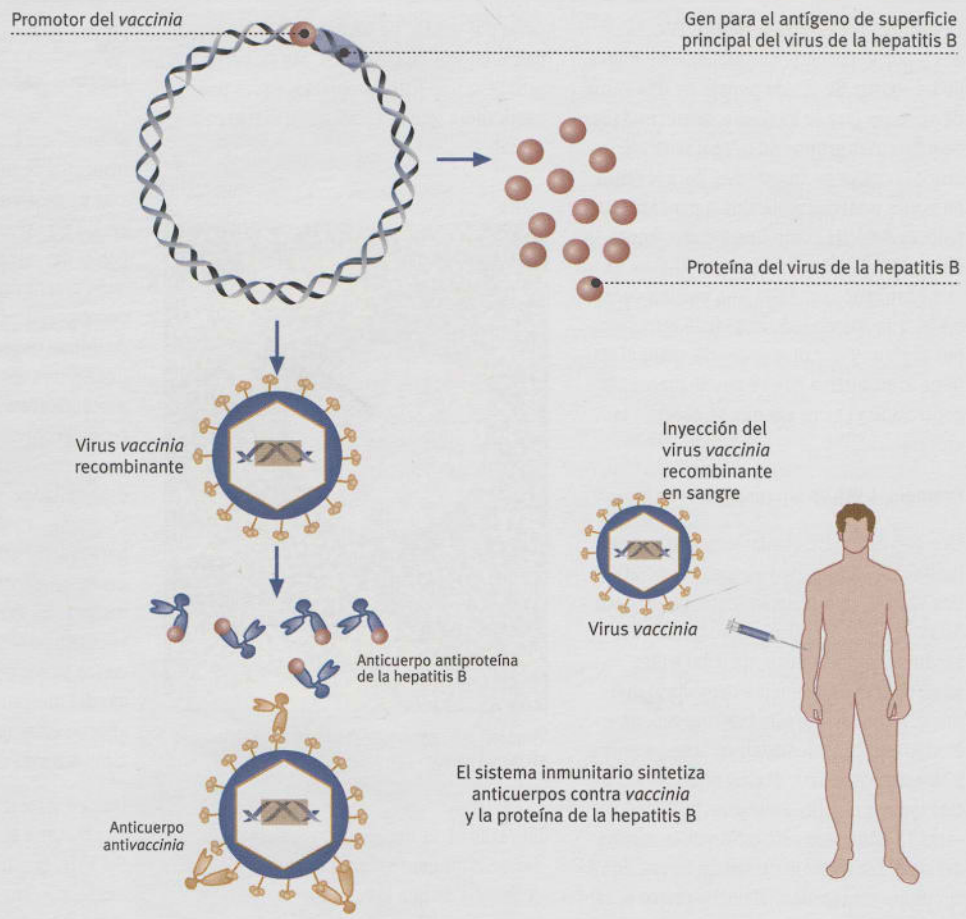


Fig.5.14 Derecha: cómo se fabrican, en un paso, las modernas vacunas contra la viruela y la hepatitis.

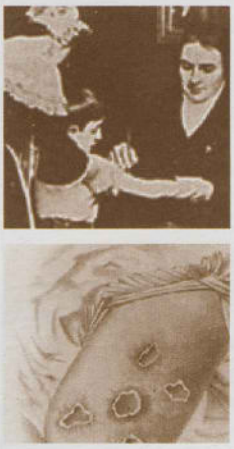


Fig. 5.15 Edward Jenner vacunando a un paciente (arriba). Dibujo de Jenner del brazo infectado de viruela vacuna de la granjera Sarah Nelmes (abajo).



Fig. 5.16 El último enfermo de viruela del mundo: el somalí de 23 años Ali Maow Maalin en 1977. Se invirtieron 200 a 300 millones de dolares en el exterminio de la viruela de la Tierra. Maow Maalin no habría sobrevivido a la enfermedad de la viruela sin antibióticos.

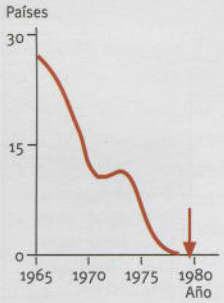


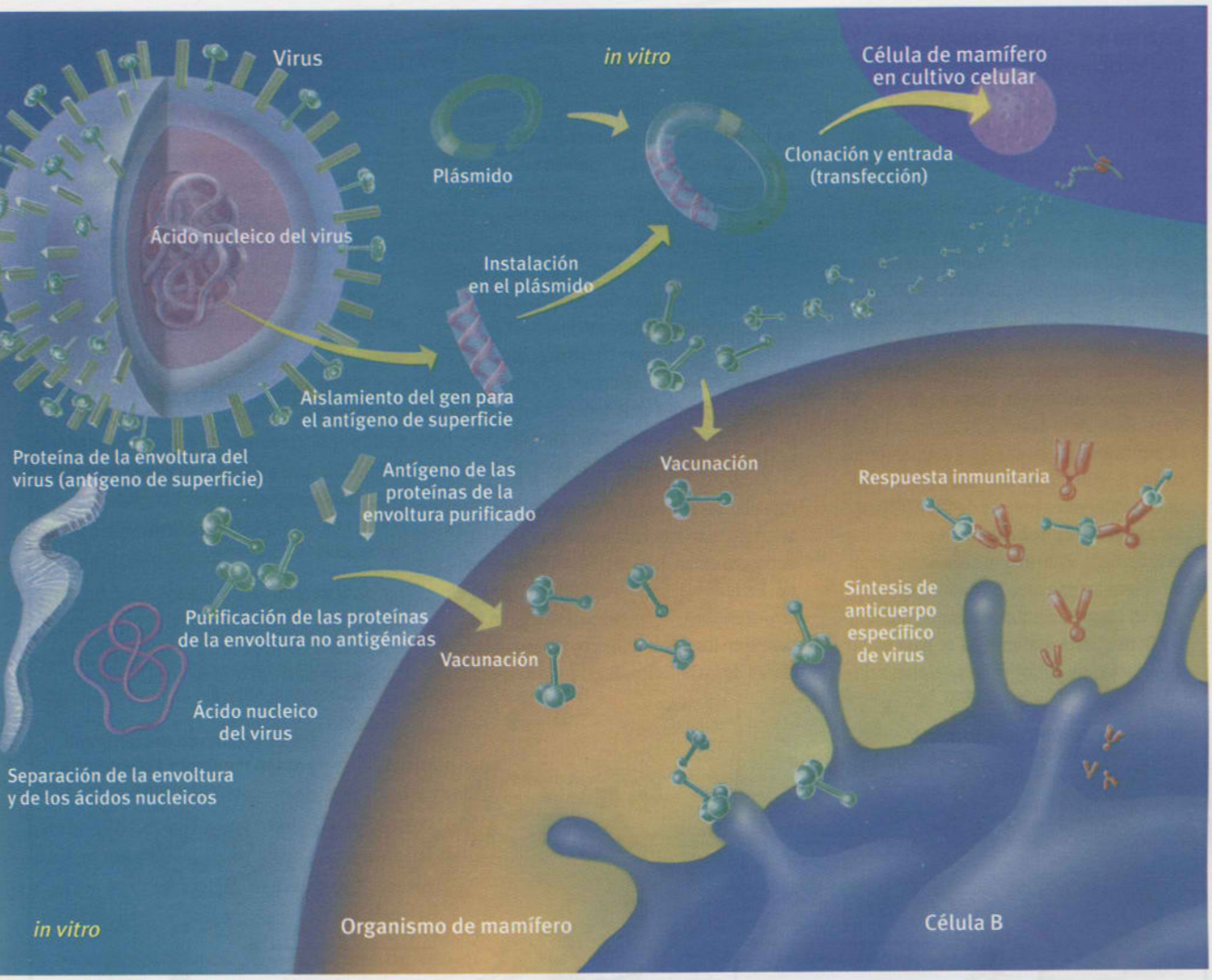
Fig. 5.17 Número de países con viruela hasta su erradicación.

segregan sus anticuerpos a la sangre. El VIH se infiltra en el sistema inmunitario mediante la destrucción de las células T colaboradoras. Una nueva sustancia señal para la infección viral es la **neopterina**, de bajo peso molecular, que se segrega por los macrófagos al plasma sanguíneo si se estimula con interferón γ. Como pudo demostrar **Dietmar Fuchs** con su grupo de trabajo (Fig. 5.22) en Innsbruck, con ella se puede realizar un test rápido de infección viral. Una alta concentración de neopterina en sangre indica que tiene lugar un ataque viral, independientemente de cuál sea el virus. ¡La neopterina puede, por tanto, ser importante para el diagnóstico temprano de virus desconocidos! Para los bancos de sangre sería una ayuda incalculable conocer todas las infecciones virales recientes de los donantes. Todos los bancos de sangre austriacos utilizan el test de la neopterina.

5.5 La primera vacuna: la viruela vacuna contra la viruela humana

Si el médico rural inglés **Edward Jenner** (1749-1823) hubiera repetido hoy su experimento, que lo hizo famoso en 1796 (Fig. 5.15), seguramente habría ido a parar a la cárcel. Su experimento, inyectar en la piel del niño de ocho años James Phipps una muestra de una pústula de viruela vacuna de la granjera Sarah Nelmes (Fig. 5.15) y dos meses más tarde una dosis de viruela auténtica potencialmente peligrosa, infringe los patrones actuales de las pautas de seguridad médica y lo tacha de negligente. Esto aún fue superado nada más y nada menos que por **Louis Pasteur** (Cuadro 5.3). Sin embargo, el niño sobrevivió y Jenner ayudó a revolucionar la medicina: se había descubierto la primera vacuna de la historia. No obstante, se ha dicho que ya había vacunaciones activas contra la viruela alrededor del año 1000 a. C.

La biotecnología promete ahora una nueva revolución para las vacunas: el desarrollo de nuevas **vacunas** (del latín *vacca*, vaca) en periodos breves con un descenso vertiginoso del riesgo de la vacunación. Jenner había observado que la supervivencia a una enfermedad de viruela vacuna no sólo aporta inmunidad contra la viruela vacuna, sino también contra la auténtica viruela humana. Lo que Jenner no sabía es que los virus de la viruela vacuna están estrechamente unidos a los virus de la viruela humana. Como ya hemos comentado, el cuerpo posee en



la sangre linfocitos que dan la alarma si aparecen invasores (antígenos) autoinvitados. Dan orden a otras células de formar material de defensa (anticuerpos) contra los patógenos, y con estos anticuerpos se marca el patógeno y es destruido por las células fagocíticas (macrófagos) (Fig. 5.7).

Ya hemos dicho que las células B proliferan tras el contacto con el antígeno y la activación por las células T colaboradoras. Una parte de la descendencia de estas células forma anticuerpos contra los invasores en mayor cantidad, y otra parte se desarrolla a células de memoria, que ante infecciones renovadas permiten una reacción inmunitaria más rápida.

Estas células de memoria permanecen parcialmente a lo largo de la vida, y con ello consiguen y confieren la inmunidad del organismo contra el correspondiente antígeno.

Jenner tuvo suerte, porque debido a la similitud de la estructura superficial de los antígenos de la viruela vacuna y de la viruela auténtica, se generó inmunidad no sólo contra la inofensiva viruela vacuna sino también contra el peligroso virus de la viruela humana. Con patógenos inofensivos se puede reforzar el sistema inmunitario del cuerpo frente a un ataque de patógenos que amenazan la vida. El último enfermo de viruela del mundo, el somalí Ali Maow Maalin (Fig. 5.16), abandonó el hospital el 26 de octubre de 1977. Después de dos años de control mundial intensivo de la viruela, finalmente fue erradicada del mundo. Sólo dos laboratorios en todo el mundo aún mantienen (¡esperemos!) el virus de la viruela: los laboratorios internacionales de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Atlanta (Estados Unidos) y cerca de Novosibirsk (Rusia). La aniquilación de las reservas es motivo de duras discusiones. A la vista del **bioterrorismo**, las naciones industrializadas acaparan vacunas contra la viruela. ¿Quién puede hoy afirmar con seguridad que el virus de la viruela no pueda caer en malas manos o estar ya en ellas? Por primera vez, gracias a la vacuna se exterminó una enfermedad de la Tie-

Fig. 5.18 Cómo se producen las vacunas.



Fig. 5.19 En las infecciones virales, los antibióticos no sirven de ayuda. Las pastillas de analgésicos antiinflamatorios son a menudo los únicos medicamentos adecuados.

Cuadro 5.5 Cómo se obtienen los anticuerpos

Desde el trabajo de Behring y Kitasato, en 1890, se sabe que las moléculas de unión específicas se pueden obtener de la sangre.

El método clásico es la **inmunización** de animales de investigación con un antígeno. Después de repetidas inmunizaciones con éxito, se pueden obtener anticuerpos del suero de los animales. La cabra de Shangai, que se muestra en la Fig. 5.24, se inmunizó con una proteína altamente purificada de músculo de corazón humano (la h-FABP, *heart Fatty Acid-Binding Protein*). Al final se purificaron de su sangre los anticuerpos contra h-FABP. Éstos son una mezcla y se unen a diferentes lugares de la superficie del antígeno (**epítopos**) con diferente fuerza (afinidad). Puesto que cada anticuerpo de determinada especificidad siempre se une en sangre a un único clon de linfocitos B y la respuesta inmunitaria se basa en la duplicación de varios clones celulares diferentes, esto se denomina **anticuerpo policlonal**.

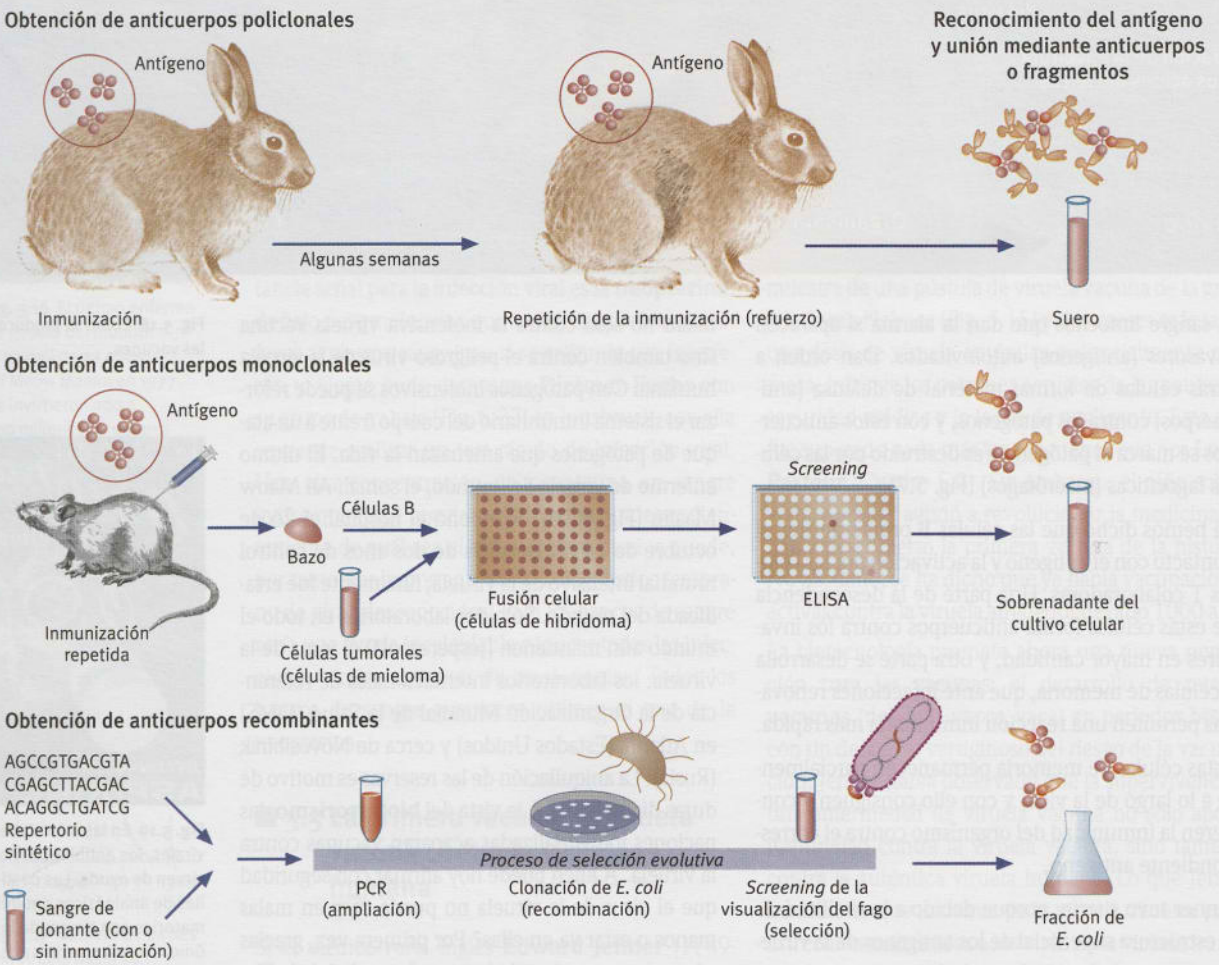
Otro método es el desarrollado por Köhler y Milstein, que utiliza la **técnica del hibridoma**. En primer lugar también se inmuniza el animal de investigación, generalmente un ratón. El ratón forma anticuerpos contra el antígeno en el bazo, que entonces circulan en la sangre y en la linfa. Debido a que se trata de una variedad de anticuerpos contra diferentes epítopos del antígeno de diferentes clones celulares, se consiguen anticuerpos policlonales. El objetivo es conseguir, sin embargo, grandes cantidades de un anticuerpo "uniforme", homogéneo, que sólo esté dirigido hacia un único epítopo.

Para ello, los anticuerpos no se obtienen de la sangre, sino más bien se toma el bazo del ratón y se aíslan de él los linfocitos B existentes. En realidad, los linfocitos B se originan en la médula ósea, de las células madre. En el bazo o en los nodos linfáticos proliferan los clones de los linfocitos B existentes específicos de antígeno, o se diferencian a células plasmáticas o células de memoria. Cada linfocito B produce sólo "su" anticuerpo, con una especificidad completamente propia.

Se funden ahora en un tubo de ensayo los linfocitos B con células mieloides (células tumorales, que crecen bien en cultivo celular) y se obtienen células de hibridoma. La descendencia de una célula, un clon, produce entonces anticuerpos uniformes: los **anticuerpos monoclonales**.

Según la selección se encuentran clones con la inmortalización de células de cáncer y la producción de anticuerpos de los linfocitos B. Se pueden producir, en principio, cantidades ilimitadas. La selección (*screening*) es, por lo tanto, compleja. Miles de clones deben cultivarse por separado en condiciones estériles y analizarse.

Los **anticuerpos recombinantes** son un tercer camino. Los anticuerpos no se producen ya en animales de investigación (*in vivo*) sino en cultivos de bacterias o de células (*in vitro*).



rra. A principios del siglo XIX enfermaban de viruela en Alemania más de medio millón de personas al año, y uno de cada diez moría. Las caras con marcas de la viruela no eran ninguna rareza.

Desafortunadamente, sin embargo, los causantes de enfermedades menores poseen "familiares" tan estrechos y al mismo tiempo tan inofensivos como los auténticos virus de la viruela. Sólo con Louis Pasteur, que había nacido un año antes de la muerte de Jenner, empezó la búsqueda selectiva de vacunas (Cuadro 5.3).

5.6 Las vacunas modernas

Hoy usamos para vacunar esencialmente toxoides, patógenos muertos y patógenos vivos debilitados. Después de los éxitos más recientes de la ingeniería genética, se trabaja en vacunas vivas modificadas y en vacunas peptídicas.

Los **toxoides** son extractos de los venenos (toxinas) suministrados por los patógenos. Éstos se neutralizan (en parte con formalina) y tras inyectarlos son estimulados por el sistema inmunitario en el cuerpo (por ejemplo en el tétanos y la difteria).

El causante del tétanos, *Clostridium tetani* (que se encuentra en el suelo), contagia por ejemplo una herida y desprende una proteína neurotóxica al torrente sanguíneo. Provoca una parálisis espástica, escenas atroces en los heridos que sobrevivían a combates en el pasado.

La vacuna del tétanos debe renovarse de vez en cuando para mantener la concentración suficiente de anticuerpos circulantes contra la toxina.

En el cólera, la parálisis infantil (polio) y el tifus se utilizan como vacuna, en cambio, **bacterias muertas** químicamente o **virus**. La vacuna del cólera no puede, pues, causar la enfermedad, pero contiene el veneno dañino (toxina) fabricado por la bacteria del cólera.

Esta vacuna es activa por vía oral. El cuerpo, tras la vacunación, forma anticuerpos propios contra las bacterias muertas y el tóxico.

La seguridad de la vacuna del cólera es aproximadamente del 90%. Los adultos y los niños a partir de 6 años reciben dos dosis de la vacuna con una separación mínima de una semana y máxima de seis semanas. La protección de la vacuna empieza ocho días después de administrarla y dura aproximadamente dos años.

Se utiliza el **patógeno atenuado** (debilitado) en la rubéola y las paperas. Lamentablemente, ocurrían

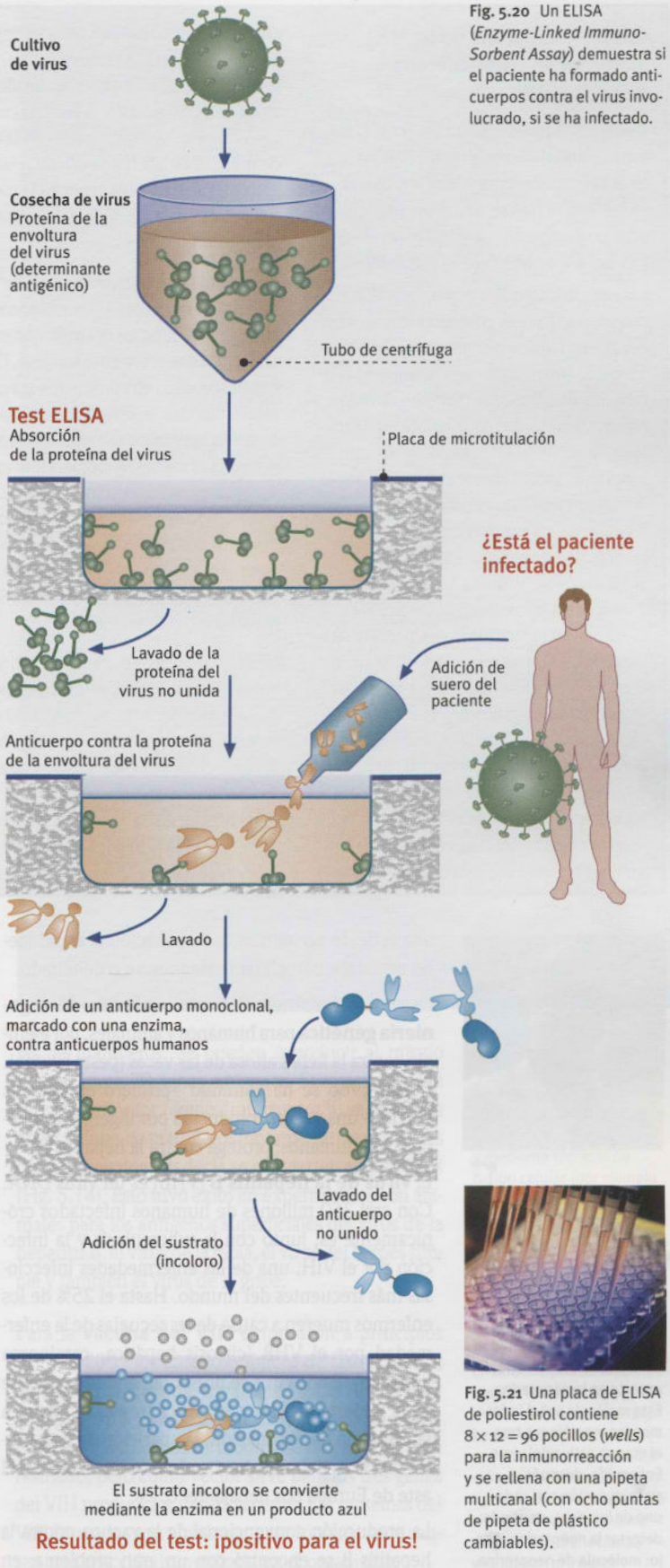


Fig. 5.20 Un ELISA (*Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*) demuestra si el paciente ha formado anticuerpos contra el virus involucrado, si se ha infectado.

Fig. 5.21 Una placa de ELISA de poliestirol contiene $8 \times 12 = 96$ pocillos (*wells*) para la inmunorreacción y se rellena con una pipeta multicanal (con ocho puntas de pipeta de plástico cambiables).

Cuadro 5.6 Historia de la biotecnología: Anticuerpos monoclonales

George Köhler estudió en Freiburg. Después de sus estudios y la promoción en el Instituto de Inmunología, en Basilea, en 1974 fue a realizar una estancia como invitado durante dos años al laboratorio dirigido por **Cesar Milstein** en Cambridge.

Los linfocitos normales, por desgracia, no pueden proliferar en cultivos celulares, y por lo tanto no pueden mantenerse como proveedores de anticuerpos. Sin embargo, en el laboratorio de Milstein se pudieron mantener durante tiempo en cultivo las células de mieloma de ratones. Son descendientes degenerados de linfocitos, que se comportan sin restricciones como células cancerosas y proliferan, y a partir de entonces poseen la capacidad de producir anticuerpos. ¿Qué pasa si se "casan" ambas con astucia y alevosía? ¿Ocurre una de tales fusiones celulares con especificidad desconocida también con una célula mieloide y un linfocito normal? ¿Las células hijas suministran, además de anticuerpos de mielomas de especificidad desconocida, también anticuerpos de especificidad conocida de los linfocitos? Para este experimento Köhler utilizó eritrocitos (glóbulos rojos) de oveja como antígeno y los inyectó en un ratón. Después de que se desarrollara la reacción inmunitaria por él causada en el cuerpo del animal, le extrajo el bazo. En el bazo se forman linfocitos, que permanecen allí en grandes cantidades. El tejido de bazo reducido se puso en cultivo con células de mieloma, junto con la sustancia química para la fusión celular (polietilenglicol). Esperó a que se generara la mezcla celular con las propiedades adicionales deseadas.

En realidad, este "matrimonio celular" produjo los sensacionales frutos esperados. Con la ayuda de eritrocitos de oveja, que entonces sirvieron como prueba del antígeno, George Köhler identificó una proporción mayor de células híbridas. Se produjeron anticuerpos contra los eritrocitos reconocidos como exógenos. Tales células se reprodujeron entonces por separado en cultivo y proliferaron. Habían heredado la inmortalidad de las células de mieloma, y al mismo tiempo producían anticuerpos con la especificidad conocida de los linfocitos, sus otras células paternas. Se denominan células hibridomas.

Después de obtener el premio Nobel, se preguntó a George Köhler en una entrevista por qué él y Milstein no habían patentado su método, pues podrían haberse hecho multimillonarios con los miles de millones de entregas de anticuerpos monoclonales. Köhler: "El señor Milstein informó a las personas responsables en el Medical Research Council de que habíamos encontrado algo que se podía patentar. Sin embargo, no recibimos ninguna respuesta. A nosotros nos daba igual, y por eso hemos publicado nuestro método. Somos científicos, no hombres de negocios. Los científicos no deberían patentar nada. No hemos reflexionado mucho sobre ello; nuestra decisión fue espontánea, digamos que nos salió del corazón. Si me hubiera ocupado del dinero, debería ocuparme ahora de los negocios de la patente. Habría sido con ello una persona completamente diferente. Eso no habría sido bueno para mí."



George Köhler



Cesar Milstein





Fig. 5.22 Arriba: Dietmar Fuchs (Universidad de Innsbruck), el principal experto en la neopterina. Esta molécula señal la forman los macrófagos tras el ataque activo del virus. Enseguida, después de la inyección con cada uno de los virus, se puede detectar la neopterina. Abajo: molécula de neopterina.

una serie de accidentes de vacunación si el patógeno no estaba completamente muerto o debilitado.

Desde 1985 existen diferentes **vacunas de ingeniería genética** para humanos y animales, por ejemplo contra la fiebre aftosa de las vacas (peste bovina). Desde 1986 se ha admitido –primero en Estados Unidos– una vacuna producida por ingeniería genética para humanos: protege contra la hepatitis B.

El **virus de la hepatitis B** (VHB) es un virus DNA. Con casi 350 millones de humanos infectados crónicamente es, junto con la tuberculosis y la infección por el VIH, una de las enfermedades infecciosas más frecuentes del mundo. Hasta el 25% de los enfermos mueren a causa de las secuelas de la enfermedad por el VHB (cirrosis hepática, carcinoma hepático). Estos virus se presentan endémicamente en el Sudeste de Asia y en África tropical. Gracias a la campaña de vacunación, la aparición de portadores crónicos del virus ha disminuido en el norte y el este de Europa por debajo del 0,1%.

La producción convencional de la vacuna contra la hepatitis B se encontró con un gran problema: en contraste con los microorganismos principales, el virus de la hepatitis B se cultiva bien en medios de nutrición o en embriones de animales (por ejemplo en huevos de gallina incubados). Las vacunas tuvieron que producirse, por lo tanto, con proteínas de las envolturas del virus, que producen una respuesta inmunitaria al antígeno superficial de la sangre infectada del portador de la enfermedad. Por ello, los virus se destruyen primero y las proteínas de la envoltura se disuelven mediante sustancias activas superficiales (detergentes) y luego se purifican. Sirven de vacuna y provocan, pues, una respuesta inmunitaria.

Naturalmente, la sangre infectada es peligrosa para las personas, que deben interactuar con ella. Los trabajadores que la utilizan deben, por lo tanto, inmunizarse, o sea vacunarse. El trabajo tiene lugar en laboratorios aislados y seguros. Cada dosis de esta vacuna se debe probar en chimpancés (se pueden utilizar solamente de modo restringido por razones éticas) para excluir impurezas de virus vivos.

La producción de una de estas vacunas dura casi un año. Resultado: una vacuna natural en cantidades

restringidas, o sea, sólo disponible para grupos de riesgo.

La nueva vacuna biotecnológica contra la hepatitis B se produce ahora con levaduras (eucariotas) manipuladas por ingeniería genética o con células de mamíferos. Se basa en una proteína superficial de este virus. Una vacuna en *E. coli* no era tan efectiva. Las células bacterianas manipuladas no pueden realizar todas las modificaciones en las proteínas, especialmente glicosilaciones (véase final del Cap. 3).

En realidad, las vacunas de DNA son los subproductos de la investigación genética. Se había visto y determinado en los experimentos de transferencia de DNA que las proteínas producidas provocan a menudo alergias (reacciones de defensa). Sin embargo, ¿cómo se podría crear una virtud de la necesidad, después de descubrir qué antígenos superficiales conducen al sistema inmunitario humano a producir la reacción inmunitaria?

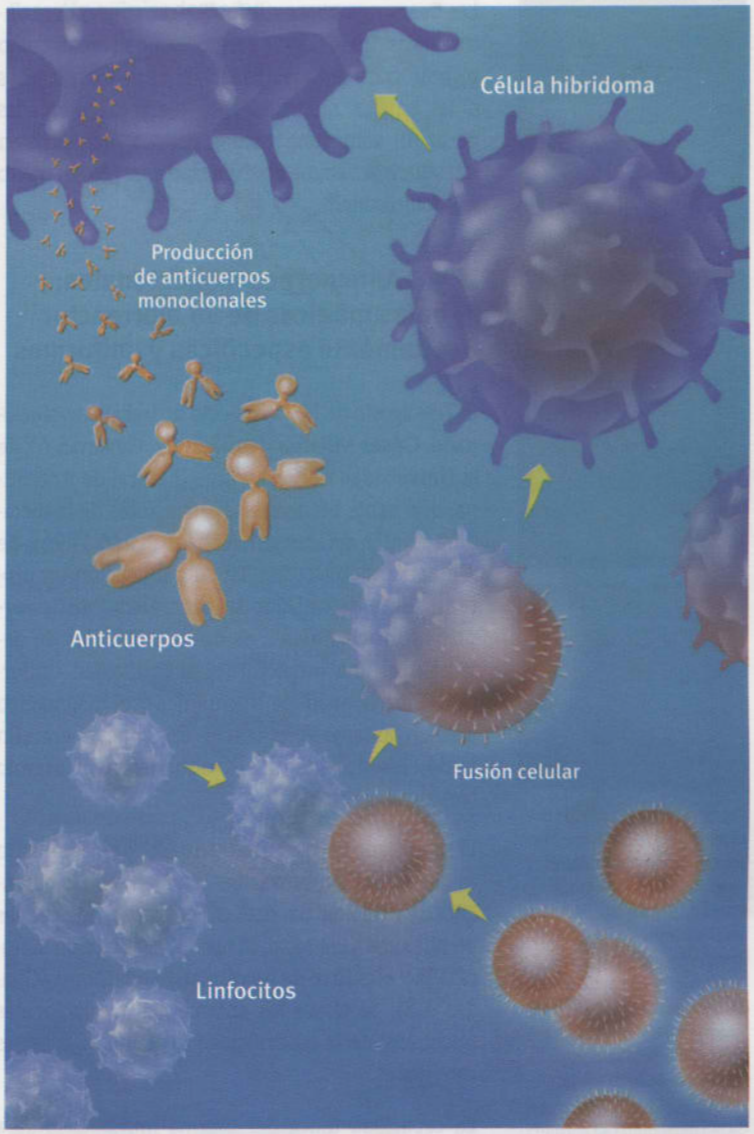
Debido a que estos antígenos son proteínas, se pueden producir mediante aislamiento de los genes correspondientes de la herencia de los virus y su incorporación en microorganismos inofensivos (como levaduras de cocción) o células de mamífero en grandes cantidades. Así, nunca hay peligro de una contaminación de la vacuna con virus.

5.7 Las vacunas vivas

La razón de la tradicional caza anual del zorro en Inglaterra también se ha convertido en obsoleta en términos científicos. El Parlamento Británico prohibió la caza del zorro a partir de febrero de 2005. El "zorro Reinecke", el animal simbólico de las fábulas alemanas, se había cazado despiadadamente hasta entonces, no tanto por ladrón de gallinas sino más bien por ser portador de la rabia.

En los bosques de Europa, los zorros se protegieron sólo biotecnológicamente mediante la preparación de un cebo con **vacunas vivas**. Para las vacunas vivas se utilizan virus inofensivos, por ejemplo el virus de la viruela vacuna (*vaccinia*) que Jenner utilizó como vacuna de la viruela. El virus sirve aquí simplemente como vector, como medio de transporte para genes exógenos. Su ácido nucleico es un DNA de doble cadena con 180 000 pares de bases.

En 1982 se pudo demostrar que, como mínimo, no se necesitaban dos fragmentos mayores del DNA para la proliferación. Éstos se pueden ampliar con DNA exógeno, bien completo o en parte. Los genes, que codifican para la **interacción de las proteínas de la envoltura** con el antígeno, se incluyen de forma estable en el material genético del virus, de modo que el virus no posee su habilidad para atacar las células de mamíferos. Se pueden introducir al mismo tiempo hasta 20 genes exógenos. Si se acoplan con un gen promotor (como "interruptor"), se expresan en las células de mamíferos juntamente con los genes del virus vacunal, es decir, se convierten en proteínas (Fig. 5.14). Esto tuvo éxito en experimentos con animales para los antígenos superficiales del virus de la hepatitis B, el virus de la rabia, el virus del herpes simple y también el virus de la gripe.



Para la **vacuna del VIH** empezaron a principios del año 2005 los ensayos clínicos de fase II para la denominada vacuna trivalente "MRKAd5 VIH-1 gag/pol/nef". Se basa en un virus del resfriado (adenovirus) modificado, de modo que no causa ningún resfriado, pero como vector sirve para los tres genes del VIH producidos sintéticamente. Las proteínas del VIH formadas son absolutamente inofensivas y causan una reacción inmunitaria en el organismo.

Fig. 5.23 Cómo se originan las células hibridomas para los anticuerpos monoclonales: los linfocitos se aíslan del bazo de un ratón y mediante técnicas de fusión celular (por ejemplo polietilenglicol o electrofusión) se unen con células de mieloma (células cancerosas degeneradas del sistema inmunitario) para formar células híbridas (células hibridomas), que reúnen en ellas la capacidad de producir anticuerpos de los linfocitos y la inmortalidad de las células cancerosas. Las células hibridomas crecen en medios de alimentación en colonias del mismo tipo de células (clones), que sintetizan todas el mismo anticuerpo (monoclonal) y lo liberan al medio.







Fig. 5.24 Los anticuerpos policlonales se obtienen en conejos (arriba) y en cantidades mayores con cabras (aquí una cabra de Shanghai). Se forman por inyección del correspondiente antígeno para la producción de anticuerpos. Determinadas líneas de ratones sirven, tras la inmunización, como productoras de células de bazo (abajo).





Fig. 5.25 Multitud en la recepción del banco de sangre de Guanzhou en China. Los donantes son analizados previamente con un test rápido de sífilis y hepatitis. Así se descubren de manera rápida los infectados y no se les permite donar.

Las **"vacunas comestibles"** generan grandes controversias. En el Cap. 7 veremos que se crean como plantas transgénicas. Especialmente los plátanos o las patatas marcadas (por ejemplo coloreadas de azul), como una vacuna por vía oral, podrían introducir la vacuna en el cuerpo a través del tracto gastrointestinal.

5.8 Anticuerpos monoclonales: balas mágicas de un biorreactor altamente específicas y uniformes

El 7 de agosto de 1975 apareció un trabajo revolucionario. **César Milstein** (1927-2002, Cuadro 5.6), de la Universidad de Cambridge, natural de Argentina, que había huido de su patria antes de la dictadura militar, y **Georges Köhler** (1946-1996), de Alemania, describieron en su publicación un procedimiento con el que se generaban **"anticuerpos monoclonales"**, es decir, moléculas de defensa con una estructura y especificidad uniformes. Para la analítica bioquímica y el diagnóstico médico amaneció con ello una nueva era. En 1984, los dos científicos obtuvieron el premio Nobel por su trabajo.

El significado revolucionario de este procedimiento es que tras la inmunización de un animal, la obtención de tejido del bazo, el cultivo mezcla de células de mieloma y de bazo, la fusión, la selección sintonizada y el cultivo de las células de hibridoma (Cuadro 5.5), se aíslan los anticuerpos monoclonales selectivos, de la especificidad deseada, en grandes cantidades.

La capacidad única del sistema inmunitario para reconocer determinadas estructuras de forma selectiva y con la más alta sensibilidad –concretamente molecular– puede utilizarse luego en personas.

Las balas mágicas del guardabosques Max, fundidas en el Valle del Lobo, buscaban certeramente su diana, por lo menos en la ópera "El cazador furtivo" de Carl Maria von Weber (Fig. 5.27).

También **Paul Ehrlich** buscó sus *magic bullets*, balas mágicas, que son los anticuerpos monoclonales para la medicina de hoy. En el diagnóstico, los anticuerpos monoclonales conquistan hoy otras áreas.

Tomemos por ejemplo una enfermedad viral. El cuerpo forma anticuerpos como reacción al ataque del virus. Si se dispone de anticuerpos monoclonales contra el virus implicado, se puede observar en los fluidos corporales de los pacientes que éste ha sido infectado (Cap. 10, **test ELISA para virus**). Los tests de este tipo son ya habituales para el VIH y la hepatitis (Figs. 5.20 y 5.21).

A menudo, sin embargo, no se detecta el propio virus; para ello las pruebas no suelen ser lo suficientemente sensibles, sólo si se han formado anticuerpos en el paciente. La desventaja: los anticuerpos antivirus se producen tras semanas en cantidades analizables. Si alguien tiene una infección reciente por el VIH, no se pueden analizar aún los anticuerpos en sangre.

En la epidemia de SARS en Hong Kong se tuvo un problema con la **reacción en cadena de la polimerasa** (PCR, véase Cap. 10) para detectar el virus de forma rápida y segura. A ello se añadió que la PCR es tan sensible que sólo con el aire del laboratorio se refuerzan las impurezas de los ácidos nucleicos. Los pacientes sanos se identificaban falsamente ("falsos positivos") como casos de SARS, y entonces realmente se infectaban en el hospital con SARS.

Lo que funciona para los virus es válido también para otros tipos de patógenos; más aún, también para células corporales afectadas de cambios en la estructura de su superficie. En determinados tipos de cáncer, por ejemplo, aparecen estructuras de proteínas muy especiales en las células tumorales involucradas. Éstas ayudan, por regla general, a que el sistema inmunitario reconozca un tumor. También contra ellas, los denominados **marcadores tumorales** producen anticuerpos monoclonales. Si se diagnostica un tumor de este tipo, se puede determinar exactamente su tamaño y longitud en el cuerpo con la ayuda de anticuerpos monoclonales. Éstos pueden mejorar considerablemente las posibilidades de tratamiento –por ejemplo la extracción quirúrgica o la irradiación del tumor.

El seguimiento del cáncer transcurre de la siguiente manera: el anticuerpo monoclonal se "marca" en el tubo de ensayo mediante una reacción química con una sustancia radiactiva y se inyecta en el torrente sanguíneo del paciente.

Los anticuerpos se reparten en principio por todo el cuerpo. Las moléculas de anticuerpos que encuentran el tumor se unen a él de forma estable. Con ello se concentra durante un tiempo la radiactividad en el tumor. Para mantener baja la carga de radiación del paciente se utiliza, obviamente, una dosis muy baja de radiactividad. A pesar de ello, la fuente de radiactividad se localiza exactamente en el cuerpo con métodos de medición sensibles. Esto aporta al médico datos exactos sobre el tamaño y la posición del tumor.

La herramienta principal para una terapia tumoral se encuentra hoy en los anticuerpos monoclonales. En conjunto, la técnica tiene como objetivo remediar o reducir un problema principal de la quimioterapia: incluso los mejores medicamentos tienen una elevada toxicidad que no se dirige sólo a las células cancerosas, y los efectos colaterales no deseados son, por lo tanto, inevitables. En esta situación, acoplados con tóxicos celulares, los anticuerpos monoclonales pueden desempeñar el papel de balas mágicas terapéuticas, que alcanzan por separado e infaliblemente su lugar de acción. El primer gran éxito se logró con el anticuerpo monoclonal rituximab contra el linfoma no Hodgkin (véase más abajo). Este anticuerpo se produce por ingeniería genética.

Tras cien años pareció realizarse el sueño del gran médico Paul Ehrlich (Fig. 5.36). Él comparó la manera de interaccionar de los anticuerpos (que él denominaba "receptores" o "cadenas laterales") con las balas mágicas. Paul Ehrlich esperó poder convertir este principio, en algún momento, en la base de una nueva generación de medicamentos altamente selectivos.

Otros descubrimientos fascinantes se están preparando. Ya se ha conseguido producir **anticuerpos biespecíficos**, en los cuales cada uno de los lugares de unión une un antígeno diferente. Se experimenta también con anticuerpos que contienen partes de diferentes seres vivos (por ejemplo anticuerpos "humanizados", véase más abajo). Se abren perspectivas completamente nuevas con los anticuerpos con actividad enzimática: **anticuerpos catalíticos** o **abzimas**, que agrupan la selectividad de los anticuerpos con la fuerza catalítica de las enzimas.

5.9 Anticuerpos catalíticos

¿Pueden servir los anticuerpos también como enzimas? Puesto que tanto las moléculas de anticuerpos como las de enzimas se unen de manera similar (principio llave-cerradura o ajuste inducido, Cap. 2), **Richard Lerner** y su colaborador en la Clínica Scripps de California tuvieron la idea de construir anticuerpos con propiedades catalíticas.

Las enzimas rebajan la energía de activación requerida, en tanto que no unen con más fuerza los sustratos sino que forman un **estado de transición** del sustrato (Cap. 2). El estado de transición (en inglés, *transition state*) se estabiliza de este modo y, como resultado, se necesita menos energía para formarlo; lograr el equilibrio de reacción se acelera a menudo en miles de millones de veces.

La idea era entonces que, si se podía desarrollar un anticuerpo contra un estado de transición de la materia, este anticuerpo también debería catalizar la correspondiente reacción. Pero para formar un anticuerpo se necesita el antígeno que provoca una respuesta inmunitaria en un animal de investigación. El estado de transición de un sustrato es, sin embargo, inestable, de modo que prácticamente no

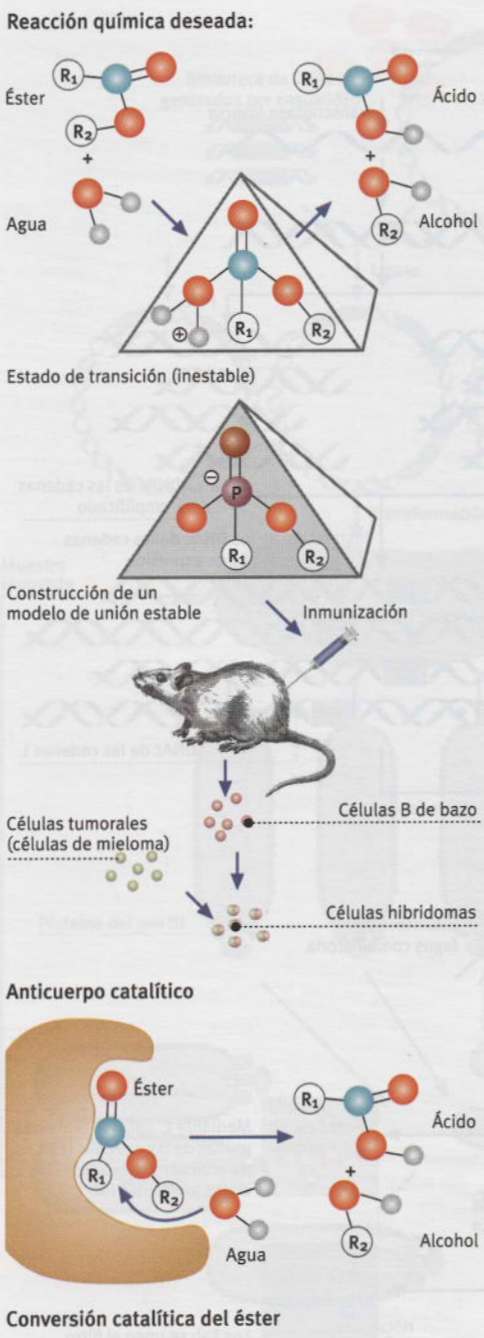
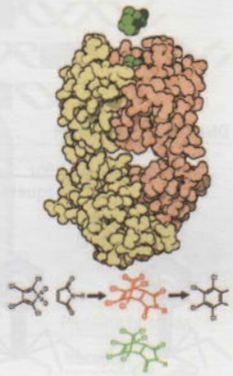


Fig. 5.26 Cómo se producen los anticuerpos catalíticos; aquí los anticuerpos catalíticos para la hidrólisis de éster (izquierda, esquema). Abajo: La reacción química de Diels-Alder no puede ser catalizada por enzimas naturales, y sin embargo tiene un significado esencial para la síntesis química. Las dos materias de partida forman un complejo intermedio inestable (en rojo), que entonces se degrada a dióxido de azufre y el producto final. La enzima actúa estabilizando el producto intermedio. Para convertir un anticuerpo en una enzima se debe intentar estabilizar químicamente el estado intermedio del producto, imitándolo.



La molécula verde es una imitación estable. La imitación se inyecta entonces a ratones, y se obtienen anticuerpos contra ella. Estos anticuerpos se comportan catalíticamente, es decir, convierten en realidad el producto de partida, aunque no con la efectividad de una enzima "auténtica". Aquí se muestran (en una visión desde arriba) sólo ambas "manos" del anticuerpo.



Fig. 5.27 El demonio Samiel en la ópera "El cazador furtivo" habría separado hoy los monoclonales como las balas mágicas.

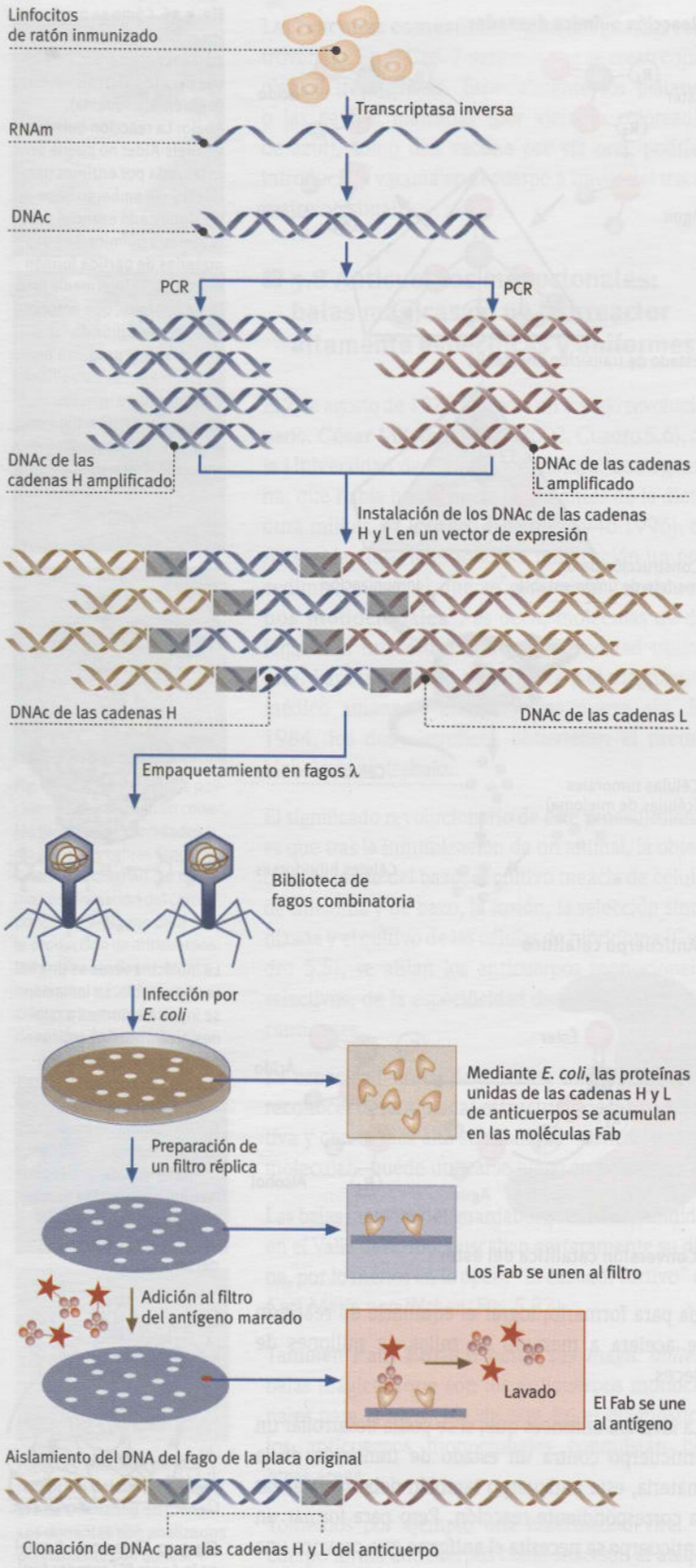


Fig. 5.28 Preparación de una biblioteca de anticuerpos combinatoria.

existe en forma libre y no se pueden generar anticuerpos contra él en animales de investigación. La solución consistió en construir modelos químicos que se parecen de manera engañosa y espacialmente al auténtico estado de transición de un sustrato, pero que son estables (Fig. 5.26).

Un ejemplo es que en la **hidrólisis de un éster** (rotura mediante incorporación de agua en un éster) transcurre la reacción desde la molécula de éster planar (los átomos se encuentran en un plano), pasando por un estado de transición con ordenación tetraédrica de los átomos (átomos colocados en las esquinas de un tetraedro), para formar otra vez un producto planar (ácido y alcohol). El éster es eléctricamente neutro; en cambio, el estado de transición está polarizado por cargas positiva y negativa.

Se encontró entonces un **modelo molecular estable**, en el cual el fósforo sustituía al carbono central del éster (Fig. 5.26). Así se imita la geometría y la distribución de cargas del estado de transición inestable. La sustancia modelo, tras su unión a una proteína portadora, produjo como antígeno una reacción inmunitaria en ratones. Entre las células hibridomas originadas se seleccionaron algunos clones que se unieron a la sustancia modelo.

Entonces se añadió éster a los anticuerpos monoclonales así originados. Algunos no mostraron ningún efecto; posiblemente eran específicos para una parte de la molécula que no era significativa para el estado de transición. En cambio, otros anticuerpos aceleraron la reacción unas mil veces.

Una reacción química muy interesante es la **reacción de Diels-Alder**, para la cual no existe ninguna enzima en la naturaleza. Sin embargo, se consigue construir anticuerpos catalíticos para ella (Fig. 5.26, derecha).

5.10 Anticuerpos recombinantes

Para muchas aplicaciones se requiere una estructura unida a un posible antígeno pequeño. Antes del desarrollo de la ingeniería genética, sólo se podían originar anticuerpos convencionales mediante la inmunización (**anticuerpos policlonales** directamente a partir del suero del animal) o mediante la técnica del hibridoma (**anticuerpos monoclonales**) (Cuadro 5.5).

Ahora hay, desde hace poco, anticuerpos *in vitro*, o sea generados fuera del cuerpo del animal, en cultivos celulares o de bacterias –principalmente sólo las partes que unen antígenos, es decir, un fragmento (**fragmento Fab**, *fragment antigen binding*). Antes, los fragmentos Fab (Cuadro 5.2) sólo se po-

dían obtener a partir de anticuerpos completos mediante la fragmentación con proteasas. Hoy se pueden conseguir por la ruta recombinante.

Los lugares más importantes para la unión de anticuerpos son las regiones variables (Fv). A éstas les falta, sin embargo, el enlace estabilizante mediante los puentes disulfuro de las cadenas constantes. Se deben estabilizar de forma adicional: se unen generalmente mediante un enlace peptídico a una hebra simple. Además, contienen aún una "etiqueta" (en inglés *tag*), una extensión para un cambio de propiedades bioquímicas o para unirse a superficies. Así se originan **fragmentos Fv de *cadena simple*** (fragmentos scFv; Cuadro 5.2, a la derecha, abajo).

¿Por qué entonces **anticuerpos recombinantes** si el sistema inmunitario posee una reserva casi inagotable? Una buena noticia para los amigos de los animales es que ahora se pueden generar anticuerpos completos sin la ayuda de animales o humanos. ¡En los tiempos de la encefalitis espongiforme bovina, la hepatitis y el sida es una ventaja!

Los anticuerpos obtenidos son naturalmente también **monoclonales**, es decir, se forman de un único clon, son altamente específicos y se unen exactamente a un epítopo.

Si se pueden producir anticuerpos, por ejemplo, con la ayuda de las bacterias *coli*, es mucho más barato y más rápido que la producción en cultivo celular animal con células hibridomas. Más importante aún es el hecho de que la ingeniería completa de *E. coli* está disponible: la secuenciación, el análisis y las modificaciones se simplifican enormemente.

5.11 Bibliotecas de anticuerpos combinatorias

Incluso en una fusión exitosa de mieloma (cáncer) y células de bazo a células hibridomas pueden generarse solamente docenas o como máximo cien anticuerpos diferentes –no demasiados, ¡si se piensa que nuestro sistema inmunitario puede producir 100 000 000 de anticuerpos de diferente especificidad! ¿Cómo se puede desarrollar este gigantesco potencial?

Se evita el paso de la fusión (que en realidad es bastante poco eficaz), se inyecta el antígeno a un ratón, se toman entonces tras la inmunización células de bazo y se origina el RNAm maduro (Cap. 3). Con ello se produce sólo el material genético de los exones; los intrones ya están cortados. Con la transcriptasa inversa se sintetiza, a partir del RNAm de una hebra simple, un copy DNA (DNAc) de doble hebra. Con la PCR (Cap. 10)

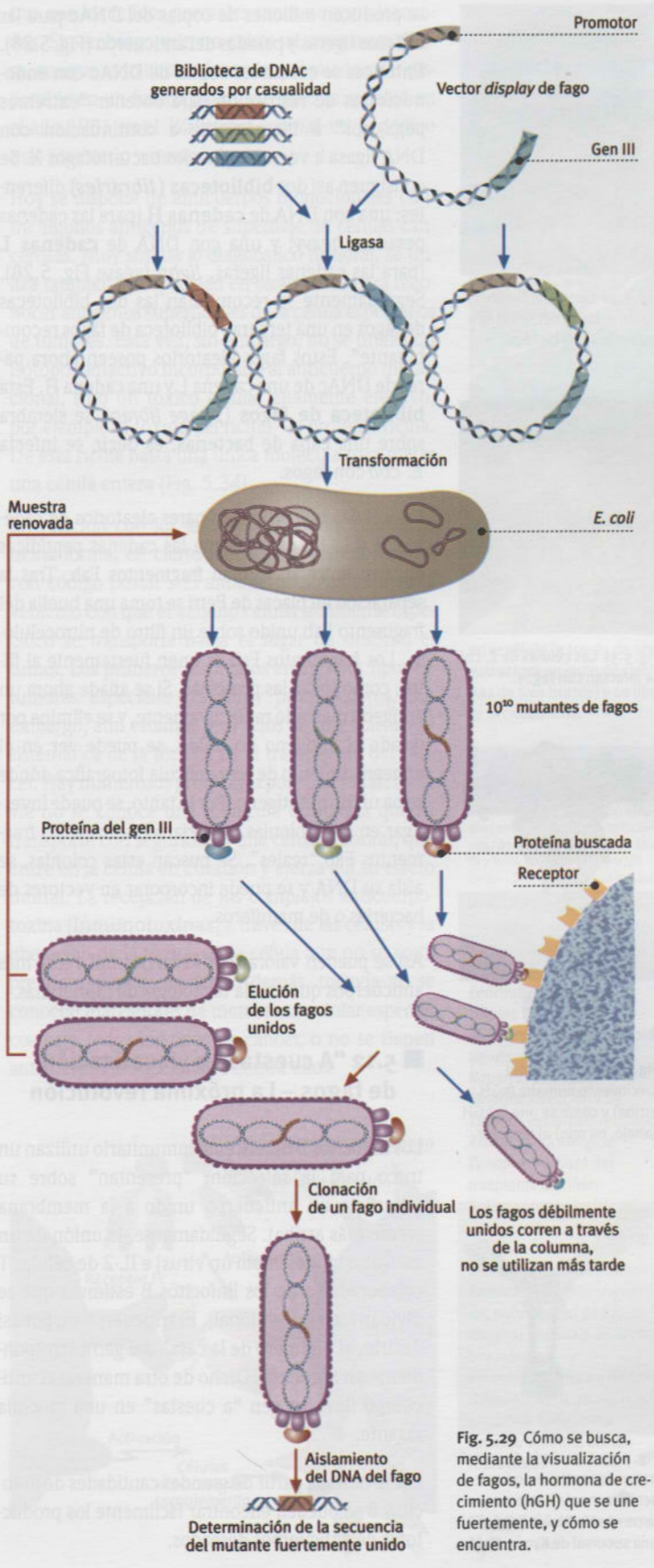


Fig. 5.29 Cómo se busca, mediante la visualización de fagos, la hormona de crecimiento (hGH) que se une fuertemente, y cómo se encuentra.



Fig. 5.30 George P. Smith utilizó el bacteriófago M13 para el *display* de fago.



Fig. 5.31 Las células de *E. coli* se infectan con fagos.

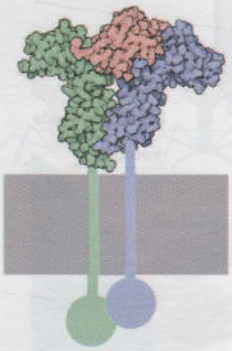


Fig. 5.32 Hormona del crecimiento humana (hGH, arriba) y cómo se une la hGH (abajo, en rojo) al receptor.



Fig. 5.33 Ingeniería de proteínas en los anticuerpos, presentada mecánicamente por la compañía Biowa (Japón), una sucursal de Kyowa Hakko.

se producen millones de copias del DNAc para las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo (Fig. 5.28). Entonces se cortan las copias de DNAc con endonucleasas de restricción para obtener "extremos pegajosos" e incorporarse a continuación con DNA ligasa a vectores para los bacteriófagos λ. Se consiguen así dos **bibliotecas (*libraries*)** diferentes: una con DNA de **cadenas H** (para las cadenas pesadas, *heavy*) y una con DNA de **cadenas L** (para las cadenas ligeras, *light*) (véase Fig. 5.28). Seguidamente se recombinan las dos bibliotecas de fagos en una tercera "biblioteca de fagos recombinante". Estos fagos aleatorios poseen ahora pares de DNAc de una cadena L y una cadena H. Esta **biblioteca de fagos** (*phage library*) se siembra sobre una capa de bacterias, es decir, se infecta *E. coli* con fagos.

Las células *coli* producen pares aleatorios de cadenas H y L. En caso de que las cadenas peptídicas encajen entre sí, forman fragmentos Fab. Tras la separación en placas de Petri se toma una huella del fragmento Fab unido sobre un filtro de nitrocelulosa. Los fragmentos Fab se unen fuertemente al filtro, como todas las proteínas. Si se añade ahora un antígeno marcado radiactivamente, y se elimina por lavado el antígeno no unido, se puede ver en el ennegrecimiento de una película fotográfica dónde se ha unido el antígeno. Por lo tanto, se puede investigar en qué colonias bacterianas se unen los fragmentos Fab "reales". Se buscan estas colonias, se aísla su DNA y se puede incorporar en vectores de bacterias o de mamíferos.

Así se pueden valorar por lo menos mil veces más anticuerpos que con la tecnología de hibridomas.

5.12 "A cuestas" o visualización de fagos – La próxima revolución

Los linfocitos B del sistema inmunitario utilizan un truco para la selección: "presentan" sobre su superficie un anticuerpo unido a la membrana (véase más arriba). Seguidamente, la unión de un antígeno (por ejemplo un virus) e IL-2 de células T colaboradoras de los linfocitos B estimula que se dividan (selección clonal). El anticuerpo es, por así decirlo, el "número de la casa" del gen correspondiente en linfocitos. Dicho de otra manera: el anticuerpo lleva su gen "a cuestas" en una mochila gigante.

Por lo tanto, a partir de grandes cantidades de linfocitos B se pueden encontrar fácilmente los productores de anticuerpos deseados.

El sueño del ingeniero genético es que se pudiese ver en las bacterias, por "el número externo de la casa", ¡si el gen está "dentro" de ella!

George P. Smith (nacido en 1941, Fig. 5.30) hizo realidad este sueño en 1985, en la Universidad de Missouri en Columbia. Aunque no lo encontró en bacterias, sí lo hizo para el **bacteriófago M13**. Éste es un fago filamentoso como λ (Cap. 3), pero tiene un genoma mucho más pequeño. Consta de una hebra simple de DNA en forma de anillo aglomerado y tiene sólo pocos genes para la proteína de la cápside, y un ciclo de infección más sencillo: los genes para la construcción no son necesarios en el genoma del huésped.

De "manera refinada", el M13 penetra a través del "órgano sexual" (*pilus*) de las bacterias *coli*: se incorpora a la célula a su DNA de una hebra a través de un *pilus* (F). El DNA sirve entonces como matriz y forma en la célula un DNA de doble hebra. Éste no se incorpora al genoma bacteriano, sino que se replica hasta disponer de 100-200 copias. Si la bacteria se divide, cada hija consigue copias del DNA del fago.

"Generosamente", el M13 no mata a su huésped, sólo ralentiza su crecimiento. Los cientos de partículas del fago se liberan tras construir copias de DNA de una hebra, que se empaquetan en envolturas de proteínas filamentosas. Dos mil setecientas proteínas del tipo pVIII forman el túbulo. Sin embargo, la particularidad son cinco moléculas de proteínas del tipo pVII y pIX en un extremo y pIII y pIV en el otro extremo del fago (Fig. 5.29).

Es interesante que el pIII ¡también funciona si están integradas en él las secuencias exógenas! ¿Qué significa esto? Si se incorpora un gen exógeno al gen pIII en los fagos, se puede mostrar (*displayed*) el gen exógeno aparecido como proteína (o péptido) en la cubierta del fago. ¡Funcionó!

La **visualización de fagos** para encontrar el gen de una hormona de crecimiento fuertemente unida se probó en la práctica.

5.13 Visualización de fagos para la hormona del crecimiento de alta afinidad

Se querían encontrar variedades de la hormona de crecimiento humana (hGH, *human growth hormone*) con una unión más fuerte para el receptor de hGH (Fig. 5.32), y ya se sabía qué cortes de la secuencia peptídica producen la unión al receptor. Es decir, se sintetizaron **oligonucleótidos "dege-**

nerados", que codifican todos los aminoácidos en estas posiciones. Estas variantes del gen de la hGH se incorporaron a un vector M13 de forma que estuviesen junto al gen para pIII. De este modo pueden construir una proteína de fusión pIII-hGH. Esta biblioteca se introdujo en *E. coli*.

En realidad se crearon fagos M13 infecciosos con proteína pIII "normal" en la envoltura, en la cual iba colgada una variante hGH, y se presentó sobre la superficie celular sólo una variante por virus. Se consiguió una cantidad increíble de variantes de fagos. ¿Cómo se puede, ahora, encontrar los mejores?

Se pasaron los fagos a través de una columna de separación con bolas de plástico, a las cuales estaba unido fuertemente el **receptor hGH** (una proteína aislada, Fig. 5.32) (para el método véase Cap. 3, purificación de insulina con anticuerpos unidos). Los fagos sin hGH en la superficie "pasan" enseguida, sin unirse, por la columna (Fig. 5.29). También los fagos que se unen débilmente se eliminan como desperdicios del laboratorio. Sólo los "buenos" se unen fuertemente a los receptores y más tarde son eluidos con ácidos débiles.

Los fagos seleccionados de esta manera se colocaron otra vez sobre las células *coli* y se seleccionaron de nuevo en la columna. Se repitió el procedimiento un total de seis veces. Con ello se pudo disponer del fago con la afinidad más alta de las variantes hGH para el receptor hGH. Se clonó un único superfago y se determinó su secuencia de DNA. Entonces se pudo producir una hormona del crecimiento "mejorada", un caso de **diseño de proteínas** (Cap. 10).

Las consecuencias de la visualización de fagos son revolucionarias. ¿Se puede utilizar también para los anticuerpos? Sí, ¡a decir verdad con éxito! Los genes para el fragmento del anticuerpo scFv se empaquetaron en una biblioteca en M13. ¡Los fagos unidos a *E. coli* llevaban su fragmento como el "número de casa" en su superficie! El proceso de selección se denomina, por cierto, ***panning*** (por la batea, en inglés *pan*, del buscador de oro). ¡Ha estallado una nueva fiebre del oro! El cáncer es el objetivo.

5.14 Nuevas esperanzas en el cáncer: rituximab, un anticuerpo recombinante

"Imagínense un nuevo método para el tratamiento del cáncer que se basa en el principio de los misiles de crucero (*cruise missiles*). Se inyecta en el cuerpo un pequeño cohete microscópico con una cabeza de búsqueda automática, que persigue de modo selectivo las células cancerosas y las destruye, mientras que los tejidos normales sanos no son alcanzados. Sin embargo, aún no existe tal arma maravillosa, aunque todo habla a favor de que pueda estar disponible en un futuro próximo." Esto se escribió en el año 1981 en el *Wallstreet Journal*, un periódico más bien serio y moderado.

Hoy se dispone de anticuerpos monoclonales contra algunos antígenos de superficie de células cancerosas. Muy similar al diagnóstico tumoral, se utiliza también su capacidad en terapéutica para reconocer antígenos superficiales de la célula específicos de tumores. Esta vez, sin embargo, no se utiliza un isótopo radiactivo incorporado al anticuerpo monoclonal, sino un tóxico celular altamente efectivo, por ejemplo la toxina del ricino –la proteína ricina. De esta ricina basta una única molécula para matar una célula entera (Fig. 5.34).

En relación con los anticuerpos monoclonales, la ricina forma, en cierto modo, un "veneno celular con código postal". El anticuerpo solamente es el vehículo con que el veneno celular altamente específico se transporta hacia el lugar de destino, el tumor. Los primeros resultados en algunos tipos de tumores especiales son muy prometedores. Sin embargo, aún estamos muy lejos de una aplicación sistemática de la técnica en el tratamiento del cáncer. Hay numerosos problemas por solucionar: todavía no se conoce una molécula de toxina que se transporte con seguridad a una célula tumoral, que entre en la célula en cuestión y ejerza allí su efecto mortal. La recepción de los complejos anticuerpo-toxina (**inmunotoxinas**) a través de las células y la liberación de la toxina en la célula aún no se comprenden en gran medida. Además, todavía no se conocen marcadores de membrana celular específicos para todos los tipos de cáncer, o no se tienen anticuerpos monoclonales contra ellos.

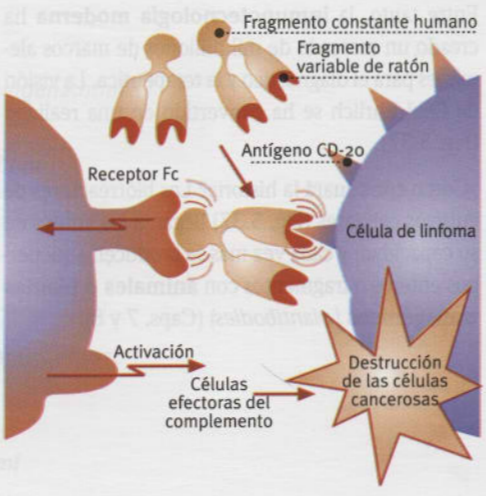


Fig. 5.35 Cómo puede actuar el rituximab.



Fig. 5.34 La inmunotoxina en acción. Una inmunotoxina (representada en rojo), compuesta de ricino y un anticuerpo en forma de Y, se une a un receptor celular CD de una célula B leucémica (en azul). La inmunotoxina unida penetra entonces en la célula (a través de una estructura en jaula de clatrinas de tres brazos) y se libera al citoplasma.

Anticuerpo recombinante admitido por la FDA

Hoy en día se realizan 400 estudios sobre terapias con anticuerpos, de los cuales 42 son de fase III y II/III, y 174 de fase II o I/II (según Stefan Dübel, mayo 2005).

Anticuerpos humanizados
Avastin: cáncer de intestino
Herceptin: cáncer de mama
Humira: artritis reumatoide
Leucosite: leucemia de células B
Milotarg: leucemia mieloide aguda
Rapsiva: psoriasis
Sinagis: infección VSR
Tysabri: esclerosis múltiple
Xolair: asma alérgica
Zenapax: rechazo del trasplante de riñón

Anticuerpos quiméricos
Cotara: diferentes tipos de cáncer
Erbitux: cáncer de intestino
Remicade: artritis reumatoide, enfermedad de Crohn
Reopro: profilaxis de la trombobembolia
Rituxan: linfoma no Hodgkin
Simulect: rechazo del trasplante de riñón
Zevalin: linfoma, artritis reumatoide



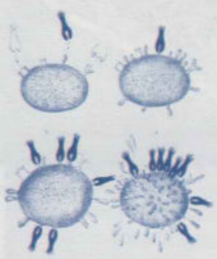


Fig. 5.36 El ganador del premio Nobel Paul Ehrlich desarrolló la teoría de las cadenas laterales de la inmunidad. Sus ideas teóricas se parecen asombrosamente a las formas hoy conocidas de los anticuerpos.



Fig. 5.37 Producción de anticuerpos monoclonales en un reactor de cultivo celular de 2000 litros de la compañía Celltech.

Sin embargo, en el año 2002 se obtuvieron ya 1300 millones de dólares americanos con anticuerpos recombinantes, y 300 000 pacientes se han tratado con ellos hasta ahora. El rituximab (*mab* viene de *monoclonal antibody*) es actualmente el tratamiento número uno del cáncer. Su meta: el **linfoma no Hodgkin (LNH)**.

El linfoma no Hodgkin es una enfermedad grave del tejido linfático, que puede afectar a muchos lugares diferentes en el cuerpo, por ejemplo a los nodos linfáticos, el bazo, la glándula del timo, las glándulas adenoides, las amígdalas y la médula ósea.

El rituximab es un anticuerpo preparado químicamente en el laboratorio, que va dirigido contra una determinada proteína de superficie que se forma en más de un 90% de las células tumorales de las células B de un linfoma no Hodgking. Esta proteína de superficie se llama antígeno **CD20**. El rituximab interacciona exclusivamente con las células que poseen el antígeno CD20 en su superficie. La unión del rituximab al CD20 produce, mediante diferentes mecanismos en los que se activa el propio sistema inmunitario, la muerte de la célula (Fig. 5.35).

Así, el mecanismo de acción del rituximab se diferencia fundamentalmente de las restantes terapias del cáncer. El rituximab sólo ataca las células que son portadoras del antígeno CD20; todas las restantes células del cuerpo no resultan dañadas.

Gracias a esta acción dirigida, el rituximab es muy bien tolerado. El rituximab es un conocido **anticuerpo recombinante humanizado**. Sus "manos" variables que unen CD3 se crean mediante la inmunización de ratones, el resto (90%) viene de los seres humanos. Por ello, el rituximab no es reconocido como "extraño" y no se combate.

Entre tanto, la **inmunotecnología moderna** ha creado un mercado de mil millones de marcos alemanes para el diagnóstico y la terapéutica. La visión de Paul Ehrlich se ha convertido en una realidad (Fig. 5.37).

¿Cómo continuará la historia? Los biorreactores de cultivos celulares (Fig. 5.37) llegan a los límites de su capacidad, y cada vez más se producen anticuerpos enteros o fragmentos con **animales o plantas transgénicos** (*plantibodies*) (Caps. 7 y 8).

Bibliografía utilizada y aplicada

- Excelentemente escrito, se espera en breve una nueva edición:
  Breitling F und Dübel S (1997) Rekombinante Antikörper.
  Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- "El Janeway", el trabajo estándar ("el Stryer" de la Inmunología):
  Mahlke K (Red.), Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M (2002)
  Immunologie. Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Todo sobre farmacobiotecnología, posiblemente algo difícil para principiantes:
  Kayser O, Müller RH (2004) Pharmaceutical Biotechnology.
  Wiley-VCH, Weinheim.
- El artículo original del padre de los monoclonales:
  Milstein C (1980) Monoclonal antibodies, *Sci. American* 243 (4): 66-74.
- Una buena base:
  Wink M (2004) Molekulare Biotechnologie, Konzepte und Methoden.
  Wiley-VCH, Weinheim.
- Una introducción a la Inmunología con bonitas ilustraciones:
  Van den Tweel J (Hrsg.) (1991) Immunologie. Das menschliche
  Abwehrsystem. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg.
- ¡Hay que leerlo! Escrito de forma emocionante por el Jefe de la DFG:
  Winnacker E-L (1999) Viren. Die heimlichen Herrscher.
  Eichborn Verlag, Frankfurt am Main.
- Lo más nuevo sobre tecnología de anticuerpos:
  Hollricher K, Dübel S, Zähringer H, Köppelle W (2005)
  Antikörpertechnologie. *Laborjournal* 6: 45-58.
- Lo último, actualizado por expertos:
  Vollmar A, Dingermann T, Zündorf I (2005) Immunologie:
  Grundlagen und Wirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH,
  Stuttgart.
- Virología de huéspedes:
  Levine AJ (1993) Viren. Diebe, Mörder und Piraten.
  Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Enlaces de web

- Página web de medicina alemana:
  www.m-ww.de/
- Todo sobre infecciones:
  www.m-ww.de/gesund_leben/impfungen/impfungen2.html
- Gran colección de imágenes de virus:
  www.virology.net/Big_Virology/BVDiseaseList.html
- Todo sobre anticuerpos:
  www.antibodyresource.com/educational.html
- Interferón:
  http://hepatitis-c.de/ifnimun.htm
- Página web de Mike Clark con animaciones de anticuerpos:
  www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html
- Más enlaces a web y anticuerpos en alemán:
  www.lexikon-definition.de/Immunglobuline.html

Ocho preguntas de autoevaluación

1. ¿Por qué no se pueden curar las infecciones virales con antibióticos?
2. ¿Cómo pueden los virus RNA interaccionar con el DNA de las células huésped?
3. ¿Qué ocurriría si Jenner y Pasteur realizaran hoy sus famosos experimentos de inoculación?
4. ¿Cómo reconocen las células asesinas si una célula está atacada por un virus?
5. ¿Cómo se obtienen anticuerpos monoclonales y policlonales? ¿Cuál fue la idea genial de Milstein y Köhler?
6. ¿Se puede combinar la alta especificidad de los anticuerpos con la fuerza catalítica de las enzimas?
7. ¿Cómo se puede colocar un "número de casa" genético sobre la superficie de los virus y utilizarlo para optimizar las proteínas?
8. ¿Cómo pueden utilizarse los anticuerpos en la lucha contra el cáncer?

Biotecnología del medio ambiente

Adiós a los caminos de una dirección, bienvenido a los circuitos

6.1 Agua limpia –Un bioproducto 150

6.2 Depuración aeróbica de los vertidos: campos de aguas residuales, tanques depuradores por filtración y lodo activado 152

6.3 Biogás 153

6.4 ¡El biogás podría salvar bosques! 154

6.5 El biogás en los países industrializados: explotación del estiércol líquido 155

6.6 El alcohol que crece en los campos 156

6.7 Los devoradores de petróleo de Ananda Chakrabarty 157

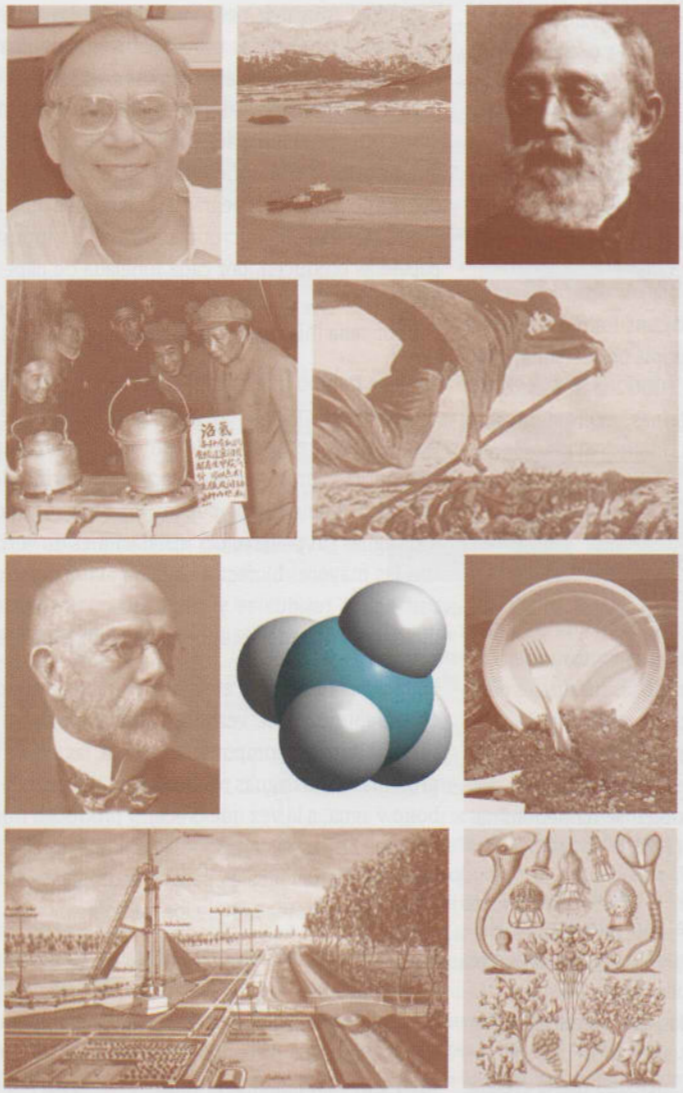
6.8 Azúcar y alcohol a partir de la madera 158

6.9 ¿Materias primas químicas de biomasa? 160

6.10 Minería silenciosa 164

6.11 ¿Una nueva vida para los pozos de petróleo agotados? 164

6.12 Bioplástica: ¡circuitos en lugar de caminos de una dirección! 165



Capítulo 6



Fig. 6.1 Robert Koch, descubridor del patógeno del cólera, la tuberculosis, el carbunco y otras enfermedades infecciosas, premio Nobel en 1905.

6.1 Agua limpia –Un bioproducto

"De todas las epidemias, el cólera es tal vez la que más miedo nos inspira: se extiende tan rápido que un hombre completamente sano al amanecer puede estar enterrado antes de que anochezca" –escribió Harold Scott, en 1939, en *A history of Tropical Medicine.*

En cualquier caso, en 1892 los habitantes de Hamburgo aún creían que podían beber directamente el agua de los ríos Elba y Alster. En Hamburgo, 8605 ciudadanos pagaron este error fatal con su vida. Hacía tiempo que el agua del río era un caldo de cultivo óptimo para los microbios –y por consiguiente, también para los causantes del cólera. En cambio, la ciudad vecina de Altona salió indemne. Allí depuraron el agua del río mediante una simple filtración con arena. En las grandes ciudades, la depuración de las aguas residuales era inaccesible.



Fig. 6.2 Epidemia de cólera, una visión espantosa de la muerte masiva.

Robert Koch (1843-1910) (Figs. 6.1 y 6.2) descubrió la bacteria productora del cólera, *Vibrio cholerae,* pero las mejoras en el suministro de agua y el tratamiento de las aguas residuales acababan de empezar. Sin embargo, el cólera y el tifus experimentaron un avance importante. La gráfica del Cuadro 6.1 indica la relación entre la cantidad de muertos por tifus y la higiene del suministro de agua.

¡Agua limpia! En la actualidad consumimos cada día de 200 a 300 litros de agua limpia por persona, y en días calurosos incluso hasta 1000 litros. Restos de comida, grasas, azúcar, proteínas, excrementos..., todo va a parar a las cloacas, incluso el detergente procedente de las lavadoras.



Fig. 6.3 Infusorios (ciliados), representados de forma artística en "*Kunstformen der Natur*" de Ernst Haeckel, en 1904. Los ciliados fijos, como la vorticela (*Vorticella*), son un indicador de la presencia de buenos lodos activados. Cada mililitro de agua residual puede contener hasta 10 000. Si ellos dominan, el proceso funciona bien.

El "grado de biodegradabilidad de la suciedad" tiene un nombre: DBO. La **demanda bioquímica de oxígeno a los cinco días (DBO_5)** se calcula en el laboratorio (Cuadro 6.2) e indica cuántos miligramos de oxígeno disuelto en agua consumirían en cinco días los microbios de las aguas residuales para eliminar por completo la carga orgánica de una muestra de agua. El agua para uso doméstico contiene una carga orgánica media de 60 g DBO_5 por habitante y por día. Esto también se ha denominado **habitante equivalente (HE)**.

En nuestro caso, se deberían consumir 60 g de oxígeno por persona y por día para eliminar 1 HE. Cuando la solubilidad media del oxígeno asciende aproximadamente a 10 miligramos por litro de agua, se necesitaría la cantidad de oxígeno disuelta en 6000 litros (!) (es decir, seis metros cúbicos) de agua limpia para eliminar la suciedad diaria creada por cada ciudadano.

Cuando las aguas residuales no depuradas van a parar a ríos y lagos, de forma muy simplificada ocurre lo siguiente: en primer lugar, los **aerobios** eliminan la suciedad orgánica y para ello consumen rápidamente el oxígeno. Aparecen zonas pobres en oxígeno (sobre todo en el suelo), en las que sólo pueden actuar las bacterias anaeróbicas.

Los peces y otros organismos dependientes del oxígeno empiezan a morirse. Los **anaerobios** forman los tóxicos amoniaco (NH_3) y ácido sulfhídrico (H_2S), que causa el olor a huevos podridos. Ambos matan entonces a los organismos acuáticos restantes que han sobrevivido a pesar de la falta de oxígeno: aparecen los canales de agua y los canales pestilentes.

En agronomía, un animal bovino genera tanta cantidad de vertidos como 16 habitantes de una ciudad. ¡1400 millones de bovinos en el mundo entero producen tantos vertidos como 22 000 millones de seres humanos! Aún más preocupantes son las enormes cantidades de vertidos procedentes de la industria. Además de las sustancias orgánicas degradables, contienen grandes cantidades de sustancias inorgánicas, desde sal común hasta ácido sulfúrico, y también productos tóxicos como mercurio y otros metales pesados que los microbios degradan con mucha dificultad o que matan a los microorganismos. Las industrias papeleras producen, por cada tonelada de papel, de 200 a 900 HE, y las fábricas de cerveza de 150 a 30 HE por cada mil litros de cerveza.

Ya hace tiempo que la capacidad depuradora natural de los microbios en los ríos no es suficiente; por ello, los vertidos se deben degradar mediante microorganismos en instalaciones purificadoras enormes, de modo que puedan volver a conducirse a las aguas sin peligro. Las instalaciones de vertidos son las mayores biofactorías de la actualidad; utilizan aguas residuales y suministran un producto biológico en grandes cantidades: **agua potable.**

Los microorganismos efectúan el trabajo más duro en la depuración de vertidos. Con la ayuda del oxígeno del aire descomponen el azúcar, las grasas y las proteínas de las aguas residuales en dióxido de carbono y agua, a la vez que crecen y producen nuevas células. En las instalaciones depuradoras se crean las condiciones ideales para la multiplicación y el trabajo de degradación de los microbios.

Puesto que para la degradación de un gramo de azúcar se consume más de un gramo de oxígeno, pero en el agua sólo se pueden disolver diez miligramos de oxígeno por litro, los microorganismos consumen muy rápidamente el oxígeno del agua. Por consiguiente, es necesario que los vertidos estén en

Cuadro 6.1 Historia de la biotecnología: Campos de aguas residuales y evacuación de vertidos en Berlín

Hasta el año 1878, en Berlín se evacuaban las aguas pluviales y las residuales, los desechos domésticos y, en parte, las aguas fecales, a través de las acequias. Estos fosos abiertos estaban situados entre la acera y la calzada, y desembocababan en una zanja de desagüe. Cuando las acequias no conducían directamente a cursos de agua públicos, desembocaban en canales subterráneos, los cuales se instalaban en su mayor parte con unas secciones demasiado grandes y sin suficiente pendiente, en función de las necesidades del momento y sin seguir ningún método.

Así pues, se generaban toneladas de residuos putrefactos que desprendían un olor enormemente desagradable. Además, las acequias constituían un enorme obstáculo para el tráfico. Los residuos fecales se recogían en estercoleros que normalmente se vaciaban a mano. El contenido se transportaba después con vehículos. Puesto que ni las calles ni las acequias ni los vehículos eran lo suficientemente estancos, el suelo y las aguas subterráneas se ensuciaban enormemente. Los ciudadanos extraían el agua de pozos propios. Estas aguas contaminadas con gérmenes fecales fueron la causa de la propagación de enfermedades.

En 1816, el gobierno decidió por primera vez lavar las acequias y las calles con agua para eliminar la basura y el hedor. Sin embargo, esta idea nunca se puso en práctica, ya que no se disponía de tanta agua que saliera a la presión necesaria. Una comisión de estudios contratada por el rey **Federico Guillermo IV** decidió, en 1846, crear una empresa de abastecimiento de agua. También se autorizó la instalación de retretes. En 1856 se fundó esta empresa en Stralauer Tor.



Berlín mejoró su abastecimiento de agua. De este modo disminuyó la mortalidad por tifus de forma inversamente proporcional.

En 1873, la ciudad de Berlín se hizo cargo de la empresa de abastecimiento de agua. Sin embargo, el "lavado en profundidad de las acequias" no cumplió las expectativas. Debido a que era más fácil extraer agua, y a que se extendió mucho el uso del retrete, la cantidad de aguas residuales aumentó de forma dramática. Las acequias, ampliadas a un metro y cavadas a más profundidad, fallaron. Aunque el problema de las aguas residuales en Berlín aumentaba tanto, seguían produciéndose las protestas masivas "tradicionales" de los berlineses críticos con el gobierno en contra de una canalización. Existía la idea de que con la canalización también se produciría putrefacción y hedor, como en los canales subterráneos que habían existido hasta el momento.

En 1860 se encargó al Consejero Privado para la Construcción **Wiebe** que realizase un viaje de estudio a Hamburgo, París y Londres, y que elaborara un plan para acabar con el problema de las aguas residuales. Durante ese año, Wiebe viajó junto con el Jefe de Construcción de Vías Fluviales y Ferrocarriles, **James Hobrecht**. Wiebe quería recoger las aguas residuales de forma subterránea y luego verterlas sin depurar al río Spree para conducirlas fuera de la ciudad. El proyecto suscitó grandes desacuerdos entre ingenieros, médicos y políticos. En febrero de 1867 se creó una Diputación, dirigida por el famoso médico y microbiólogo **Dr. Rudolf Virchow**. Se fundó una "oficina" especial dirigida por James Hobrecht al objeto de gestionar los trabajos de la Diputación. Rudolf Virchow resumió los resultados obtenidos en un informe general y lo presentó en noviembre de 1872 ante la Asamblea de Concejales de la ciudad.





Rudolf Virchow (1821-1902), a la izquierda, fundador de la patología celular, historiador de la medicina e higienista, y el conde James Hobrecht (1825-1903), a la derecha.

Ésta decidió, en mayo de 1873, empezar a construir tuberías para aguas residuales. Para ello se dividió la ciudad en varias zonas de desagüe y se las dotó de un sistema de canales independientes (sistema radial). Éste tenía la ventaja de que, cuando se producía una avería, no se debían dejar fuera de servicio todos los canales, sino que los restantes podían recoger el agua del canal averiado. Se conducía el agua por tubos de barro cocido y esmaltado, y se evacuaba fuera de la ciudad, mediante estaciones de bombeo con fuerza de vapor, a los llamados "campos de aguas residuales" situados fuera de la ciudad. La gran innovación de este sistema consistía en que las aguas residuales ya no se conducían a las zanjas de desagüe, sino que el suelo las depuraba y se podían utilizar posteriormente como abono para la agricultura. Hobrecht dividió la ciudad en doce zonas casi iguales. Para cada zona estaba prevista una gran zona de aguas residuales.

La puesta en servicio del sistema de desagüe liberó de golpe a los habitantes de la ciudad de la plaga contra la higiene y la estética que suponían las acequias hediondas y los fosos colectores de estiércol líquido. Las superficies que se acababan de adquirir debían modificarse mucho para la explotación de las aguas residuales. Se planificó una gran parte del paisaje y se construyeron presas. Aparecieron, según la inclinación, bancales horizontales o terrenos en pendiente que se regaban uniformemente. Gracias a los campos de aguas residuales se desarrolló un paisaje peculiar creado por la mano del hombre: además de evacuar las aguas residuales de la ciudad de Berlín, los campos de aguas residuales también se podían utilizar en la explotación agrícola.

En 1905 se construyó la primera planta depuradora en Wilmersdorf, y en 1930 las de Stahnsdorf y Waßmannsdorf. Éstas debían descargar a los campos de aguas residuales. Sin embargo, la cantidad de vertidos siguió aumentando. Por tanto, 60 años más tarde se convirtieron 1133 hectáreas de campos de aguas residuales en instalaciones de funcionamiento intensivo por filtros. Los campos, constantemente inundados, ya no permitían que se explotara la agricultura en esas zonas. A partir de 1974 se instalaron cubas de oxidación. Éstas debían añadir oxígeno a las aguas residuales estancadas. En 1984 se construyó en Schönerlinde la planta depuradora "Norte", con una instalación de biogás (ver Fig. 6.10), y en 1985-1986 se suprimió la explotación de las aguas residuales en el norte de Berlín porque las plantas depuradoras podían depurar el agua por completo. En ese momento, los campos de aguas residuales se convirtieron en inútiles y pudieron convertirse en zonas de recreo.



Estructura esquemática de un campo de aguas residuales. En los bancales de aguas residuales se cultivaban cereales, verduras y tubérculos. Por ese motivo, el encargado de las aguas residuales debía procurar que los campos se inundaran de forma uniforme y regular.

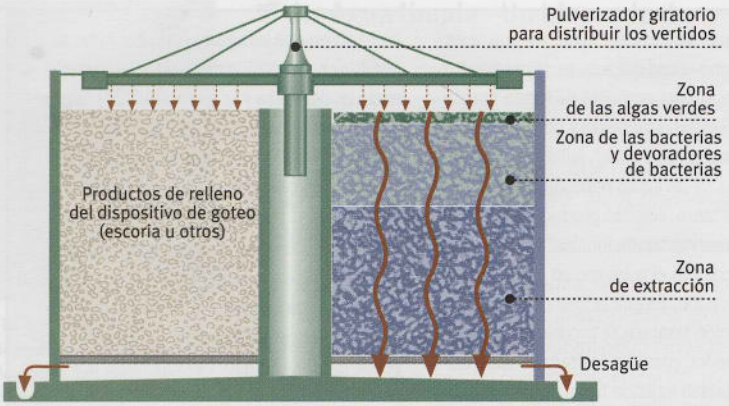


Fig. 6.4 Tecnología de un dispositivo de goteo.







Fig. 6.5 Seres vivos en aguas residuales dulces (vorticelas, paramecios y dafnia).



Fig. 6.6 Un indicador de nitratos en el proceso de tratamiento de vertidos: el ciliado *Aspidisca costata*. Con frecuencia, un mililitro de agua residual puede contener hasta 25 000 ejemplares. Además de su cantidad, *Aspidisca costata* ofrece una segunda posibilidad de análisis: la longitud de los seis cilios depende del contenido en nitratos. Cuantos más nitratos se formen, mayores serán los cilios.

recirculación constante y se ventilen con oxígeno –un proceso que consume mucha energía.

6.2 Depuración aeróbica de los vertidos: campos de aguas residuales, tanques depuradores por filtración y lodo activado

Entre los procedimientos más antiguos se encuentra el de los **campos de aguas residuales** (ver Cuadro 6.1) de las grandes ciudades europeas, como Berlín en el siglo XIX. Con este método, las aguas residuales previamente depuradas mecánicamente se filtran por el suelo, donde se degradan las sustancias orgánicas contaminantes mediante microbios.

Además de los campos de aguas residuales se buscaron variantes que proporcionasen un ahorro de espacio: otra tecnología de vertidos, **los tanques depuradores por filtración** (Fig. 6.4), desarrollados en Inglaterra en 1894, trabajan como un biorreactor de lecho fijo (ver Cap. 4) y utilizan material fino con grandes poros (lava, escoria, vidrio aglomerado, cuerpos de plástico), que se apila en recipientes tipo caldera, y sobre el que se pulverizan aguas residuales, previamente depuradas mecánicamente, mediante regaderas giratorias.

El requisito necesario para la actividad de los organismos de las aguas residuales es que las sustancias de relleno tengan una gran superficie. En los tanques depuradores por filtración se desarrolla un "césped" formado por bacterias, hongos, cianobacterias (algas azules), algas, protozoos, rotíferos, ácaros y nematodos (gusanos cilíndricos). Una excelente comunidad acuática de seres vivos (**biocenosis**) (Figs. 6.3 y 6.5).

Un tercer procedimiento más moderno es el **proceso del lodo activado** (Figs. 6.7 a 6.9), que también se introdujo hace cien años. En éste, las bacterias aeróbicas, los hongos y las levaduras construyen, después de la depuración mecánica, grandes copos con los nutrientes, los cuales se mantienen unidos con materia mucilaginosa procedente de las bacterias. Estos **copos de lodo simbióticos** constituyen la sustancia de soporte de los microbios y se hallan en suspensión en enormes **cubas de lodo activo** (Figs. 6.7 y 6.8) con paletas giratorias o cepillos que introducen aire en el agua de forma convencional. De este modo, los microbios que consumen oxígeno se pueden reproducir bien. El caudal es considerablemente mayor que en los tanques depuradores por filtración, sobre todo gracias a la mejora en el suministro de oxígeno.

Una parte de este lodo se deposita en una cuba de depuración posterior. La desventaja es el olor producido por estar ésta abierta.

En Alemania, por lo general, aún se usa en la mayor parte de los casos la tercera etapa de eliminación química de fosfatos o nitratos. Para el agua potable se realiza cloración u ozonación posterior para matar los microbios. Una pequeña parte del lodo activo vuelve a conducirse a la cuba para que exista suficiente cantidad de bacterias para los nuevos vertidos que fluirán por la cuba.

La eficacia de los microbios del lodo activo es asombrosa: un metro cúbico de la cuba puede depurar 20 veces su volumen en vertidos altamente contaminados. El lodo activo constituye hasta un 20% del total de la cuba.

El lodo depositado se trata en torres sépticas especiales sin contacto con el aire. De este modo, las **metanobacterias** (ver Fig. 6.14) pertenecientes a las arqueobacterias (*Archaea*) convierten las sustancias orgánicas restantes en metano. Éste puede suministrar energía como biogás (ver más abajo).

Las cubas de las instalaciones de purificación requieren mucho espacio, y éste suele ser escaso, en especial en las zonas industriales. Por ello, Bayer y Hoechst han desarrollado diversos **biorreactores de torre** que ahorran espacio, con una altura de 15 a 30 metros, para la purificación química de vertidos (Fig. 6.9). En total, la industria del Rin depura aproximadamente 15 000 millones de metros cúbicos de vertidos al año.

También hay **reactores de pozo profundo** que se construyen en la tierra. Gracias a la altura o profundidad de la construcción se consigue, por una parte, que las burbujas de gas se mantengan en el líquido durante más tiempo, y por otra parte, una mayor solubilidad del oxígeno debido a una presión mayor.

Ambos tipos de reactores funcionan haciendo fluir oxígeno desde el suelo, disuelven el oxígeno al 80% (en comparación con el 15% de los procedimientos normales), proporcionan un mayor rendimiento de degradabilidad, necesitan poco espacio y reducen las molestias por ruido, pero aún son caros y complicados.

6.3 Biogás

Es cierto que existen los "fuegos fatuos" en los pantanos. En el antiguo libro chino *I Ching* ya se mencionaban, hace 3000 años, "fuegos en los pantanos". En Europa, el físico italiano **Alessandro Volta** describió en 1776 el "aire en combustión sobre los pantanos". También la predilección por los "platillos volantes" en zonas pantanosas la aclaran los detractores de los OVNI con el mismo fenómeno natural: el gas pútrido ascendente contiene metano combustible. Una burbuja de metano inflamada constituye la base, totalmente terrenal, de los "fuegos fatuos" y de los OVNI. Sin embargo, no está claro cómo se produce la combustión espontánea del gas.

Al agitar el lodo de un lago, cualquiera puede ver y oler que se ha formado metano. En el **estómago de los rumiantes** también funciona una fábrica de biogás en miniatura: en el estómago de un bóvido, los microorganismos convierten diariamente entre un 8 y un 10% del pienso en 100 a 200 litros del combustible doméstico metano, que se fuga como "gas" de eructos o con los gases intestinales de los animales. Enormes manadas de bóvidos para las cadenas de comida rápida procedentes de zonas selváticas reducidas a cenizas contribuyen de forma sustancial a las existencias de metano en la Tierra. Los "inquilinos bacterianos" útiles del intestino humano producen, además de vitaminas, gases que el intestino grueso sólo puede reabsorber en parte. En función de la alimentación, el intestino extrae diariamente hasta medio litro de gas. La mayor parte es hidrógeno inodoro. Sin embargo, salen despedidas pequeñas cantidades de ácido sulfhídrico, cuyo olor varía de incómodo a muy pestilente, y otros compuestos que contienen azufre que se generan en la descomposición de las proteínas.

Cada año, los microorganismos de la Tierra forman entre 500 y 1000 millones de toneladas de metano; más o menos la cantidad de metano que se extrae anualmente de las fuentes de gas natural. Además, aproximadamente un 5% del carbono asimilado utilizado en la fotosíntesis es transformado en metano por los microbios –una parte importante del ciclo del carbono. En el fondo del mar hay enormes **yacimientos de metano** de la Era Pérmica, material para planificadores de energía y *thrillers* medioambientales: si este metano se liberara, se produciría una catástrofe. Al contrario de otros combustibles domésticos, según el Premio Nobel **Paul Crutzen** (Fig. 6.14), la concentración de metano en la atmósfera no ha aumentado de una forma sorprendente en los últimos tiempos. Excepcionalmente, esta vez los grandes productores de metano no somos nosotros sino los insectos: **las termitas.** Por una parte, cada termita (Fig. 6.22) produce con sus microorganismos del intestino (principalmente flagelados unicelulares) sólo medio miligramo de metano al día. Pero a pesar de la increíblemente gran cantidad de insectos, de esta forma sólo se producen anualmente 150 millones de toneladas de gas.

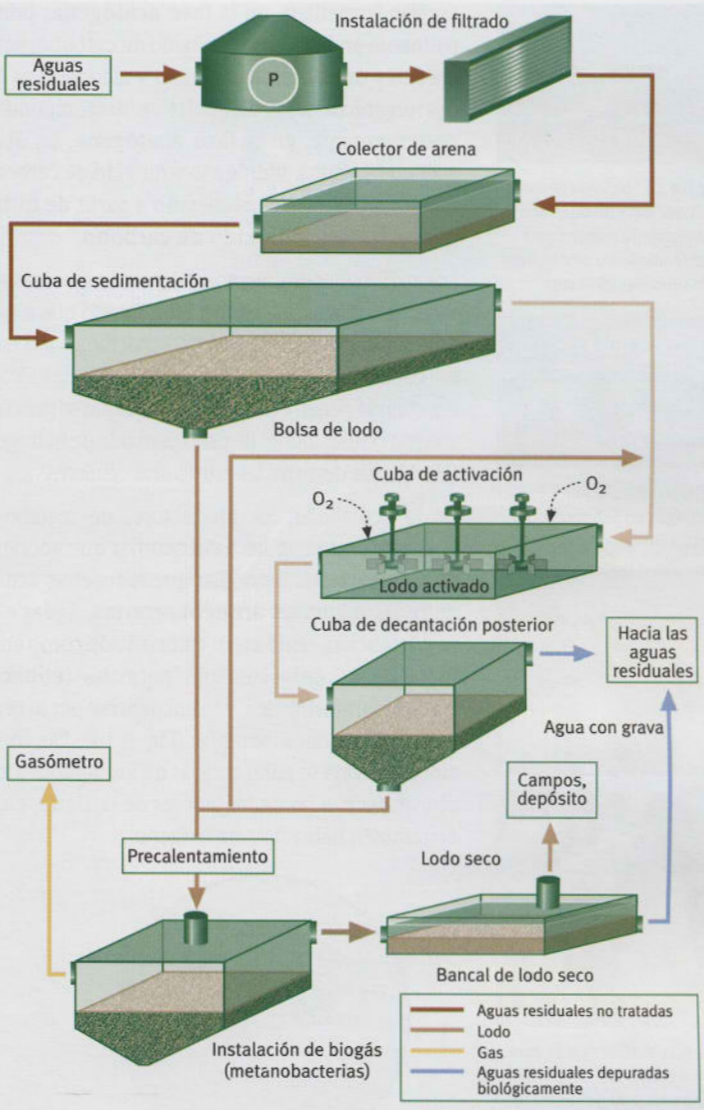


Fig. 6.7 Esquema de una instalación depuradora con etapa de purificación mecánica y biológica (cuba de activación con lodo activado) y aprovechamiento del lodo en una instalación de biogás.

¿Cómo se produce la **metanogénesis**? Diversos grupos de bacterias se encargan de la conversión anaeróbica de grandes biomoléculas, como la celulosa, las proteínas o las grasas, en metano y dióxido de carbono. En primer lugar, los clostridios anaeróbicos y las enterobacterias anaeróbicas facultativas (es decir, que también pueden vivir con oxígeno), y los estreptococos con la ayuda de las enzimas que aportan al medio en la **fase hidrolítica**, producen la degradación enzimática de las sustancias de peso molecular elevado en los componentes básicos azúcar, aminoácidos, glicerina y ácidos grasos (ver Fig. 6.13). Seguidamente, estas sus-



Fig. 6.8 Cuba de activación de la moderna instalación depuradora del aeropuerto Kai-Tak en Hong Kong. En primer lugar, antes de alimentar la cuba de lodo activado, la instalación tiene que separar del agua aceites y líquidos de lavado.



Fig. 6.9 La "biología de torre" de Bayer logra un buen abastecimiento de oxígeno y un gran rendimiento de degradación sin olores molestos.



Fig. 6.10 Instalación de biogás en Schönerlinde, junto a Berlín.





Fig. 6.11 Arriba: el gran presidente Mao Tse Tung inspecciona personalmente, en los años 1950, el quemador de una instalación de biogás; en la pizarra se alaban los beneficios del "gas de los pantanos". Abajo: 30 años después, el biogás es más actual que nunca. El gran reformador Deng Hsiao Ping frente a una instalación de biogás.



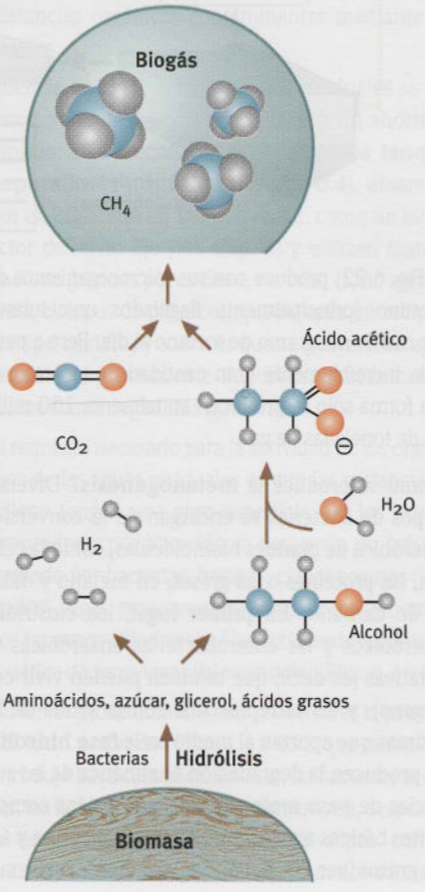
Fig. 6.12 Instalación de biogás del programa del medio ambiente de las Naciones Unidas (UNEP) en fase de construcción.

Fig. 6.13 Derecha: fases de formación del metano.

tancias fermentan, en la **fase acidógena**, principalmente en hidrógeno, dióxido de carbono, ácido acético y otros ácidos orgánicos y alcohol. Los ácidos orgánicos y los alcoholes se descompondrán posteriormente, en la **fase acetógena**, en ácido acético (acetato), hidrógeno y dióxido de carbono. Finalmente se sintetiza metano a partir de **hidrógeno, acetato** y **dióxido de carbono**.

Los productores de metano son los seres vivos más sensibles al oxígeno que conocemos. Puesto que a estas "bacterias primigenias" les faltan citocromos y la enzima **catalasa** que descompone el peróxido de hidrógeno, cuando penetra oxígeno en las células se genera el veneno celular mortal llamado peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que destruye las estructuras celulares.

En la actualidad, los productores de metano se cuentan, junto con las halobacterias que adoran la sal y las bacterias termófilas que reducen el azufre, entre las primitivas **arqueobacterias**. Todas ellas se diferencian, tanto en su composición como en su metabolismo, de las bacterias "normales" (**eubacterias**) de forma drástica, y se encuentran por lo general en ubicaciones extremas (Fig. 6.14). Las condiciones de vida se parecen a las de los tiempos arcaicos, es decir, a las de los albores de la Tierra, cuando también había falta de oxígeno.



6.4 ¡El biogás podría salvar bosques!

Aproximadamente 2000 millones de seres humanos en el mundo aún tienen que obtener su energía mediante la combustión de **biomasas** (madera, residuos agrónomos y abono seco) –una forma muy directa e ineficaz de aprovechar las biomasas para obtener energía. Además, este sistema tiene consecuencias catastróficas para la agricultura y el medio ambiente: en los países del tercer mundo, la madera se ha convertido en un bien tan escaso como los alimentos.

Por el contrario, el biogás se obtiene fácilmente en pequeños reactores en la tierra a partir de excrementos humanos y de animales, y también de residuos vegetales, y proporciona, además de energía para cocinar, abonos naturales en forma de lodo podrido. Éste contiene nitrógeno, fósforo y sales potásicas, y de esta forma ayuda a ahorrar abonos sintéticos. En los biorreactores cerrados herméticamente (Fig. 6.12) se matan también agentes patógenos. En muchos países en vías de desarrollo, el biogás podría salvar los bosques.

Por tanto, el denominado **proyecto Gobar** en la India (en hindú *gobar*, estiércol de vaca) debería constituir un descubrimiento en este sentido. Sin embargo, las estimaciones hablan de 2,5 millones de instalaciones de biogás. El padre de la nación, Mahatma Gandhi, había soñado con pueblos que se autoabastecían.

Al igual que en tiempos anteriores, sigue existiendo el obstáculo de la estructura social semifeudal del pueblo hindú: sólo los agricultores ricos pueden permitirse comprar un reactor de biogás de acero inoxidable y luego explotarlo con la cantidad suficiente de residuos. Los agricultores pobres, que muchas veces no tienen ni una vaca, no podrían explotar reactores ni aunque se les facilitaran gratuitamente.

Los agricultores ricos compraban estiércol de vaca seco para sus reactores a precios bajos, pero actualmente los pobres más pobres siguen sin tener el combustible más económico y más sencillo, el cual antes se encontraba, como quien dice, por la calle. Además, en la India, los excrementos humanos son tabú por motivos religiosos. Consecuencia: como calefacción se utilizan todas las existencias de madera que puedan obtenerse.

En opinión de las Naciones Unidas, China presenta una alternativa. Parece que allí existen 100 000 instalaciones de biogás en funcionamiento (Fig. 6.11). A menudo, los pueblos explotan grandes instalaciones comunitarias que se han construido con tecnología barata a base de biorreactores de cemento. Tanto las masas de desechos como la energía y los abonos se procesan de forma rentable y se distribuyen de forma racional.

6.5 Biogás en los países industrializados: explotación del estiércol líquido

En los países no tropicales, naturalmente es más difícil producir biogás. A pesar de todo, existe una amplia gama de proyectos muy prometedores, incluso en Europa. En Europa y América del Norte, los reactores de biogás pueden ayudar a solucionar los problemas de los desechos en grandes instalaciones de producción pecuaria. El **estiércol líquido** procedente de explotaciones pecuarias industriales se produce en cantidades tan grandes que cargaría demasiado el suelo si se utilizase como abono, o su transporte sería demasiado costoso. Una vaca lechera produce diariamente 75 litros de estiércol líquido. En Suiza, los granjeros construían instalaciones de biogás a partir de antiguos tanques de aceite, que proporcionan un contravalor de 300 litros de fuel-oil anuales por cada vaca. En la explotación de vertidos, a partir del lodo que se genera también se puede obtener un biogás muy económico.

Una nueva instalación de tratamiento de vertidos al norte de Berlín que depuraba diariamente 170 000 m^3 de agua, en la época de la RDA ya producía, en cuatro reactores enormes, 150 000 m^3 de biogás diarios, que en primer lugar abastecían de energía propia a toda la instalación (Fig. 6.10). Actualmente, en Alemania sólo se utiliza una milésima parte de las posibilidades del biogás.

Los nuevos "Länder" de Alemania iban incluso adelantados en lo que a biogás se refiere: cuando en los años 1970 se tenía que luchar con las consecuencias de la crisis del petróleo y empezó a sustituirse el fuel-oil por el carbón vegetal, se descubrió también el biogás: las grandes producciones agropecuarias ofrecían suficiente combustible. De este modo, la RDA podía matar dos pájaros de un tiro: desaparecía el olor incómodo de muchas Cooperativas Productivas Agrícolas (CPA) y al mismo tiempo se cuidaban las divisas de las costosas importaciones de energía. De este modo, en la década de 1980 surgieron numerosas instalaciones de biogás. Tres de estas instalaciones pioneras (Frankenförde/Brandenburgo, Rippershausen/Thüringen, Zobes/Sajonia) aún siguen funcionando en la actualidad. Otras tres "centrales eléctricas de granja", incluida la que en su día fue la mayor del mundo, la de Nordhausen, en el extremo oriental del Harz, que producía diariamente 10 000 m^3 de gas, han dejado de funcionar (al igual que las producciones pecuarias correspondientes).

Incluso se podría pensar en utilizar biogás para el funcionamiento de vehículos agrícolas. En Alemania, antes de la Segunda Guerra Mundial ya se había expe-

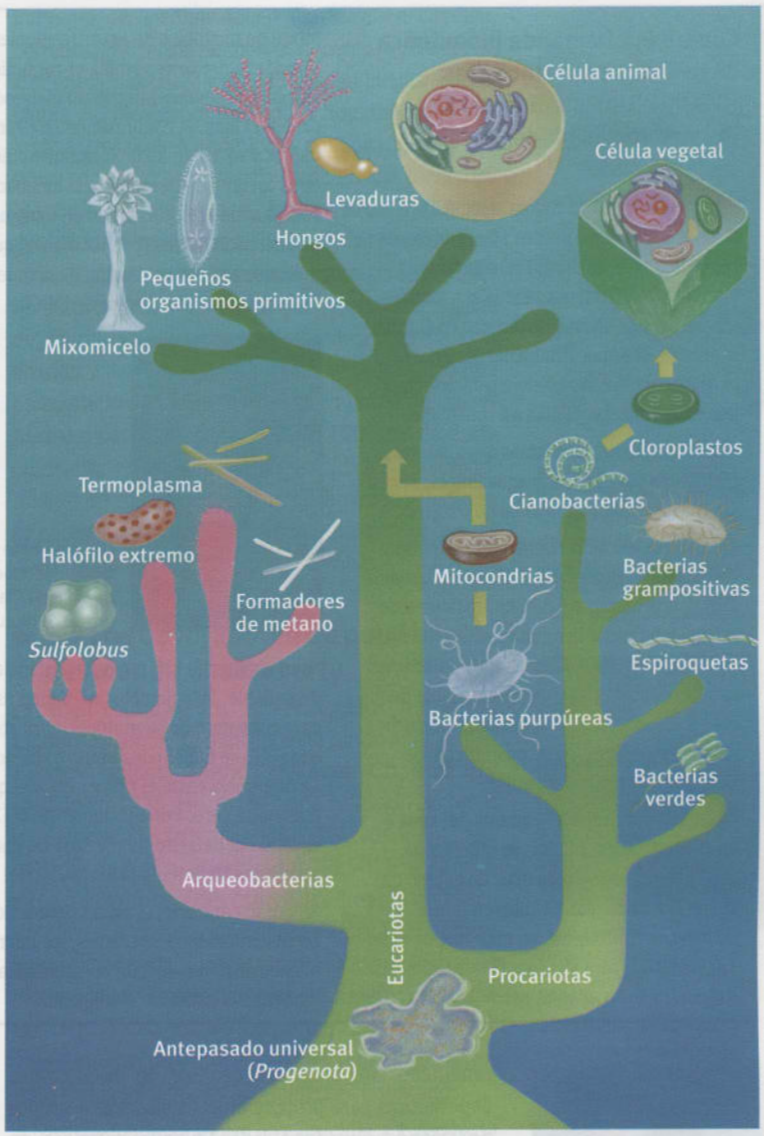


Fig. 6.14 El árbol genealógico convencional de la vida, tal como era antes de descubrir las **arqueobacterias**, contenía dos líneas principales de desarrollo: las procariotas y las líneas eucariotas que derivaban de éstas. En un principio, después se hallaban las bacterias anaeróbicas, las cuales obtenían energía mediante la fermentación. Después de concentrarse oxígeno en la atmósfera, ciertas células anaeróbicas que habían perdido su pared celular (micoplasmas) absorbían bacterias más pequeñas e iniciaban una relación endosimbiótica con ellas. A partir de las bacterias "tragadas", probablemente una bacteria aeróbica (que respira oxígeno) se desarrolló hasta una **mitocondria**, una cianobacteria fotosintética hasta un **cloroplasto** y una espiroqueta posiblemente hasta un flagelo. De este modo surgieron los antepasados de las células eucariotas.
Por lo que se sabe, el **dendograma** (árbol genealógico) de las bacterias reales o eubacterias se divide en cinco ramas principales.
Las bacterias grampositivas, a las cuales pertenecen especies de bacilos, estreptomicetos y clostridios, poseen una pared celular gruesa.
Las bacterias fotosintéticas purpúreas (por ejemplo *Alcaligenes*) y algunos parientes cercanos de éstas que no realizan la fotosíntesis, como *Escherichia coli*, constituyen otro grupo. Las espiroquetas son bacterias largas y en forma de espiral.
Las cianobacterias, activadas a partir de la fotosíntesis y que liberan oxígeno, han desarrollado con toda probabilidad los cloroplastos de las plantas. Algunas bacterias en forma de bola con una pared celular atípica (*Micrococcus*) destacan por su especial sensibilidad a las radiaciones.
Las bacterias verdes fotosintéticas (*Chlorobium*) son organismos anaeróbicos.
En los años 1970 se descubrió que las arqueobacterias procarióticas se diferencian considerablemente en su estructura celular de todos los demás seres vivos, es decir, representan una "tercera forma de vida", forman un grupo especial que tuvo un papel dominante en la biosfera primitiva, pero posteriormente, debido a su sensibilidad al oxígeno, fueron desterradas a pequeños nichos ecológicos.

Cuadro 6.2 Demanda bioquímica de oxígeno a los cinco días (DBO_5) – Una medida para las sustancias biodegradables de los vertidos

El oxígeno es poco soluble en agua. A 15 °C se disuelven aproximadamente 10 mg de oxígeno por cada litro de agua; a 20 °C sólo 9 mg. Cuando se vierten aguas residuales a los lagos, los ríos y el mar, el oxígeno disuelto en el agua disminuye de forma drástica: las bacterias aeróbicas y los hongos lo necesitan para descomponer las sustancias orgánicas allí contenidas.

Por consiguiente, las plantas depuradoras, biofábricas para producir agua limpia, necesitan un suplemento adicional de oxígeno.

Con el proceso de la "demanda bioquímica de oxígeno" (*Biochemical Oxygen Demand*, DBO), inventado en 1896 en Inglaterra, se puede determinar la carga orgánica del agua. La DBO_5 sirve para calcular aproximadamente la proporción fácilmente degradable del contenido total orgánico del agua. A partir del oxígeno requerido se cuantifican los microorganismos heterótrofos.

La cantidad de oxígeno extraída del agua en la degradación a 20 °C se refiere a un determinado número de días, en el caso de la DBO_5 a cinco días. Se diluyen muestras de agua, se "burbujean" en matraces de agitación con aire (para alcanzar la saturación con oxígeno) y se les añaden *seeds* (un cultivo mixto de microbios de aguas residuales). Seguidamente se determina el contenido en oxígeno, normalmente con un electrodo de oxígeno Clark. A continuación se cierran los frascos y se agitan a 20 °C durante cinco días en la oscuridad. Después de la incubación se vuelve a medir el contenido en oxígeno. La diferencia entre el primer día y el quinto (multiplicada por la dilución de la muestra) da como resultado el valor de DBO_5.



Cómo se mide el valor DBO5: electrodo de oxígeno Clark en un frasco de cultivo.

Si en el agua no hay ninguna sustancia biodegradable, los microbios no tienen nada para consumir, no se multiplican ni absorben nada. No se habrá consumido oxígeno. La diferencia entre el primer día y el quinto equivale a cero. Por consiguiente, la DBO_5 es de 0 mg oxígeno/L. ¡El agua no contiene sustancias fácilmente biodegradables!

Si, por el contrario, el agua hubiera sido rica en sustancias biodegradables, los microorganismos añadidos se habrían multiplicado y habrían consumido el oxígeno.

Si, por ejemplo, la diferencia asciende a 9 mg/L (para un consumo total de O_2) y la dilución es de 100 veces, el valor de DBO_5 es de 900 mg/L.

Es decir, se necesitarían 900 mg de oxígeno para degradar por completo un litro de esta agua residual. Dicho de otra forma, ¡se necesitaría el oxígeno de 900 litros de agua limpia para degradar un litro de agua residual!

El contenido de DBO_5 de las aguas residuales producido diariamente por una persona se indica mediante el llamado valor habitante equivalente (HE). Un HE corresponde aproximadamente a 60 g DBO_5/día. La DBO_5 sólo se ve influida, por ejemplo, mediante la nitrificación, respiración de algas o sustancias tóxicas que inhiben a los microorganismos.

El valor DBO_5 es importante para establecer comparaciones entre las aguas residuales; las tasas en concepto de aguas residuales también se rigen por él. Sin embargo, este valor no da ninguna información acerca del contenido en compuestos no degradables.

La desventaja de la determinación de la DBO es que el periodo de prueba dura mucho tiempo. Un tiempo de medida de cinco días no garantiza un aprovechamiento efectivo de la prueba para controlar las instalaciones. Por el contrario, los biosensores microbianos (Cap. 10) miden la DBO de las aguas residuales en sólo cinco minutos, pero sólo indican sustancias de bajo peso molecular que pueden penetrar por una membrana de protección.



Fig. 6.15 El premio Nobel Paul Crutzen (centro), codescubridor del agujero de ozono, después de una conferencia en abril de 2005 en Hong Kong: "Existen 1400 millones de bóvidos en el mundo que excretan metano de forma masiva..."



Fig. 6.16 Superficie cerrada al paso debido a una carga de herbicida en 1990 en la antigua franja del muro en Berlín.

rimentado con biogás procedente de instalaciones depuradoras para proporcionar calefacción a grupos de viviendas situadas al lado. En aquel entonces, en Stuttgart funcionaban 155 vehículos de la empresa municipal de transportes con biogás –popularmente denominados con cariño "Furzelino". Los coches tenían una gran ventaja: el metano se convierte en agua y dióxido de carbono, respetando el medio ambiente.

Los desechos domésticos podrían ser otra fuente más de biogás. En los depósitos de desechos también se forma metano (en parte peligroso), y se puede obtener biogás si se cubre de forma adecuada. Según estimaciones americanas, en depósitos de desechos se puede generar aproximadamente un 1% de la energía que se necesita en Estados Unidos. Este porcentaje no parece muy elevado, pero habría que pensar que este 1% de Estados Unidos corresponde al consumo total de energía de algunos países en vías de desarrollo.

En los países industrializados, el biogás sólo puede cubrir entre un 1 y un 5% de la energía total necesaria, por el mero hecho de que las cantidades de material de partida son limitadas. Sin embargo, para el suministro local de energía, el biogás tiene un gran significado en las zonas rurales de todo el mundo. Actualmente, no sólo el suministro de energía está cobrando más relevancia, sino cada vez más la evacuación de desechos que dañan el medio ambiente; finalmente, la protección de los suelos y bosques constituye un problema ecológico global.

6.6 El alcohol que crece en los campos

El automóvil arranca: en lugar de los gases de escape de olor nauseabundo, despide un ligero olor a alcohol. En Brasil esto es un hecho cotidiano (Cuadro 6.3). Hoy existen en Brasil 4,2 millones de automóviles que sólo funcionan con etanol y aproximadamente 10,2 millones de automóviles que funcionan con una mezcla de gasolina y etanol. La producción estimada de etanol en todo el mundo ascendió en 1998 aproximadamente a 33 300 millones de litros. Entre los grandes productores figuraban Brasil (14 500 millones de litros), Estados Unidos (5700 millones de litros), Asia

(5900 millones de litros) y Europa (4600 millones de litros). El disparo de salida para la enorme producción de alcohol combustible se produjo en Brasil a consecuencia de la crisis del petróleo de los años 1973-1974. La segunda crisis, en 1979, activó aún más la producción. En aquel entonces existían grandes cantidades de la materia prima de partida, la caña de azúcar. Debido a los elevados precios del petróleo en el mercado mundial, a finales de 1975 se lanzó el programa estatal *Proalcool* para generar etanol como combustible. Los motivos políticos y económicos fueron determinantes para el proyecto (detalles en Cuadro 6.3). Sin embargo, el proyecto también es muy polémico: además de la problemática de "combustible en lugar de alimentos", otro problema es **la contaminación del medio ambiente** con aguas residuales y la erosión del suelo.

La producción de alcohol genera por cada litro de etanol 12 a 15 litros de residuos de azúcar y 100 litros de agua para lavar, que por motivos económicos principalmente se vierte a los ríos sin depurar y los convierte en cloacas, aunque se podría obtener abono a partir de los residuos del azúcar. La carga de suciedad orgánica de estos vertidos que se generan para producir un litro de alcohol corresponde a la carga de vertidos de cuatro ciudadanos. Una sola fábrica de alcohol, con una producción diaria de 150 000 litros, se puede comparar con una gran ciudad de 600 000 habitantes en términos de cantidad de vertidos.

¡Es decir, los procesos biotecnológicos no proporcionan "automáticamente" productos que respetan el medio ambiente!

Durante la época del alcohol hubo que suspender temporalmente el suministro de agua potable de ciudades enteras. Ahora, el gobierno brasileño ha puesto el freno de emergencia: las aguas para lavar de la industria del alcohol deben utilizarse en circuitos cerrados, los restos de azúcar deben convertirse en alimentos y abonos, y el lodo fino en biogás. El problema del bioalcohol demuestra hoy día cuáles son los aspectos socioeconómicos y políticos que hay que tener en cuenta en el desarrollo de nuevas tecnologías, como la biotecnología. **Lester Brown**, director del Instituto Worldwatch, dice que las plantas energéticas aumentarían la presión sobre las superficies de cultivo fértiles limitadas, que en muchos lugares del mundo ya es excesiva y ha provocado una mayor erosión y deterioro del suelo. Brown estableció una comparación: para la alimentación anual de un ser humano basta con la cosecha de 1000 m^2 de tierra cultivada, y para cubrir las necesidades correspondientes de combustible de un coche estadounidense se necesitarían 30 000 m^2. ¡Por tanto, parece que un coche quita el alimento de 30 personas!

6.7 Los devoradores de petróleo de Ananda Chakrabarty

¿Pueden contribuir los "supermicrobios" a salvar el medio ambiente? El biotecnólogo hindú afincado en Estados Unidos **Ananda Mohan Chakrabarty** (nacido en 1938, Fig. 6.18) había cultivado bacterias en *General Electric* que podían descomponer el aniquilador de plantas (**herbicida**) 2,4,5-T. Este herbicida se utilizó en grandes cantidades durante la Guerra del Vietnam como componente esencial del **agente naranja** (además, contenía impurezas mutágenas de dioxina) para "desforestar" grandes superficies selváticas (Fig. 6.17), y tuvo consecuencias catastróficas –malformaciones y cáncer– en los vietnamitas y en los hijos de los soldados estadounidenses implicados.

A partir de los devoradores de herbicidas, Chakrabarty crió devoradores de grasas en toda regla (Fig. 6.19):



Fig. 6.17 Jungla vietnamita intacta (arriba) y después de una "acción de desforestación" con el agente herbicida naranja (2,4,5-T) (abajo). Ananda Chakrabarty cultivó bacterias que degradaban el agente naranja.



Fig. 6.18 Ananda Chakrabarty obtuvo en 1981 su patente en Washington. Actualmente, Chakrabarty, titulado por la Universidad de Calcuta, es *Distinguished Professor* de la Universidad de Illinois, en Chicago.

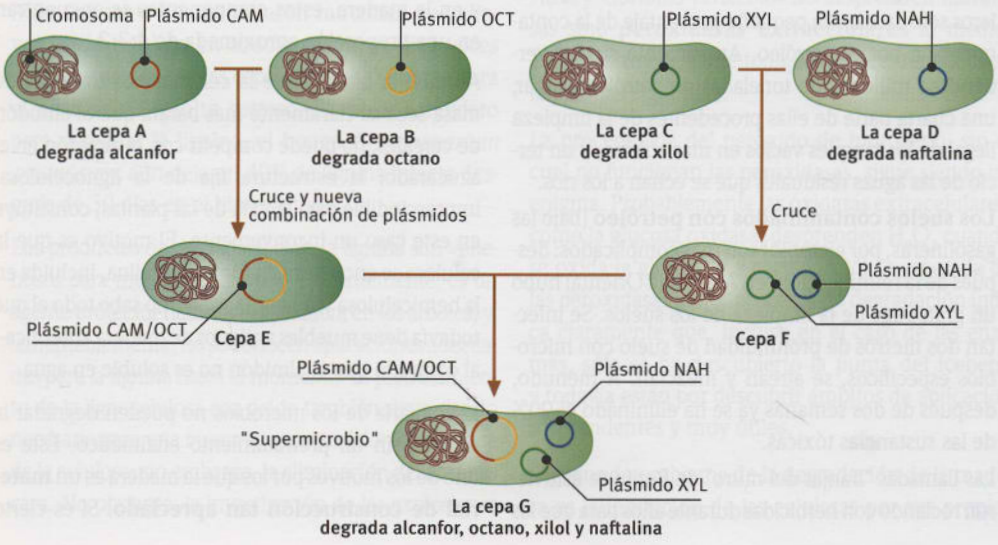


Fig. 6.19 Fabricación de un "supermicrobio" (*superbug*) que puede degradar las sustancias hidrocarbonadas pesadas del petróleo. En primer lugar, se integró un plásmido que degrada el alcanfor (CAM) en una bacteria que ya contenía un plásmido que degrada el octano (OCT). Ambos plásmidos se fusionaron. De este modo, un plásmido codificó enzimas para ambas rutas de degradación. Por el contrario, para los plásmidos del xilol (XYL) y la naftalina (NAH) ocurrió de otro modo. En este caso, ambos plásmidos coexistían en una célula. Finalmente, Chakrabarty juntó todos estos plásmidos en una cepa. Ésta creció bien en crudo y utilizó alcanfor, xilol, octano y naftalina como fuente de hidrocarburos.



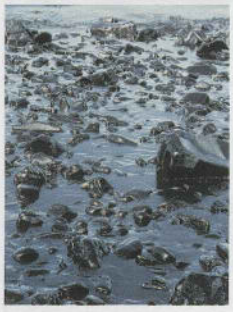






Fig. 6.20 La catástrofe del Exxon Valdez de 1998. Días 1-5: el petrolero Exxon Valdez en el arrecife Bligh, 26 de marzo de 1989; playas muy contaminadas de crudo (isla Smith, abril de 1989); intentos de limpieza de las playas; contaminación incluso a una distancia de 350 millas en la península de Alaska (agosto de 1998).

Balance de la catástrofe del petrolero Exxon Valdez

38 000 toneladas de crudo (¡el contenido de 125 piscinas olímpicas!) se vertieron al mar; se contaminaron 1300 millas de costa.
Cálculo de víctimas:
250 000 aves marinas,
2800 nutrias marinas,
300 focas,
250 águilas de cabeza blanca,
22 ballenas asesinas
y una cantidad incalculable de peces.

extrajo de cuatro cepas de *Pseudomonas* que degradan respectivamente el **octano,** el **alcanfor,** el **xilol** y la **naftalina**, los plásmidos, y por vías separadas creó el "superplásmido" y lo volvió a introducir en las bacterias. De este modo creó un *Superbug* (supermicrobio) que puede descomponer los cuatro productos. Las bacterias transformadas de este modo atacaron con un "hambre canina" los restos de petróleo tóxicos. Aparentemente, cuando se producen catástrofes con petroleros (Fig. 6.20) y hay enormes superficies del mar en peligro por la marea negra, éstas degradan rápidamente el petróleo. Los microorganismos, que crecerían masivamente, serían devorados a su vez por otros seres marinos, y de este modo volverían a desaparecer. Sin embargo, los devoradores de petróleo de Chakrabarty nunca se utilizaron en el medio ambiente, porque en aquel momento no se permitirá liberar bacterias manipuladas genéticamente.

En la avería del petrolero **Exxon Valdez,** en 1989, frente a las costas de Alaska, se aspiró y se filtró la masa principal del petróleo espeso (Fig. 6.20). Sin embargo, la capa situada sobre las rocas y en la arena se degradó con bacterias cultivadas "normales". Añadiendo "abonos" (fosfato y nitrato), el crecimiento de los microbios mejoró considerablemente. Hasta el momento no se permite nada más.

¿Cómo seguirá la "mejora del medio ambiente"? El biólogo y escritor berlinés Bernhard Kegel, en su novela *Sexy Sons*, no sólo describe al fracasado clon del jefe de una empresa multinacional de temas medioambientales, sino también lo que ocurre cuando microbios de nueva creación por manipulación genética acaban, primero, como era de esperar, con la contaminación por el petróleo, pero después se llevan malintencionadamente a pozos de petróleo activos. Una catástrofe, pero de momento sólo existente en la ciencia-ficción.

Sin embargo, las espectaculares catástrofes de petroleros sólo causan un pequeño porcentaje de la contaminación por el petróleo. Anualmente siguen vertiéndose millones de toneladas de petróleo al mar, una cuarta parte de ellas procedentes de la limpieza ilegal de los tanques vacíos en mar abierto, y un tercio de las aguas residuales que se echan a los ríos.

Los suelos contaminados con petróleo (bajo las gasolineras, por ejemplo) son más complicados: después de la reunificación, en Alemania Oriental hubo un gran auge de la limpieza de los suelos. Se infectan dos metros de profundidad de suelo con microbios específicos, se airean y mezclan. A menudo, después de dos semanas ya se ha eliminado el 90% de las sustancias tóxicas.

Las llamadas "franjas del muro" de Berlín se estuvieron rociando con herbicidas durante años para que los vigilantes de la frontera tuvieran buena visibilidad. Sobre todo se aplicaban hidrocarburos clorados, como el 2,4-D (Fig. 6.16). Después de 16 años, las sustancias tóxicas se han eliminado mediante microorganismos del suelo que han surgido de forma natural.

En 1980, el Tribunal Supremo estadounidense dio la razón a Chakrabarty en el juicio *Diamond contra Chakrabarty 447 U.S. 303 (1980)*. En 1971 había inscrito una patente para un ser vivo y desde entonces había estado pleiteando. Su cepa bacteriana devoradora del petróleo fue el primer ser vivo "creado" de la historia para el que se concedió una patente en Estados Unidos (Fig. 6.19). De este modo se creó un precedente para la industria biotecnológica.

6.8 Azúcar y alcohol a partir de la madera

El **almidón** es la materia prima ideal para producir azúcar y etanol, así como para producir otros productos químicos industriales, pero para tales usos entra en conflicto con la demanda de más alimentos. La antigua *Office of Technological Assessment* (OTA) del gobierno estadounidense ha calculado que sólo de un 1 a un 2% del consumo de combustible podría cubrirse con el alcohol procedente del almidón de maíz sin necesidad de aumentar los precios de los alimentos en Estados Unidos.

¡Por el contrario, la **lignocelulosa** se presenta como la materia prima regenerable más importante y tampoco se puede utilizar como alimento!

La lignocelulosa está constituida por tres componentes: la **celulosa** (un polímero lineal que consta de componentes de glucosa), la **hemicelulosa** (asimismo un polisacárido, pero que consta de cadenas largas de la pentosa xilosa) y la **lignina**, una molécula compleja aromática. En la paja del trigo y en la madera, estos componentes se encuentran en una proporción aproximada de 4:3:2.

Aunque la biomasa de la celulosa por tonelada de masa seca es claramente más barata que el almidón de cereales, no puede competir con el almidón en el azucarado: la estructura fija de la lignocelulosa, imprescindible para la vida de las plantas, constituye en este caso un inconveniente. El motivo es que la celulosa se encuentra en forma cristalina, incluida en la hemicelulosa y la lignina, y –como sabe todo el que todavía tiene muebles antiguos de madera auténtica– al contrario que el almidón no es soluble en agua.

La mayoría de los microbios no pueden degradar la madera sin un pretratamiento enzimático. Éste es uno de los motivos por los que la madera es un **material de construcción tan apreciado**. Sí es cierto

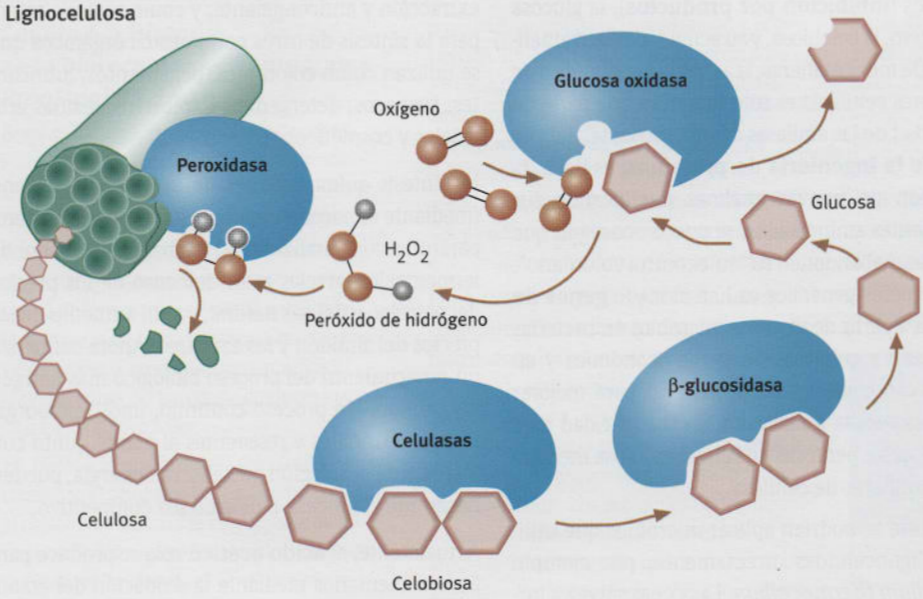


Fig. 6.21 Degradación enzimática hipotética de la lignocelulosa.

que la madera se debe proteger contra la carcoma, las termitas y los productores de la putrefacción blanca y la azul (enfermedad de los hongos), pues todos ellos producen **celulasas** que degradan la celulosa en azúcar y, por tanto, dañan la madera. En el caso de las termitas, que producen metano, los protozoos de sus intestinos poseen celulasas (Fig. 6.22).

El hongo *Trichoderma viride*, que fue renombrado por el especialista en celulasa americano E.T. Reese como *Trichoderma reesei*, es actualmente el favorito a la hora de desprender celulasa de forma extracelular. Se descubrió en Nueva Guinea en una cartuchera de algodón podrida durante la Segunda Guerra Mundial (Fig. 6.23). En aquel entonces, los microbiólogos se creían las noticias alarmantes que llegaban de las zonas de combate tropicales y decían que el equipamiento del ejército estadounidense se descomponía con una rapidez alarmante.

Mientras tanto se encontraron mutantes que convertían la celulosa en azúcar de forma diez veces más productiva que las cepas salvajes. Y hasta ahora el proceso no resulta costoso. El mejor candidato para degradar la lignina, el hongo *Chrysosporium pruinosum*, aún deja un 40% de lignina intacta después de 30 días en el biorreactor.

Los productos de degradación de la lignina son venenosos para muchos microbios (evidentemente, es un agente protector natural de la madera en los árboles) y, lamentablemente, no se conocen aplicaciones adecuadas para la lignina hasta el momento. El pretratamiento de la lignocelulosa con ácido también sigue siendo necesario para una buena descomposición enzimática de la celulosa; sin embargo, la eliminación del ácido es cara. No obstante, la investigación de las explosiones con vapor y los procesos de explosión congelando con amoniaco líquido pueden reducir los costes.

Pero existe una esperanza: hace unos pocos años, la larga búsqueda de **microbios que degradan lignina** dio un giro imprevisto. Los expertos esperaban que las sustancias de elevado peso molecular fueran siempre las primeras separadas por las enzimas hidrolíticas (hidrolasas), formadas por los microorganismos y liberadas al medio. Ejemplos conocidos son las amilasas y las celulasas. Para la degradación de la lignina se descubrieron los hongos causantes de la llamada **putrefacción blanca** de la madera. Descomponen entre un 60 y un 70% de la lignina y generan fragmentos, dióxido de carbono y agua, y liberan celulosa blanca (de ahí la denominación de putrefacción blanca).

El mecanismo de descomposición de la lignina es sensacional: ¡los hongos *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolus versicolor* no desprenden hidrolasas sino **peroxidasas extracelulares** al medio! Éstas destruyen, sobre todo, los enlaces fenólicos de la lignina (Fig. 6.21).

La procedencia del peróxido de hidrógeno, sin el cual no funcionan las peroxidasas, sigue siendo un enigma. Probablemente las oxidasas extracelulares, como la glucosa oxidasa, desprenden H_2O_2 cuando se oxida la glucosa. La participación inesperada de las peroxidasas en los procesos de degradación indica claramente que, incluso en el caso de las enzimas, sólo se ha descubierto la punta del iceberg, y todavía están por descubrir ámbitos de aplicación sorprendentes y muy útiles.

El segundo problema de la degradación de la madera es la inhibición de las celulasas por sus propios

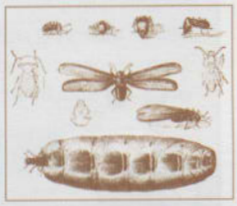




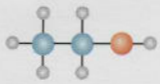


Fig. 6.22 Arriba: las termitas (hormigas blancas) producen biogás con la ayuda de celulasas de sus flagelados del intestino.
Centro: flagelados que devoran bacterias en el intestino de la termita. Abajo: cajón no utilizado en el armario del autor en Hong Kong, con una considerable plaga de termitas. Producen metano a partir de la madera del armario.

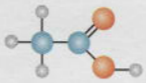


Fig. 6.23 En la Guerra del Pacífico contra Japón, los objetos de algodón y las cartucheras de los GI se deshacían con una facilidad pasmosa: los hongos productores de celulasa, como *Trichoderma*, fueron la causa.

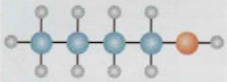
Fig. 6.24 Materias primas químicas a partir de la biomasa (fórmulas estructurales)



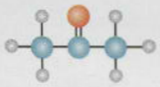
Etanol



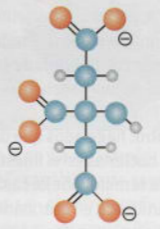
Ácido acético (acetato)



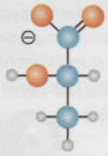
n-butanol



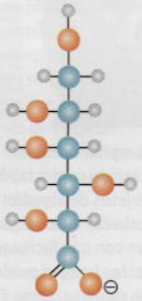
Acetona



Ácido cítrico



Ácido láctico (lactato)



Ácido D-glucónico

productos (**inhibición por productos**), la glucosa y su dímero, la celobiosa, y su actividad relativamente baja. De todas maneras, la actividad enzimática de las mejores celulasas es sólo una milésima parte de la actividad de las amilasas de uso corriente. Tal vez mediante **la ingeniería de proteínas**, es decir, la fabricación de nuevas enzimas modificando sus componentes aminoácidos, se pueda conseguir que las celulasas abandonen su "autocontrol voluntario". Los ingenieros genéticos ya han clonado **genes de celulasa** a partir de diversos microbios en bacterias para producir celulasas de forma económica y en grandes cantidades. Otra posibilidad para mejorar los procesos es la transmisión de la capacidad para aprovechar las pentosas de la hemicelulosa mediante consumidores de celulosa.

Finalmente se podrían aplicar microbios que utilizan la lignocelulosa directamente, por ejemplo *Clostridium thermocellum*. Las cepas salvajes forman una gran gama de productos a partir de la lignocelulosa, especialmente etanol y ácidos orgánicos. Mediante manipulación genética parece que se forma uno de estos productos en concentraciones elevadas y, por tanto, de forma económica.

Una empresa norteamericana utiliza el hongo de la putrefacción blanca *Ophiostoma piliferum* para el pretratamiento de las virutas de madera (putrefacción o *biopulping*). Después de unas semanas, con cien toneladas se obtuvo una cosecha mayor de celulosa. Las virutas a las que se ha inyectado *Ophiostoma* degradan la lignina y, al mismo tiempo, eliminan a los competidores de la putrefacción azul.

6.9 ¿Materias primas químicas de biomasa?

Sólo unos cien productos químicos industriales representan en la actualidad el 99% de todos los productos químicos. Unas tres cuartas partes de éstos se fabrican a partir de cinco materias básicas: etileno, propileno, benceno (benzol), tolueno (toluol) y xileno (xilol). Todas estas sustancias se producen actualmente a partir del petróleo y el gas natural. Los precios fluctuantes del petróleo influyen considerablemente en el sector químico. Además, se deben añadir los elevados costes de energía necesarios para extraer el petróleo y para evitar problemas medioambientales. Los expertos calculan que, en principio, la mitad de los cien "productos químicos más importantes" puede fabricarse a partir de materias primas renovables. ¿Cuál es la situación en la actualidad? El etanol, el ácido cítrico y el ácido acético pueden fabricarse por biotecnología a un precio económico (Fig. 6.24).

El **etanol** es un producto químico industrial importante (Cap. 1). Sirve como medio de disolución, extracción y anticongelante, y como materia prima para la síntesis de otros compuestos orgánicos que se utilizan como colorantes, pegamentos, lubricantes, fármacos, detergentes, explosivos, resinas artificiales y cosméticos.

La síntesis química del etanol a partir del etileno (mediante almacenamiento de agua a elevadas temperaturas con catalizadores) desbancó al alcohol de fermentación gracias a un descenso de los precios del petróleo y del gas natural, y a un aumento de los precios del almidón y los azúcares. Ahora comienza un renacimiento del proceso biológico más antiguo del mundo. Un proceso continuo, unos microorganismos termófilos y resistentes al etanol, junto con técnicas de destilación que ahorran energía, pueden hacer que el proceso biológico sea competitivo.

Actualmente, el **ácido acético** sólo se produce para fines alimentarios mediante la oxidación del etanol con *Acetobacter* (Cap. 1). Para el ácido acético industrial de elevada concentración la carbonilación química del metanol aún es más económica. En todo el mundo se fabrican aproximadamente 200 000 toneladas de ácido acético por fermentación del etanol.

En Estados Unidos se está probando una aplicación del ácido acético que protege el medio ambiente. El acetato, la sal del ácido acético, se produce mezclando carbonato cálcico con ácido acético. El ácido acético se obtiene previamente a partir de la biomasa. El punto de fusión del **acetato de calcio y magnesio** (CMA) es de –8 °C y se utiliza en invierno como sal de deshielo protectora del medio ambiente. Esto alegra a los automovilistas americanos, ya que, además, protege la chapa contra la corrosión. Por el contrario, la "sal de deshielo alemana" (el cloruro sódico puro, NaCl) mata los árboles porque elimina importantes nutrientes de las plantas. El Club Automovilístico de Alemania informó que en el invierno 2000-2001 se utilizaron 2,8 toneladas de sal de deshielo por cada kilómetro de la hermosa (en aquellos momentos aún lo era) carretera de Brandenburgo, es decir, ¡2,8 kilos de sal por metro!

Un disolvente orgánico importante es el **n-butanol** o 1-butanol (n significa normal y quiere decir que se trata de un compuesto sin ramificar de cadena lineal). El n-butanol se aplica en la fabricación de ablandadores, líquidos de freno, aditivos de combustible, resinas sintéticas, agentes de extracción y para producir pinturas. En todo el mundo se producen 1,2 millones de toneladas de forma industrial a partir del petróleo. La producción de butanol surgió a partir de las necesidades de Inglaterra durante la Primera Guerra Mundial y contribuyó directamente a la formación del estado de Israel (Cuadro 6.4).

Cuadro 6.3 Historia de la biotecnología: El programa *Proalcool* de Brasil

Brasil se vio especialmente afectado por el aumento de los precios del petróleo de los años 1970, puesto que el gobierno, a imitación del modelo estadounidense, en el tema de servicios de transporte había invertido mayoritariamente en el tráfico por carretera. La red de ferrocarriles se quedó paralizada, el transporte en barco también. Grandes proyectos como la autopista Transamazónica abrieron zonas del país hasta entonces inaccesibles a los automóviles.

En 1975, a iniciativa del gobierno militar dio comienzo el programa nacional *Proalcool* con el objetivo de sustituir la mayor parte de las importaciones de petróleo por alcohol. El etanol para los "coches de alcohol" se obtiene de la caña de azúcar, que contiene un 12% de azúcar, o de la cassava (mandioca), una planta que proporciona almidón, por fermentación del azúcar. Las dimensiones del proyecto biotecnológico aparentemente más importante del mundo eran poco habituales: desde 1975 a 1980, las superficies de cultivo de caña de azúcar crecieron en un 70%. En 1981 se produjeron 4,6 millones de litros de alcohol y en 1985 nueve millones de litros. Los mayores problemas se podían solucionar técnicamente. La adición de un 22% de alcohol a la gasolina no requiere ningún tipo de modificación técnica en los motores. Sin embargo, en los vehículos que sólo funcionan con alcohol, según afirmaciones de los expertos, hay que tener en cuenta el mayor índice de compresión; se deben instalar las llamadas bujías de encendido frías y se necesita un racor de aspiración calentado, una protección especial anticorrosión para el depósito y el carburador, así como un sistema de arranque en frío.



Coche de etanol en medio de la materia prima regenerable de la caña de azúcar.

Se fomentó el cultivo de la caña de azúcar y otras plantas energéticas mediante créditos extremadamente ventajosos; la nueva construcción y la expansión de las destilerías recibió apoyo estatal, se garantizó el precio del producto, se amplió la investigación y el desarrollo. En 1982, los costes del programa *Proalcool* ya se elevaban a 8000 millones de dólares; con seguridad contribuyeron a la enorme deuda exterior de Brasil y a la inflación del 200%. En contra de eso, el gobierno se escudaba en los siete mil millones de dólares que se habían ahorrado hasta el momento en importaciones de crudo.

Entre 1975 y 1980 se redujo la superficie de cultivo de arroz en Brasil en un 28%. Aproximadamente 200 plantaciones gigantescas de caña de azúcar habían expulsado de las mejores tierras a los pequeños campesinos y arrendatarios que producían maíz, arroz y judías negras para los sectores más pobres de la población. Los dos millones de puestos de trabajo recién creados constituyen un argumento muy gastado para el proyecto del alcohol: a los trabajadores sólo se les necesita durante la temporada y reciben sueldos miserables –únicamente de este modo se puede producir etanol de forma rentable.

En asociación con multinacionales madereras se talaron y se siguen talando bosques tropicales de forma radical. Como ahora ya sabe todo el mundo, es un error fatal suponer que los bosques tropicales se van a recuperar debido a que crecen de forma exuberante. Al contrario: junto con los arrecifes de coral constituyen los sistemas ecológicos más sensibles.

Para el proyecto fue ventajoso producir caña de azúcar *in situ*; así se evitaron los elevados gastos de transporte y almacenamiento. Además, el Estado aseguró en 1979 a la industria automovilística que en todas las grandes ciudades se podría comprar etanol como combustible en todo momento. Por ese motivo, las empresas de automóviles estaban dispuestas a fabricar vehículos con motores especiales que funcionaran exclusivamente con etanol hidratado. Al contrario que el etanol hidratado, el etanol anhidro se mezcla con la gasolina.

El gobierno brasileño y el Banco Mundial fomentaron la producción de etanol y la venta de automóviles que funcionasen exclusivamente con etanol. Para ello, respaldaron indirectamente la producción de etanol hidratado. A pesar de los programas atractivos y las ayudas financieras estatales, el proyecto *Proalcool* no se logró imponer: dado que los precios del crudo descendieron en los años 1980, la producción de alcohol como combustible se vio sometida a presión. En 1981 y 1989, el mercado de etanol brasileño se colapsó. Los precios fijados por el Estado para el azúcar y el etanol se acoplaron para garantizar el suministro de alcohol como combustible. En 1990 se liberalizó en parte el mercado del azúcar. La fabricación de azúcar cobró significativamente un mayor atractivo. Además, el Estado se vio obligado a recortar los pagos de subvenciones por un importe aproximado de 1500 millones de dólares americanos. A finales de 1997, estos problemas desembocaron en el programa *Proalcool II*. Sin embargo, la cantidad de vehículos nuevos adquiridos que funcionaban con etanol se redujo de forma drástica.

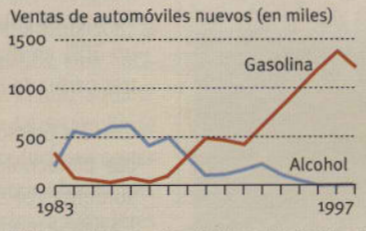


Motor de 1,6 L del VW Golf brasileño, apto para el uso con gasolina o con mezcla de gasolina y alcohol.

En 2002 Brasil reactivó de nuevo su programa *Proalcool*. Debido al aumento de los ingresos en Brasil, los expertos cuentan con que se incremente la venta de automóviles en general. Con ello debería quedar asegurado el uso de la mezcla de gasolina y etanol, y por tanto también la fabricación de etanol anhidro.



Caña de azúcar.



El fracaso del proyecto, visible por la disminución de las cifras de ventas de coches de alcohol frente a los coches de gasolina.

Cuadro 6.4 Historia de la biotecnología: Una bacteria fundadora de un Estado

Chaim Weizmann (1874-1952) se vio obligado en su juventud a abandonar su patria rusa occidental impregnada de sentimiento antisemita. Después de estudiar en Suiza y Alemania, en 1904 empezó a trabajar en Londres con el famoso profesor de química William Perkin.

A principios de 1915, el entonces ministro de la Guerra **David Lloyd George** reparó en él. Había una gran falta de cordita altamente explosiva, una mezcla de nitroglicerina y nitrocelulosa. La acetona que se necesitaba para ésta, destilada a partir de la madera, era especialmente escasa.



Chaim Weizmann y Albert Einstein.

Lloyd George se encontró con Weizmann y ambos quedaron fascinados mutuamente. ¿Cómo se puede obtener acetona por fermentación? Weizmann se acordó de las investigaciones de Pasteur para convertir el azúcar en alcohol por fermentación. Buscó en la tierra, en el maíz y otros cereales, para encontrar las correspondientes bacterias o levaduras.



La bacteria "fundadora de un Estado", *Clostridium acetobutylicum*.

Al cabo de pocas semanas de su encuentro, Weizmann aisló el *Clostridium acetobutylicum*, el cual no sólo produjo milagrosamente acetona sino también otra sustancia muy valiosa: ¡el butanol!

El butanol se utiliza para fabricar el caucho sintético y también para neumáticos de automóvil, de importancia estratégica.

Lloyd George estaba absolutamente fascinado y ofreció proponer al Primer Ministro que le concediese a Weizmann una distinción elevada, pero éste la rechazó categóricamente y, en lugar de ello, habló de la necesidad de dar una patria a los judíos del mundo. Cuando el propio Lloyd George llegó posteriormente a Primer Ministro, discutió este deseo de Weizmann con su ministro de Asuntos Exteriores, el conde de **Balfour**. Esto desembocó directamente en la declaración histórica de Balfour del 2 de noviembre de 1917 y, finalmente, en 1948 en la creación del Estado de Israel, cuyo primer presidente fue Weizmann. Weizmann no sólo descubrió un método genial para fabricar dos productos químicos, sino que también presagió el crecimiento de la industria de la fermentación y, con ello, de la biotecnología moderna, mucho antes del descubrimiento de la penicilina.



Caricatura de Lloyd George, ministro de la guerra inglés.



Chaim Weizmann, hasta la fecha el único biotecnólogo que ha aparecido en un billete de banco.

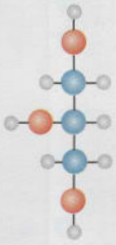


Fig. 6.25 Glicerol.

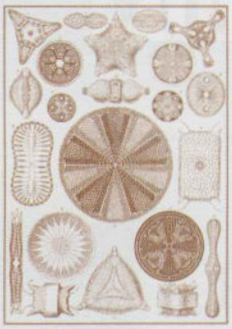


Fig. 6.26 Las algas diatomeas se utilizan como tierra silícea para fabricar dinamita. Ilustración de Ernst Haeckel de *Kunstformen der Natur*.

Como subproducto, *Clostridium acetobutylicum* formaba el disolvente **acetona**, del cual hubo una gran demanda durante la Primera Guerra Mundial: en Gran Bretaña se utilizaba para fabricar el explosivo cordita. Por el contrario, posteriormente, después de la guerra, se necesitaba acetato de butilo para esmaltes de nitrocelulosa, y el interés se volvió a desplazar al n-butanol. En los años 1940 y 1950, cuando cayeron los precios de los productos petroquímicos por debajo de los del almidón y la melaza, la producción microbiana de n-butanol se redujo de forma drástica. Sólo en la República Sudafricana, donde el petróleo era escaso debido al embargo internacional, se siguió realizando el proceso en biorreactores de 90 metros cúbicos. Se obtuvieron rendimientos de un 30% en disolventes con seis partes de butanol, tres partes de acetona y una parte de etanol.

Con los precios del crudo en aumento y los avances biotecnológicos, en los años 1980 volvió a aumentar el interés por los procesos biológicos. Hasta ese momento, la toxicidad del n-butanol para las bacterias constituía un problema para el aumento de la efectividad. Con la ayuda de microorganismos inmovilizados y de un procesamiento continuo se logró aumentar 200 veces la producción de butanol.

El **glicerol (glicerina)**, un disolvente y lubricante de múltiples aplicaciones (Fig. 6.25), ya se fabricó en Alemania durante la Primera Guerra Mundial mediante levaduras para producir dinamita, al igual que en Inglaterra se producía acetona con bacterias para la cordita. Para fabricar dinamita se hace gotear glicerina enfriada continuamente sobre nitronio (ácido sulfúrico y ácido nítrico); en pequeñas cantidades se quema sin peligro, mientras que en grandes cantidades explota súbitamente si se calienta de repente o con un golpe. El posterior fundador del premio Nobel, Alfred Nobel, estabilizó la **nitroglicerina** mediante la absorción con tierra de diatomeas. En este caso se trata de sedimentos naturales de la estructura de ácido silícico de las algas diatomeas (Fig. 6.26), con grandes poros y una elevada capacidad de absorción.

A los cultivos de levadura que producen etanol se les añade sulfito de sodio, el cual forma un producto intermedio importante en la síntesis del etanol. De este modo, finalmente se produce glicerol además de etanol. De todas maneras, con este método se producían mil toneladas al mes. Sin embargo,

después de la guerra se suprimió este proceso por la saponificación química de grasas o la fabricación a partir de propileno y propano.

El **ácido cítrico** (Fig. 6.24) se produce a partir del hongo *Aspergillus*. El ácido cítrico se utiliza como saporizante completamente inocuo, como conservante y en detergentes, a escala mundial, con aproximadamente 700 000 toneladas y con un valor de mercado de 700 millones de dólares americanos.

El **ácido láctico (lactato)** lo descubrió en 1780 el químico sueco **Scheele** en la leche agria, y **C. Wehmer** lo sintetizó en 1895 de forma muy eficaz a partir de la glucosa con *Lactobacillus delbrueckii* en la entonces pequeña empresa A. Boehringer –posteriormente una multinacional bioquímica. El ácido láctico sirve como agente de acidificación en la industria alimentaria y como conservante para alimentos enlatados, como agente de decapado textil y para la producción de plástico. En total, en 1995 se fabricaban en el mundo aproximadamente 50 000 toneladas anuales. En Europa, casi la mitad del ácido láctico se produce de forma microbiana, mientras que en Estados Unidos se utilizan exclusivamente procesos químicos. El aislamiento del ácido láctico del medio de cultivo sigue siendo caro.

En la actualidad se está volviendo a utilizar uno de los primeros bioprocesos técnicos en términos históricos: la fabricación de **ácido glucónico** (Fig. 6.24) a partir de glucosa mediante *Aspergillus niger*. En este proceso, la glucosa oxidasa del hongo desempeña un papel decisivo, utilizándose también en los biosensores (Cap. 10) para medir la glucosa: al consumir oxígeno, oxida la glucosa a gluconolactona y peróxido de hidrógeno, el cual luego se descompone rápidamente como citotoxina mediante la catalasa. La gluconolactona se hidroliza de forma espontánea en ácido glucónico. El ácido glucónico tiene múltiples aplicaciones, sobre todo como aditivo en detergentes, ya que une iones metálicos y evita que se formen manchas en los cristales a causa de las sales cálcicas, y disuelve ligeramente los sedimentos existentes. De este modo, los recipientes metálicos no se oxidan. En 1997 se producían aproximadamente 60 000 toneladas anuales de ácido glucónico en todo el mundo.

También pueden fabricarse biotecnológicamente otros ácidos orgánicos, por ejemplo el ácido fumárico (sal **fumarato**) y el ácido málico (ácido hidroxisuccínico, sal **malato**). El ácido fumárico puede sintetizarse mediante el hongo *Rhizopus nigricans* a partir del azúcar, o de la levadura *Candida* a partir de los alcanos (parafinas), abaratándose cada vez más el proceso químico-sintético. Por el contrario, para el ácido málico la compañía japonesa Tanabe Seiyaku desarrolló en 1974 un proceso biotecnológico de elevada eficacia con microorganismos muertos inmovilizados (ver Cap. 2). En este caso se utiliza únicamente una enzima (la fumarasa) en células muertas de *E.coli* para la producción de ácido málico a partir del ácido fumárico.

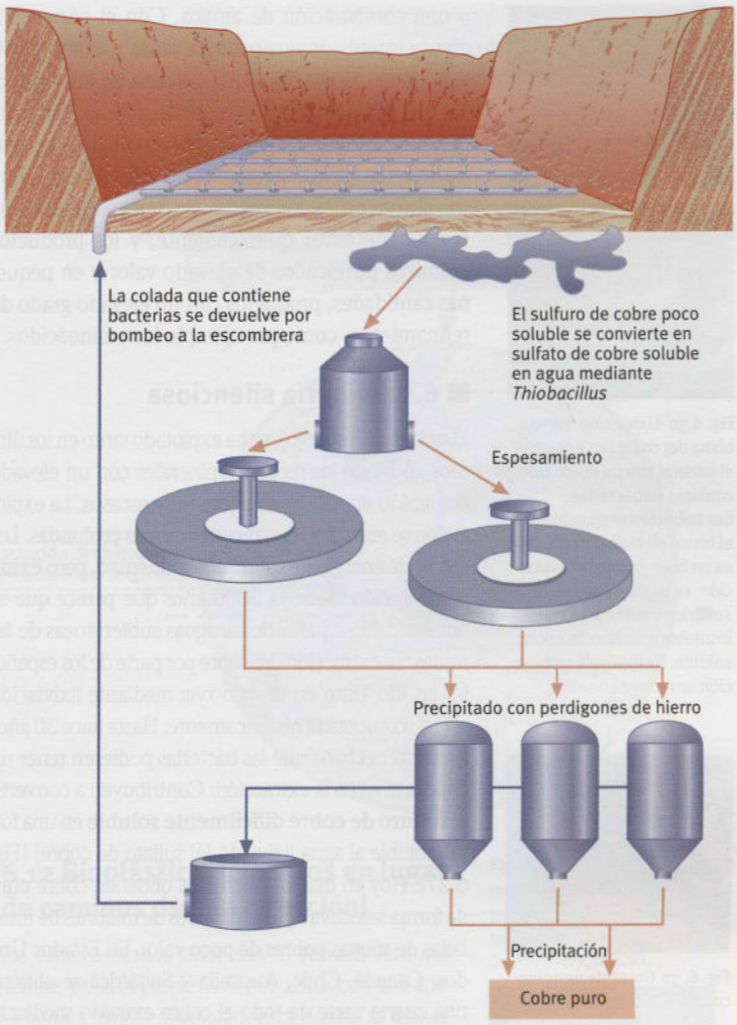


Fig. 6.27 Principio de la lixiviación microbiana del cobre.

¿Es rentable producir productos químicos industriales a partir de fuentes regenerables? La fabricación de productos en toneladas con poco aumento de los costes requiere un cálculo económico preciso. En la actualidad, la mayor parte de las veces esto recae en las fuentes de materias primas fósiles.

En un futuro próximo no cambiará la situación, al menos en sectores industriales completos. Una "infiltración biotecnológica" paulatina de la industria química depende de los precios del crudo y del desarrollo de bioprocesos económicos que deben reducir sus costes actuales de un 20 a un 40%. No hay que olvidar que, por supuesto, los procesos químicos y los catalizadores químicos están en continuo perfeccionamiento.

La economía dictará, en última instancia, si es mejor aplicar procesos biotecnológicos o químicos,



Fig. 6.28 Factoría de cobre histórica en Estados Unidos.



Fig. 6.29 Tiobacilos y una mina de cobre con roca pobre en cobre de Kennecott Utah Copper.





Fig. 6.30 Lixiviación microbiana del cobre: se pulveriza el mineral con un fluido que contiene tiobacterias. Las tiobacterias transforman el hierro en hierro tres. Éste es un buen medio de oxidación: se oxida pirita a ácido sulfúrico y sulfuro de cobre insoluble a sulfato de cobre soluble. Después, la solución se recoge en cubas.

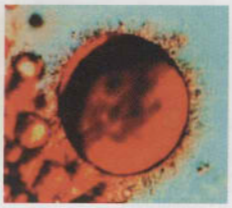


Fig. 6. 31 Gotas de petróleo con microbios encima.



Fig. 6.32 Petróleo que se filtra por los poros de la roca.



Fig. 6.33 Estas bacterias (*Alcaligenes* o *Ralstonia eutrophus*) constan casi en su totalidad de bioplástico (polihidroxibutirato).

o una combinación de ambos. Con el correspondiente interés, inversiones elevadas y una presión económica, en un futuro la mayoría de los productos químicos industriales podrían producirse enteramente mediante procesos biotecnológicos a partir de materias primas regenerables. Sin embargo, hoy son interesantes los productos nuevos que no se pueden sintetizar químicamente, y los productos químicos purificados de elevado valor y en pequeñas cantidades, productos con un elevado grado de refinamiento, como por ejemplo los aminoácidos.

6.10 Minería silenciosa

El **cobre**, el "oro rojo", se ha explotado tanto en los últimos años que los recursos minerales con un elevado contenido en cobre son ahora muy escasos. La explotación se realiza en zonas cada vez más profundas. Los costes de energía y explotación aumentan, pero existe una solución: hace ya 3000 años que parece que se obtuvo cobre a partir de las aguas subterráneas de las minas. La extracción del cobre por parte de los españoles en Río Tinto en el siglo XVIII mediante lixiviación está documentada históricamente. Hasta hace 30 años nadie sospechaba que las bacterias pudiesen tener un papel activo en la extracción. Contribuyen a convertir el **sulfuro de cobre difícilmente soluble** en una forma soluble al agua lixiviado (el sulfato de cobre) (Fig. 6.27). Hoy en día, los microbios obtienen cobre puro de forma selectiva a partir de miles de millones de toneladas de menas pobres de poco valor. En Estados Unidos, Canadá, Chile, Australia y Sudáfrica se obtiene una cuarta parte de todo el cobre extraído mediante biolixiviación (*bioleaching*) en el mundo. Más del 10% del oro y el 3% del cobalto y el níquel se obtienen por métodos biotecnológicos.

Los principales encargados de la lixiviación microbiana del cobre son las **bacterias del azufre** *Thiobacillus ferrooxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*. Las primeras, también denominadas de forma abreviada "Ferros", son bacterias acidófilas (afines a los ácidos) que oxidan el hierro dos a hierro tres, y absorben el azufre soluble, pero también los sulfuros insolubles, y los transforman finalmente en sulfatos. Por el contrario, las "Thios" (*Th. thiooxidans*) sólo crecen en el azufre elemental y en los compuestos solubles de azufre.

Ambos tipos de bacterias trabajan en estrecha colaboración según dos mecanismos de reacción (Fig. 6.30): en la **lixiviación directa**, las bacterias obtienen energía (ATP) mediante transferencia de electrones del hierro o el azufre al oxígeno de la membrana celular. Los productos oxidados son más solubles; en la **lixiviación indirecta**, las bacterias oxidan el hierro dos soluble a hierro tres, que asimismo es un oxidante potente, y en solución de ácido sulfúrico convierte a otros metales a su forma oxidada fácilmente soluble. Ahí vuelve a aparecer el hierro dos, que las bacterias oxidan de nuevo rápidamente a la forma tres "agresiva". Estos mecanismos se solapan en el proceso práctico de lixiviación. Finalmente, en la lixiviación del cobre, el ácido sulfúrico produce sulfato de cobre soluble, de color azul, a partir del sulfuro de cobre insoluble.

En la lixiviación bacteriana se transportan a puntos de recogida millones de toneladas de desechos que contienen cantidades pequeñas, pero valiosas, de cobre. Existen montañas de escoria de hasta 400 metros de altura y 4000 millones de toneladas de rocas (Fig. 6.29). Estas rocas se rocían con agua acidificada. Mientras el agua se filtra, se multiplican las tiobacterias, que aparecen a millones en cada gramo de roca. Al pie de la montaña de escoria se filtra el líquido que contiene metales y se recoge en grandes cubas colectoras. En ese momento ya se puede obtener cobre con facilidad. El líquido de lixiviación exento de cobre se vuelve a repartir por la montaña de escoria.

En la **lixiviación de mineral de uranio** (con iones de uranio de valencia cuatro), a partir de la pirita de hierro o hierro dos soluble, mediante bacterias también se produce hierro tres "agresivo", el cual forma a su vez iones de uranio seis; éstos se disuelven bien en ácido sulfúrico diluido.

Sin embargo, parece que para el **medio ambiente** la biosorción vale la pena: las cañas filtran las sustancias tóxicas de las aguas residuales. Se han descubierto algas que unen los metales pesados tóxicos, por ejemplo el cadmio, en grandes cantidades y prometen agua depurada por ser colectores de metal, mientras que al mismo tiempo obtienen metales valiosos. Hay diversos tipos de carbón que también acumulan metales pesados. Se pueden alcanzar concentraciones entre 30 y 1000 veces más elevadas que en las tierras circundantes.

6.11 ¿Una nueva vida para los pozos de petróleo agotados?

En una plataforma petrolífera aterriza un helicóptero, del cual baja un biotecnólogo con un maletín. El maletín transporta vida a un pozo de petróleo agotado: los cultivos de microbios que se bombean al tanque de petróleo se multiplican allí y forman productos que hacen que vuelva a brotar el petróleo.

Dos tercios del crudo se quedan en el suelo en una extracción primaria. Los **métodos secundarios de extracción de petróleo** utilizan agua y gas introduciéndolos a presión en el pozo para volver a aumentar la presión que ha disminuido (Fig. 6.34). Sólo en los

campos petrolíferos del Mar del Norte parece que quedan cantidades de petróleo no extraíble por valor de 300 000 millones de libras esterlinas. Las inversiones en investigación y desarrollo supondrían un pequeño aumento del porcentaje de la producción. La palabra mágica es **extracción de petróleo terciaria** o **MEOR** (del inglés *Microbial Enhanced Oil Recovery*, incremento de la extracción de petróleo por microbios).

Se está experimentando con diversos procesos. En los pozos de petróleo aparentemente vacíos se inyectan mezclas de bacterias, las cuales producen *in situ* gases como el dióxido de carbono, el hidrógeno y el metano, y de este modo hacen aumentar la presión de los yacimientos de petróleo. Otras cepas de microbios parece que fabrican **biotensoactivos**, que descomponen el petróleo en gotitas más pequeñas que se pueden filtrar por los pequeñísimos poros de las rocas (Fig. 6.34).

En la actualidad, el problema sigue siendo el aporte de oxígeno y nutrientes a los microorganismo cuando no se pueden alimentar de los componentes del petróleo. Además, las condiciones *in situ* son extremas; por ejemplo, en los yacimientos de petróleo del Mar del Norte, por el elevado contenido en sal y la escasez de oxígeno, ¡la presión es de 200 a 400 atmósferas y las temperaturas de 90 a 120 °C! Lo que aquí se buscan son extremófilos.

Las compañías petrolíferas experimentan con microbios que forman y dividen cadenas largas de biopolímeros. Los **biopolímeros** como el xantano los produce la bacteria *Xanthomonas campestris*, un patógeno de las plantas, a partir del almidón o la glucosa. El xantano se utiliza como **espesante**, que espesa el agua. Cuando se bombea inicialmente un biotensoactivo jabonoso en un pozo de petróleo agotado para disolver el petróleo de la roca, y seguidamente se bombea agua de xantano, el petróleo desprendido se extraerá mediante alta presión por el orificio de perforación (como con un punzón en una inyección).

Actualmente, el xantano aún es demasiado caro para poder acelerar la extracción de petróleo de forma efectiva. Sin embargo, se utiliza en alimentación en todo el mundo, por ejemplo para fabricar helados, flanes y bebidas bajas en calorías, para darles consistencia y que no sean "acuosos". Aunque el xantano sirve para espesar, no engorda. El ser humano (es decir, sus enzimas) no lo degradan y, por consiguiente, es bajo en calorías y tiene un (¡breve!) efecto saciante para los que cuidan la línea.

Hace 30 años el xantano era uno de los primeros productos nuevos de la biotecnología moderna. Le siguieron otros productos biológicos. Normalmente se degradan biológicamente con facilidad.

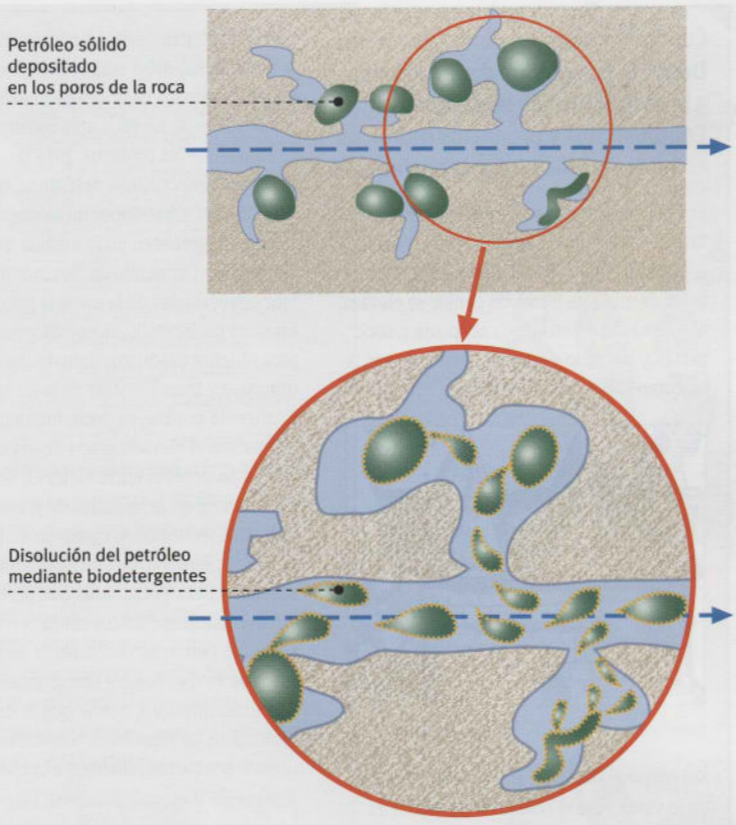


Fig. 6.34 Cómo se puede mejorar la extracción de petróleo mediante microorganismos (*Microbial Enhanced Oil Recovery*, MEOR).

6.12 Bioplástica: ¡circuitos en lugar de caminos de una dirección!

En los supermercados japoneses se venden verduras envasadas y platos preparados envueltos con una apetitosa lámina similar al celofán. Esta lámina se fabrica a partir del nuevo producto biológico llamado ***pullulan*** (Fig. 6.35). Por una parte, este polisacárido está constituido por componentes de glucosa, los cuales están, sin embargo, enlazados de tal forma (mediante los átomos de carbono uno y seis en lugar de uno y cuatro como en el almidón) que sus enlaces, al contrario de los del almidón, no los pueden romper las amilasas; por tanto, el ser humano no los puede digerir y son bajos en calorías. Al igual que el xantano, el *pullulan* aumenta la viscosidad de los alimentos.

La empresa Hayashibara fabrica *pullulan* mediante hongos (*Pullularia pullulans*) partiendo de azúcares simples, y a partir del espeso jarabe de *pullulan* vierte capas finas que se convierten en láminas duras cuando se secan. Las láminas son un excelente material de envasado porque mantienen el contenido al vacío, pero se pueden disolver fácilmente en agua caliente. Por supuesto, también protegen el medio ambiente y los microbios lo degradan en estado húmedo. Como truco especial se ofertan "láminas con sabor", por ejemplo con sabor de frutas o de ajo, que permiten



Fig. 6.35 Las láminas de *pullulan* para aclarar la garganta se disuelven en la lengua.

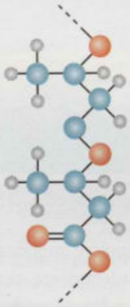
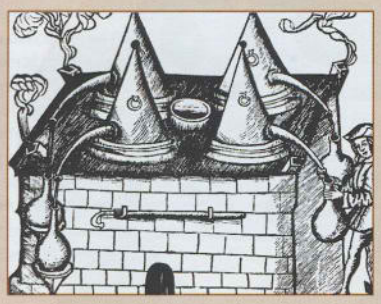


Fig. 6.36 Poli-3-hidroxibutirato (PHB).

Cuadro 6.5 Opinión de los expertos: Desde la conversión de la biomasa a la bioproducción sostenible. Combustibles y productos químicos en bruto, purificados y especiales

El trato cuidadoso de los recursos constituyó uno de los estímulos para el desarrollo de la biotecnología industrial, mucho tiempo antes de que esta forma de pensar se elevara a la categoría de estrategia aceptada y conocida hoy por todo el mundo, de forma sensata, como "desarrollo sostenible".[1]



Destilación de etanol en la Edad Media.

Sin embargo, en la escena actual inspirada en lo verde para el consumo industrial de materias primas y de biomasas de residuos, lamentablemente a menudo se olvida que un desarrollo sostenible tiene que tener en cuenta, por definición, tres dimensiones:

- Tolerancia medioambiental
- Tolerancia social
- Rentabilidad.

Con mucha frecuencia, las estrategias propuestas son demasiado unidimensionales y tienden a extrapolar fácilmente una política partiendo de las formas de producción agrícola actuales que todavía dependen, en gran medida, de las subvenciones.



La colza proporciona biodiesel.

Se requiere implantar soluciones que sean verdaderamente sostenibles y que también respondan de modo satisfactorio a la cuestión de la rentabilidad. La optimización de la rentabilidad debe aspirar claramente a mejorar tanto los balances de materia y energía (cuidado de los recursos) como también a rentabilizar los procesos. Para la química/biotecnología del futuro, que parte de biomasas y fracciones de biomasas, se debería proceder, en la medida de lo posible, según el principio de "los mínimos cambios estructurales de la materia prima". En otras palabras: las biomasas generadas para obtener productos industriales deberían utilizarse y transformarse de la forma más inteligente posible, es decir, manteniendo al máximo el elevado grado de organización y de la proporción entre C/H/O. Un ejemplo positivo: en la "química de grasas y aceites" estos requisitos se cumplen ampliamente, ya que ésta trabaja prácticamente manteniendo el peso inicial. Más que producir productos químicos clásicos basados en el "pensamiento petroquímico" a partir de biomasas (aunque esto es posible con grandes pérdidas de transformación), habría que intentar más bien cubrir las "funciones" deseadas con nuevos productos próximos a la biología.



En las pruebas de *screening* se buscan nuevas enzimas.

En un informe reciente de la OCDE, *The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability*,[2] se difunde la metodología del *Life Cycle Assessment* (LCA) para juzgar la sostenibilidad (en relación con la energía, las materias primas, los residuos, los productos y subproductos, los procesos y la seguridad) y se documenta mediante 21 estudios de casos detallados.

Las consecuencias finales de este informe se formulan en diez preceptos principales:

- La conciencia global medioambiental inducirá a esfuerzos mayores en vistas a obtener procesos industriales limpios.
- La biotecnología es una tecnología de capacitación (*enabling technology*) fuerte para establecer productos y procesos limpios, y puede constituir la base de la sostenibilidad industrial.
- La valoración de la limpieza de los productos y procesos industriales es esencial, pero también muy compleja. Por el momento, el LCA es el mejor método disponible para esta valoración.
- Los estímulos principales de los procesos de la biotecnología industrial son la economía (fuerzas del mercado), la política gubernamental, la ciencia y la tecnología.
- Alcanzar una mayor penetración de la biotecnología precisa aunar los esfuerzos en I+D por parte del gobierno y la industria.
- Para poder agotar todo el potencial de la biotecnología como base de producto y proceso limpios –más allá de las aplicaciones actuales– se necesita I+D adicional.
- Dado que la biotecnología, incluyendo la tecnología de recombinación del DNA y sus aplicaciones, es cada vez más importante como herramienta para crear productos muy valiosos y para el desarrollo de biocatalizadores, existe una mayor necesidad de disponer de regulaciones y normativas armonizadas y especializadas.
- Las fuerzas del mercado pueden constituir un gran atractivo para alcanzar objetivos que pretendan mantener limpio el medio ambiente.
- La política gubernamental para mejorar la limpieza de productos y procesos industriales puede constituir el único factor altamente decisivo para el desarrollo y la aplicación industrial de procesos biotecnológicos limpios.



El maíz es la materia prima regenerable número uno, especialmente en América.

- La comunicación y la formación serán necesarias para alcanzar la penetración de la biotecnología para productos y procesos limpios en diversos sectores industriales.

Biotecnología y biocatálisis: análisis de la situación en I+D desde el punto de vista industrial

En el camino hacia las estrategias de producción sostenibles, la industria química debe seguir desempeñando un papel clave y realizar un importante cambio estructural en el que se obtengan más y más procesos biológicos, e ideas basadas en la concepción "bio" en los esfuerzos de I+D. Esto se puede formular brevemente mediante la siguiente situación de partida:



Un autobús que funciona con diesel de soja, en una plantación de soja.

- Hay una enorme diferencia entre la percepción y la valoración de la innovación en el sector de la biocatálisis de la escuela superior y la industria: ¡invención (descubrimiento) no debe confundirse con innovación!
- El "abismo" entre la investigación puramente académica y las necesidades industriales reales se seguirá agrandando en cuanto a tendencias: el aumento de los conocimientos no se traduce automáticamente en nuevas aplicaciones y soluciones de problemas.
- Por parte de la escuela superior existe una gran presión para publicar, unilateral, y se da poca importancia a la puesta en práctica de los resultados en forma de aplicaciones innovadoras (por ejemplo en colaboración con la industria o mediante *spin-offs*). Hay que reforzar los atractivos para la puesta en práctica.
- Muy pocos esfuerzos de *screening* por ambos lados: se necesita urgentemente aumentar la caja de herramientas biocatalítica.

Para mejorar las futuras oportunidades industriales de la biocatálisis, y con ello de la biotecnología blanca, se pueden definir los siguientes objetivos estratégicos:

- La industria necesita urgentemente nuevos tipos de biocatalizadores que catalicen nuevos tipos de reacciones (desconocidas hasta ahora o biológicamente no accesibles). Las posibilidades que se obtienen a partir de la enorme biodiversidad de los organismos vivos, todavía no investigada sistemáticamente, deben utilizarse de forma óptima. Se deben desarrollar métodos de *screening* rápidos y selectivos. Estos trabajos sólo pueden resolverlos conjuntamente la industria y las escuelas superiores.
- La mejora de los biocatalizadores ya conocidos mediante métodos genéticos, químicos o físicos es, en algunos casos (aunque ni mucho menos en todos), necesaria y deseable. Aquí, en el sentido de la utilización óptima de los recursos, debería tenerse más cuidado a la hora de elegir los sistemas "correctos", especialmente en lo que respecta a las escuelas superiores. Para ello se necesita un diálogo más intenso con la industria.
- Hay que comercializar lo más rápidamente posible biocatalizadores[3] nuevos y bien caracterizados, con gran potencial de aplicación, e integrarlos en la investigación y desarrollo académicos e industriales (I+D). Ejemplo negativo: las nitrilasas se conocen desde hace más de 20 años, pero hace muy poco tiempo que unas cuantas compañías de enzimas las han empezado a comercializar.

Bibliografía:

1 World Commission on Environment and Development. Our Common Future (The Brundtland Report), Oxford University Press, 1987.

2 The Application of Biotechnology to Industrial Sustainability, OECD 2001.

3 Oreste Ghisalba (2000) Biocatalysed Reactions. En: Gualtieri F (ed.) New Trends in Synthetic Medicinal Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim.



El Profesor Dr. Oreste Ghisalba, de Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza.

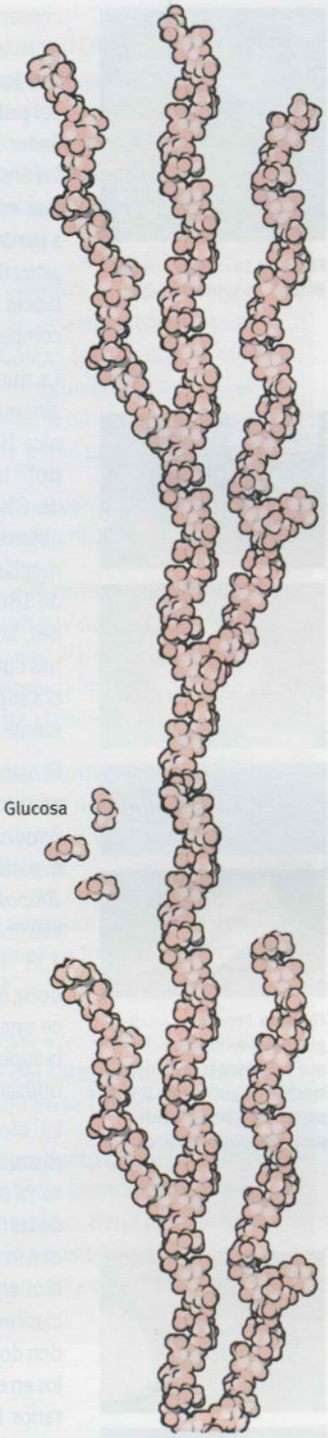


Fig. 6.37 Las materias primas regenerables se emplean en una industria sostenible. Aquí se representa la molécula ramificada del almidón. Mediante las amilasas (Cap. 3) puede descomponerse en azúcares sencillos que posteriormente fermentan de forma alcohólica.



Fig. 6.38 La materia prima *Biopol®* es biodegradable.









Fig. 6.39 Productos biodegradables en Japón: vajilla que se autodescompone, mochila de polilactato (PLA), pajitas para beber y bolsa para residuos biológicos.





Fig. 6.40 Un "CD vegetal" biodegradable (arriba) y el ciclo de los bioplásticos representado en un póster japonés (abajo).

conservar el aroma de los alimentos envasados durante más tiempo. Biológicamente hablando, también son fácilmente degradables los productos derivados del **polihidroxibutirato (PHB)**. El PHB tiene propiedades como el polipropileno, el cual conocemos por los artículos de plástico de uso cotidiano. Al contrario que este derivado del petróleo, el PHB se produce a partir de azúcar por las bacterias *Alcaligenes eutrophus* (Fig. 6.33). El PHB sirve a las bacterias de sustancia acumuladora de energía. Las bacterias están compuestas en gran parte de plástico.

La nueva sustancia bioplástica la desarrollaron originalmente los biotecnólogos de la compañía británica ICI, y la comercializa con el nombre de **Biopol®** la filial de ICI Marlborough Biopolymers Ltd. de Cleveland (Gran Bretaña) (Fig. 6.38). El PHB obtenido a partir de *Alcaligenes* resultó ser un termoplástico muy cristalino, con un punto de fusión de 180 °C. En la fase de pruebas se fabricaron moldes, láminas y fibras de PHB. Demostró tener buenas cualidades como material de envasado, pero no era superior al polipropileno –útil, pero no especialmente atractivo para los técnicos.

El cambio profundo se produjo cuando se logró producir con bacterias, además del componente 3-hidroxibutirato, el 3-hidroxipentanato. Cuando a partir de ambos componentes se polimeriza el *Biopol®* aparece un polímero que es bastante más elástico y más duro, y tiene un punto de fusión de 135 °C. Además, el *Biopol®* es piezoeléctrico, es decir, que cuando sus cristales se deforman se produce una carga eléctrica mediante tensión de corte en la superficie. Por tanto, el bioplástico también podría utilizarse para sondas de medición de presión.

La biodegradabilidad convierte al *Biopol®* en un material muy interesante para la medicina: en el futuro ya no se necesitará dar puntos de sutura después de las operaciones. En las cápsulas de *Biopol®* se pueden introducir medicamentos para que se liberen en el cuerpo durante largo tiempo. Asimismo, las sustancias nutritivas y los reguladores del crecimiento pueden dotarse de una envoltura de *Biopol®*, introducirlos en el suelo para la jardinería y la agricultura, y liberarlos lentamente al ambiente con la disgregación microbiana. Esto no es nada extraño: en su momento se aisló *Alcaligenes (Ralstonia) eutrophus* a partir de pruebas en el suelo de la Llanura de Alemania del Norte. En el suelo, los hongos, las bacterias y las enzimas extracelulares descomponen el *Biopol®* en pocas semanas o algunos meses. Sin embargo, el *Biopol®* aún es demasiado caro para utilizarlo a gran escala. Son interesantes los experimentos para producir *Biopol®* en plantas transgénicas (Cap. 7).

Hay más productos biotecnológicos a la vista: los hilos de seda de araña (*Nephila*) pueden ser tan resistentes que en el Mar del Sur se utilizan para pescar. Se pueden dilatar una tercera parte antes de desgarrarse. En la actualidad se está intentando fabricar esta proteína, la **espidroína,** mediante manipulación genética en *E. coli* o incluso en las cabras (como *BioSteel®*, de la empresa estadounidense Nexia) de forma recombinada.

Aquél que en Japón reciba una factura telefónica de la compañía NTT DoCoMo estará beneficiando al medio ambiente: la ventanilla del sobre no empezó su vida en un pozo de petróleo sino en un campo de maíz. Está hecha de **polilactato** (ácido poliláctico, APL). En el polilactato, el lactato (la sal del ácido láctico, Cap. 2) está unido formando una cadena. Se obtiene por fermentación microbiana a partir del almidón de maíz (Figs. 6.39 y 6.40).

Desde 2002, en Nebraska (Estados Unidos) existe una instalación de McCargill-Dow que puede producir anualmente 140 000 toneladas de APL, comercializado con el nombre de *NatureWorks®*. Una empresa japonesa fabrica láminas transparentes a partir de éste. Para fabricar una hoja DIN A4 se necesitan unos diez granos de maíz.

Toyota ha comunicado recientemente que fabrica las envolturas de las ruedas de recambio y las esterillas con APL; Sanyo entra en el mercado con un "CD vegetal" de APL (Fig. 6.40).

Algunos tirarían su ordenador a la basura en un ataque de cólera, pero no se "eliminaría" en mucho tiempo –la eliminación de aparatos y materiales cada vez causa más quebraderos de cabeza. ¡La empresa informática Fujitsu tiene previsto ofrecer un *Veggie-Notebook-Computer* cuya carcasa pueda convertirse en compost!

Uno de los inconvenientes aún sigue siendo la sensibilidad del material al calor y también su precio. A 60 °C, el APL se reblandece. Se están desarrollando bolsas de té y contenedores de alimentos biodegradables. Sin embargo, a 500 yens (unos 5 euros), un kilo de plástico biológico sigue siendo tres veces más caro que el plástico producido a partir del petróleo. Esto debería cambiar cuando exista una demanda masiva de productos de APL.

Cuando, en un futuro, los restos de plástico de nuestro entorno realmente se "disuelvan satisfactoriamente", esto será un logro de los nuevos bioproductos. En ese momento se habría eliminado el **camino de una dirección** (materia prima-producto-residuo) a favor de los **circuitos naturales**. La técnica genética "verde" también está trabajando en este sentido.

Bibliografía utilizada y aplicada

- Diccionario amplio de medio ambiente:
  Römpp-Umweltlexikon en CD-ROM (1995) Thieme, Stuttgart.
- Todavía la mejor introducción a la biotecnología medioambiental:
  Umwelt-Biotechnologie:
  Dellweg H (1994) Biotechnologie verständlich. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Un buen libro básico, también para la tecnología del medio ambiente:
  Leuchtenberger A (1998) Grundwissen zur mikrobiellen Biotechnologie. BG Teubner, Stuttgart, Leipzig.
- Fácilmente legible sobre "biorremediación":
  Thieman WJ, Palladino MA (2004) Introduction to Biotechnology. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco.
- Un capítulo hermoso sobre microbiología del medio ambiente en el libro de microbiología probablemente mejor ilustrado:
  McKane L, Kandel J (1996) Microbiology. Essentials and applications. 2nd edition, McGraw-Hill Inc., New York.
- Historia de los campos de aguas residuales de Berlín:
  Meinicke I, Bernitz H-M (1996) Der Gemüsegarten Berlins – Bilder einer Ausstellung. Ausstellungskatalog, Rangsdorf.
- Una buena introducción a la hidrobiología:
  Kalbe L (1985) Leben im Wassertropfen. Urania-Verlag, Leipzig.
- Un compendio académico:
  Alexander M (1999) Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York.
- Dos *thrillers* medioambientales recomendados:
  Kegel B (2001) Sexy Sons. Fischer, Frankfurt a.M.
  Schätzing F (2004) Der Schwarm. Kiepenheuer und Witsch, Köln.
- Artículo clásico sobre bioprospección de minas:
  Brierly CL (1984) Bakterien als Helfer im Bergbau. In: Industrielle Mikrobiologie (Gruss P, Hrsg.) Spektrum der Wissenschaft Reader.

Enlaces de web

- Enlaces sobre biotecnología del medio ambiente:
  www.i-s-b.org/wissen/umwelt.htm
- Punto de transferencia de tecnología medioambiental:
  www.ruhr-uni-bochum.de/ts-ubt/
- Todo sobre la catástrofe del petrolero Exxon Valdez:
  www.evostc.state.ak.us/
- Zoo fotográfico de microbios para el medio ambiente:
  www.commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zamain.html
- "Las formas artificiales de la naturaleza" de Ernst Haeckel –un placer científico y artístico en la página web del Dr. Stüber del MPI para la investigación de cultivos, Colonia:
  http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/~stueber/haeckel/kunstformen/natur.html
- Una galería fotográfica de productos biodegradables:
  www.ibaw.org/eng/seiten/markets_products.html

Ocho preguntas de autoevaluación

1. ¿Por qué debe bombearse adicionalmente oxígeno en las instalaciones de depuración biológica?
2. ¿Qué significa un DBO_5 de 900 mg/L en una muestra de aguas residuales? ¿El oxígeno de cuántos litros de agua limpia a 20 °C se necesitaría para depurar un solo litro de estas aguas residuales?
3. ¿Dónde es verdaderamente adecuado utilizar el biogás?
4. ¿Para qué obtuvo Ananda Chakrabarty una patente estadounidense? ¿Qué había obtenido experimentalmente y por qué la patente significó una innovación?
5. ¿Por qué motivo la madera es un material de construcción tan apreciado? ¿Contra qué hay que protegerla?
6. ¿Qué ventajas tienen los coches de etanol en Brasilia y qué desventajas?
7. ¿Qué ser vivo produce la mayor parte del carburante doméstico metano en la Tierra?
8. ¿Qué producto biodegradable procedente de las materias primas regenerables tiene en la actualidad más posibilidades en los productos textiles y el plástico desechable?

BIOTECNOLOGÍA VERDE

7.1 Los microbios son comestibles 172

7.2 Algas y cianobacterias 172

7.3 La proteína *single cell:* la esperanza de las fuentes baratas de proteínas 174

7.4 La micoproteína tiene éxito como proteína vegetal para el consumidor 175

7.5 ¡La biotecnología "verde" *ante portas*! 178

7.6 El campo en un tubo de ensayo: cultivo de plantas *in vitro* 178

7.7 El cultivo de meristemos 179

7.8 Cultivos haploides: anteras y ovarios 180

7.9 Cultivos de callos y en suspensión 181

7.10 Las células vegetales en un biorreactor producen principios activos 183

7.11 ¿Qué principios activos vegetales seguirán a la shikonina? 184

7.12 *Agrobacterium* –Un parásito como ingeniero genético 185

7.13 Transferencia genética biolística: un disparo de DNA 185

7.14 Plantas transgénicas: resistencia a los herbicidas 188

7.15 Insecticidas biológicos 189

7.16 Claveles azules y tomates "antifofos" 193

7.17 ¿Son peligrosos los alimentos genéticos? 194

7.18 ¿Hay que identificar a los alimentos genéticos? 195

7.19 *Gene-Pharming* (granja de producción genética) 195

7.20 Plantas transgénicas –Un debate acalorado 198

7.21 ¿Palmeras tropicales en Alemania? 198

7.22 Las bacterias de los cañones de nieve aseguran las vacaciones de esquí 200

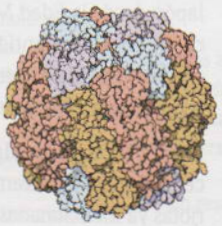




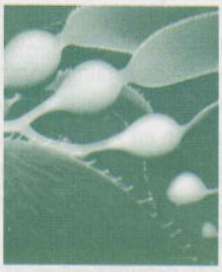














Capítulo 7



Fig. 7.1 Aztecas pescando *Spirulina*.



Fig. 7.2 Alga marrón Kelp (*Macrocystis*).







Fig. 7.3 Granja de *Spirulina* en la India.



Fig. 7.4 Pastillas de *Spirulina*.

7.1 Los microbios son comestibles

Para producir un kilo de proteínas animales se necesitan de cinco a diez kilos de proteína vegetal. En el proceso se pierden cantidades masivas de proteínas, además de las enormes pérdidas debidas a parásitos, recolección, transporte y almacenamiento. Los microorganismos pueden ayudar de modo eficaz: no sólo producen medicamentos, vino y queso, sino que ¡los propios microbios son comestibles! –contienen proteínas, grasas, azúcares y vitaminas valiosas.

Ya en 1521, el español Bernal Díaz del Castillo relató, después de la conquista de México, que los aztecas comían unos pastelitos curiosos que parecían de queso. Estos pasteles estaban hechos de unas pequeñas algas microscópicas que crecen en los mares mejicanos, a las cuales los aztecas llamaban *Techuilatl*. Se trataba de la **espirulina** (*Spirulina*). La espirulina no es un alga "verdadera", sino más bien una cianobacteria, una "bacteria azul".

Parece que en el reino de Moctezuma, los sirvientes que debían proporcionar pescado fresco al soberano cada día, lo cual a la larga sólo era posible recorriendo distancias enormes, tomaban espirulina como alimento principal. Aún en la época de Cortés, ésta se comerciaba en los mercados locales y se comía junto con pan y comidas a base de cereales. Los pescadores hicieron desaparecer la espirulina de los lagos de agua salada con sus redes de malla fina (Fig. 7.1), que en aquel entonces aún no se colocaban a secar. En la actualidad todavía existe espirulina en el lago de Texcoco de México. Los otros lagos, junto con los jardines flotantes de los aztecas, son hoy en día desiertos yermos.

A miles de kilómetros de distancia, en el lago Chad en África (Nigeria) se consume también espirulina desde tiempo inmemorial. En los mercados locales del lago Chad se pueden comprar pasteles de algas finos, duros y verde azulados. El pueblo Kanembu llama *dihé* a este producto. El *dihé* es un componente esencial del 70% de todos los platos. Se procesa como mezcla para salsas de tomate, chile y diversas especias, las cuales se comen conjuntamente con el alimento básico, que es el mijo. Los pasteles de espirulina se obtienen secándolos al sol. Previamente se recogen las algas flotantes de las zonas protegidas de los lagos. Luego se ponen a secar y se extienden en la arena caliente, donde se secan rápidamente.

En los países occidentales y en Japón se come espirulina procedente de granjas de algas en dietas pobres en colesterol y depurativas (Fig. 7.4). Unos 100 gramos de espirulina contienen unos 70 gramos de proteínas, 20 gramos de azúcar, dos gramos de fibra y sólo dos gramos de grasa, además de vitaminas esenciales (A, B_1, B_2, B_6, B_{12}, E) y minerales.

7.2 Algas y cianobacterias

Las algas, a excepción de la espirulina procariota, son eucariotas fotosintéticas (Cuadro 7.1). Las **macroalgas** son económicamente más significativas que las **microalgas**: en la actualidad se utilizan macroalgas verdes (clorofila), rojas (rodofita) y marrones (fucofita o feofita).

Las algas marrones, como la *kelp* californiana (*Macrocystis*) (Fig. 7.2) tan estimada por los submarinistas, que crece salvaje como en la selva, se cultivan desde 1900. A partir de ésta, en San Diego se produce desde 1921 el alginato tipo gelatinoso. Allí existen bosques de algas inmensos. Actualmente, el **alginato** se utiliza como espesante y estabilizante en los alimentos y en la fabricación de helados, en la industria textil y como encapsulador de medicamentos (y para enzimas y levaduras, Cap. 2).

Otros productos a base de algas son el **agar** que forma gel (previamente denominado agar-agar, importante para el cultivo de microbios y la electroforesis en gel, ver Cap. 10), y el **carragenato**.

El aminoácido potenciador del sabor **L-glutamato** se descubrió por primera vez en unas algas del Japón (Cap. 4). Otras algas marrones como la ***Undaria*** (jap. *wakame*) y la ***Laminaria*** (jap. *konbu*) crecen en la costa de Japón y de China y se utilizan para ensaladas, sopas, fideos o para acompañar a la carne (Figs. 7.5 y 7.6). El valor anual de mercado de ambas algas asciende aproximadamente a 600 millones de dólares USA. Anualmente se cultivan 20 000 toneladas de *wakame*.

El **alga roja** *Porphyra* (jap. *nori*) se cultiva en el Japón desde la Edad Media. En la actualidad se pesca en enormes cantidades con haces de bambú o con redes horizontales en granjas marinas, para posteriormente dejarla secar al sol.

Las cepas de **microalgas** más importantes pertenecen a dos tipos diferentes: las bacterias azules procariotas ya mencionadas y las algas verdes eucariotas.

Dentro de las **bacterias azules** procariotas (cianobacterias) denominadas más arriba algas azules, se encuentran los tipos de alga de la familia *Spirulina* más importantes económicamente. El helecho acuático *Azolla* que cultivan en Asia los arroceros contiene la bacteria azul simbiótica *Anabaena azollae* (Fig. 7.9), también denominada hilo de cuerda, la cual suministra nitrógeno al helecho.

La membrana celular de la *Spirulina* consta, al igual que la de las bacterias, de mucoproteidos y, por consi-

Cuadro 7.1 La fotosíntesis

Casi toda la entalpía libre que consumen los sistemas biológicos procede de la energía solar. Se trata de enormes cantidades: aproximadamente 4×10^{17} kJ o 10^{10} toneladas por año de carbono convertido en azúcar. La energía solar se convierte en energía química mediante la fotosíntesis. El agua y el dióxido de carbono se unen en un proceso de elevada complejidad para formar hidratos de carbono (primero glucosa, luego sacarosa y almidón) y oxígeno molecular.

En los cloroplastos de las plantas verdes, las moléculas de pigmento (clorofila) de la membrana tilacoide generan electrones de elevada energía a partir de la energía luminosa captada. Se utilizan en la reacción luminosa para producir NADPH+H^+ y ATP (Cap. 1).

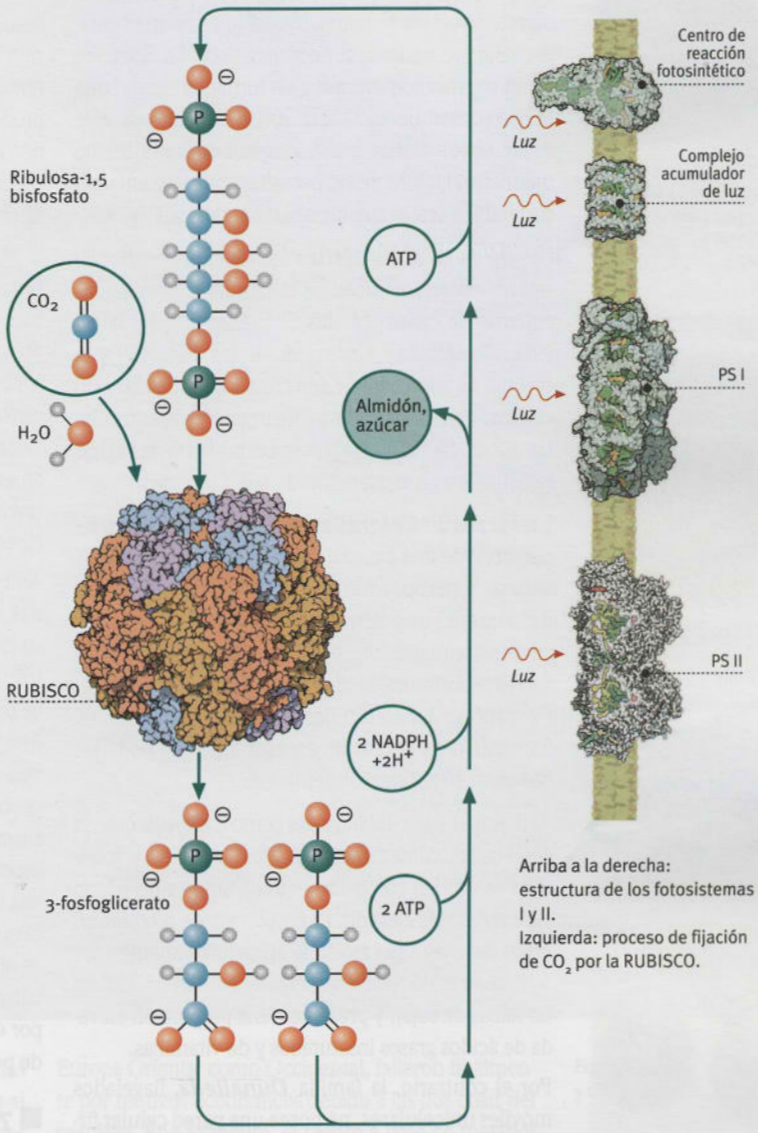
La fotosíntesis de las plantas verdes se lleva a cabo mediante dos fotosistemas unidos entre sí. De forma muy simplificada, el proceso sería el siguiente:

En el fotosistema II, al excitar el P680 mediante luz (un par de moléculas de clorofila) produce una transferencia de electrones a través de diversas moléculas pigmentadas a la plastoquinona A y luego a la plastoquinona B. Estos electrones ricos en energía se vuelven a sustituir extrayendo electrones de menor energía procedentes de moléculas de agua: el centro que genera oxígeno quita un electrón al agua, lo transfiere a un grupo de tirosina y éste lo devuelve a la clorofila, la cual puede absorber otro fotón.

Para cada cuatro electrones transferidos se genera respectivamente una molécula de oxígeno. Desde la plastoquinona, los electrones pasan por un complejo citocromo bf a la plastocianina y de allí al fotosistema I.

El fotosistema I, que se representa aquí, es un complejo trímero que "nada" en la membrana. Cada una de las tres subunidades tiene cien cofactores (clorofila verde, carotenoide naranja). Los colores tienen un significado: la clorofila absorbe la luz azul y la roja –por eso vemos las plantas de un verde maravilloso.

El fotosistema I posee cadenas de transferencia de electrones como centro de las tres subunidades. Cada una está rodeada de un anillo denso de moléculas de clorofila y carotenoide, que funcionan como "antenas".



Arriba a la derecha: estructura de los fotosistemas I y II.
Izquierda: proceso de fijación de CO_2 por la RUBISCO.

Estas antenas absorben luz y transfieren energía a sus vecinos. Seguidamente, todo se canaliza en los tres centros de reacción que generan electrones (una fuerza reductora).

En resumen, la reacción luminosa produce en las membranas tilacoides de los cloroplastos en primer lugar una fuerza reductora (para producir NADPH+H^+), en segundo lugar forma un gradiente de protones (H^+) (un gradiente entre ambos lados de las membranas tilacoides; de este modo se produce ATP) y en tercer lugar produce oxígeno.

Otra etapa es la fijación de CO_2: la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (abreviada RUBISCO) es una liasa (Cap. 2) y constituye el puente entre la vida y la ausencia de vida.

Une el CO_2 inorgánico con la ribulosa-1,5-bisfosfato, una cadena corta de azúcar con cinco átomos de carbono. La RUBISCO forma, a partir de ahí, dos 3-fosfoglicerato (cada uno con tres átomos de carbono). La mayoría de las moléculas de fosfoglicerato se reciclan para volver a formar más ribulosa-bisfosfato, pero una de cada seis moléculas se utilizará para formar sacarosa o almidón (como sustancia de reserva).

El 16% de las proteínas de los cloroplastos son RUBISCO, y en vista de la cantidad enorme de plantas ¡es obvio que la RUBISCO es la proteína que más abunda en la Tierra!



Fig. 7.5 Las macroalgas secas se utilizan en China y Japón como base económica para hacer sopas.



Fig. 7.6 En Japón, las macroalgas forman parte integrante de la alimentación desde tiempo inmemorial.



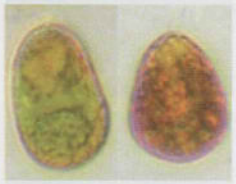


Fig. 7.7 El alga *Dunaliella* se cultiva en granjas (arriba: en Australia occidental). Abajo: los *carotenoides* se concentran en la célula de la derecha.



Fig. 7.8 *Fusarium graminareum*, el productor del *quorn*.

guiente, se descompone fácilmente con las enzimas digestivas del ser humano, lo cual implica una ventaja cuando se utiliza con fines dietéticos. La *Spirulina* es un organismo filiforme y en forma de espiral que puede constar de 150 hasta 300 células individuales y que puede alcanzar una longitud de hasta medio milímetro. Dentro de las bacterias azules se encuentra también el alga anguila o babosa *Nostoc* (Fig. 7.9).

Dentro de las **algas verdes** eucariotas (clorofíceas) se encuentran los tipos de la familia *Chlorella*, las colonias de cuatro células *Scenedesmus*, las flageladas *Dunaliella* y *Chlamydomonas* (Fig. 7.9) y la colonia de algas *Volvox* que consta de hasta 20 000 células. *Volvox* está altamente organizada, con células diferenciadas. Son algas importantes en las aguas residuales y en el plancton de lagos y mares.

Las células de ***Chlorella*** y ***Scenedesmus*** están recubiertas de una pared de celulosa gruesa con depósitos de esporopolenina (la sustancia de las paredes de los granos de polen de las plantas superiores). Las paredes celulares impregnadas de esta sustancia no son especialmente fáciles de atacar químicamente. Para ello se deben romper las células de aproximadamente diez micras de espesor antes de poderlas reutilizar para fines alimenticios.

Actualmente se cultivan algas como *Chlorella* con un coste de aproximadamente diez euros por kilo y, sobre todo se venden como alimento dietético a un precio diez veces más elevado. La proporción de proteína en bruto de estas algas asciende aproximadamente a un 50% de su masa total (en comparación con un 35% en las habas de soja), y presentan una proporción elevada de ácidos grasos insaturados y de vitaminas.

Por el contrario, la familia ***Dunaliella***, flagelados móviles unicelulares, no posee una pared celular firme. Su característica más notable es su extraordinaria tolerancia a la sal. Estas algas halófilas se encuentran en grandes cantidades en las lagunas de desecación de las salinas de agua marina. Debido a su enorme contenido en β-caroteno, colorean el suero salino de rojo intenso (Fig. 7.7). Para equilibrar el valor osmótico externo concentran glicerina en cantidad considerable, la cual se obtiene de forma industrial al igual que el caroteno.

Las algas doblan su masa en sólo seis horas. Las gramíneas necesitan para ello dos semanas, los polluelos cuatro semanas, los cochinillos seis semanas y los terneros dos meses.

Por lo tanto, en muchos países se trabaja en **granjas de algas.** Para ello se necesitan grandes superficies llanas donde las algas reciban suficiente luz solar (Figs. 7.3 y 7.7). Con su ayuda, forman azúcar a partir de dióxido de carbono, agua y sales nutritivas, y a partir de los azúcares producen proteínas. La luz y el agua son gratuitas, y sólo se necesitan unas pocas sales nutritivas baratas para que las algas crezcan abundantemente. Por cada hectárea de superficie, *Spirulina* produce aproximadamente diez veces más biomasa que el trigo y tiene un contenido mucho más elevado en proteínas que éste. En la recolección, las algas se filtran, se secan al aire y luego, después de haberlas dotado de sustancias saporizantes, se venden.

Entonces, ¿por qué no existen todavía granjas enormes de algas en las zonas donde hay hambruna? Ahí no se dispone ni de la técnica más sencilla para eso; además, en muchas zonas, el agua es escasa y cara. El factor decisivo es que, en condiciones de producción favorables, la proteína de las algas cuesta diez dólares americanos por kilo y la proteína de soja sólo 20 centavos por kilo. Sin embargo, los expertos están convencidos de que las algas tienen un gran futuro.

Aún más rápidamente que las algas crecen las bacterias, las levaduras y los hongos. Las bacterias doblan su masa en un espacio de tiempo de entre 20 minutos y dos horas, y pueden contener hasta un 70% de proteínas. Como término medio, las levaduras pueden formar proteínas por unidad de masa 100 000 veces más rápido que una vaca. Una vaca sólo nos proporciona en forma de carne una undécima parte de las sustancias nutrientes absorbidas a partir de la alimentación de las plantas. Es decir, se pierden diez onceavos para la alimentación humana en los bóvidos. En el caso de las bacterias, las levaduras y los hongos, esto es diferente: casi toda la proporción de nutrientes se convierte en proteínas, azúcares y grasas utilizables por el ser humano y los animales. Se estuvo a punto de poder aprovecharlas.

7.3 La proteína *single cell*: la esperanza de las fuentes baratas de proteínas

La historia moderna de la producción de proteínas mediante microbios comenzó en la Alemania Imperial, durante la Primera Guerra Mundial, con el cultivo de **levaduras.** Debido a la escasez de alimentos se cultivaba levadura de pan en grandes cantidades y con ella se "alargaban" principalmente embutidos y sopas. Las levaduras tienen la gran ventaja de alimentarse de soluciones baratas que contienen azúcar y que no tienen otra aplicación, y de convertir el azúcar en proteínas valiosas. En los 900 días del sitio de Leningrado, las levaduras salvaron a miles de personas de morir de hambre en la Segunda Guerra Mundial. Poco después de la guerra, en Alemania, "los copos de levadura" aplacaron el hambre de muchas personas.

Hasta los años 1960 no se volvieron a construir instalaciones para producir proteínas mediante micro-

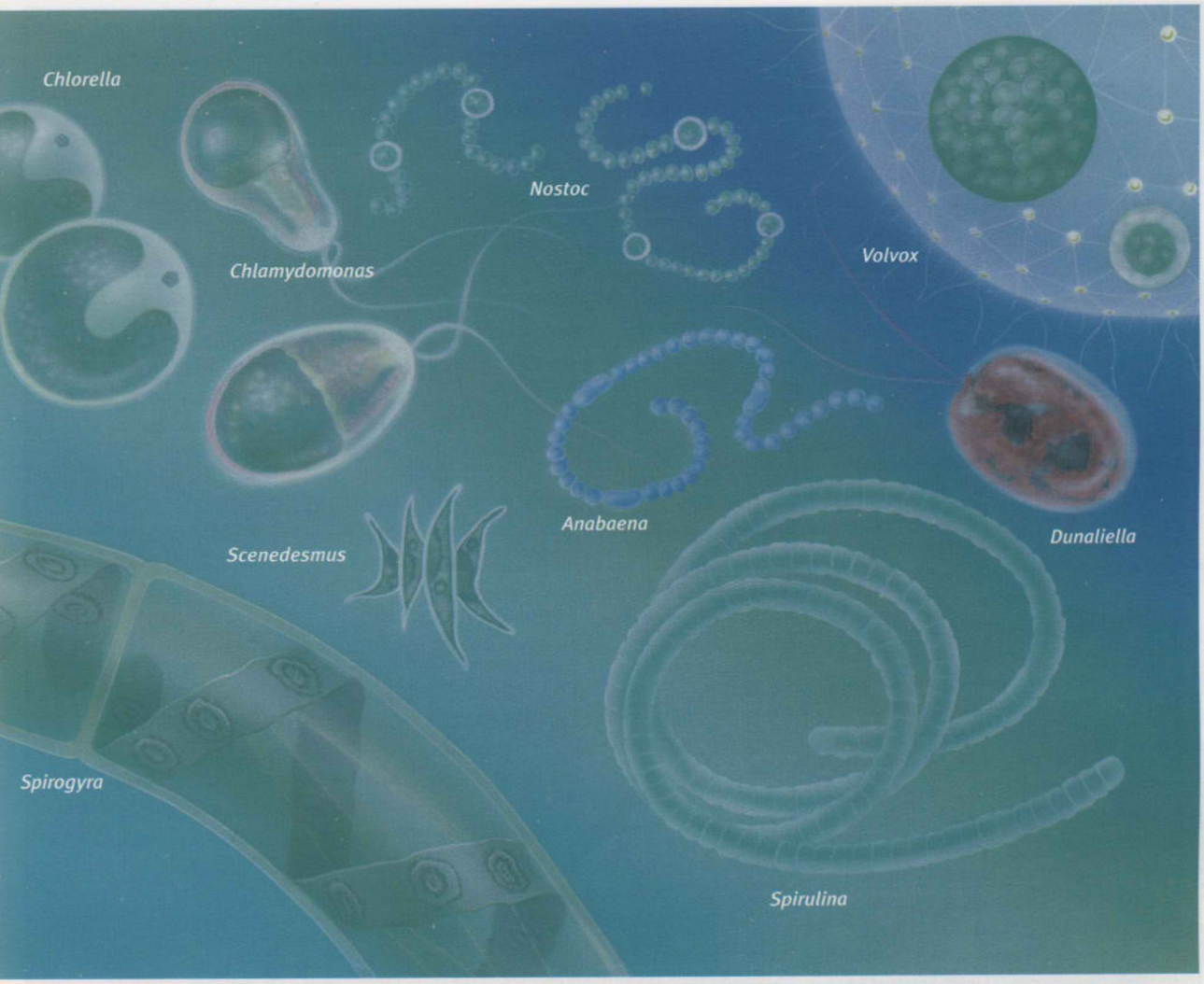


Fig. 7.9 Algas y cianobacterias.

bios (Cuadro 7.2). Las necesidades de proteínas de la humanidad aumentaron. Se contaba que en el futuro habría necesidades por hambre y, mientras tanto, se descubrió que los microorganismos no sólo pueden alimentarse de soluciones nutritivas que contienen azúcar, sino también de hidrocarburos del petróleo, los alcanos (parafinas), y de metanol. Los alcanos tipo ceras no los pueden aprovechar los humanos ni los animales, sólo los microbios pueden convertirlos en proteínas valiosas.

Los países de la Europa del Este se concentraron en la esperanza de obtener permanentemente petróleo barato de la levadura de alcano (*Candida*); en Occidente, sobre todo la empresa británica ICI, en las levaduras y bacterias que aprovechan el metanol (ver Cuadro 7.2 y Fig. 7.10). Los dos enormes proyectos esperanzadores acabaron por fracasar.

Las levaduras de alcano para piensos sólo se autorizaron de forma limitada, ya que se temía que contuviesen agentes cancerígenos. Ambos proyectos, tanto en Europa Oriental como Occidental, fallaron finalmente por motivos económicos debido a las dos crisis del petróleo. En Occidente, el pienso a base de metanol también falló a causa de las subvenciones de la UE, puesto que estas subvenciones convertían la leche desnatada en polvo en un aditivo para piensos increíblemente costoso.

Sin embargo, los biotecnólogos adquirieron una inestimable experiencia en la construcción y el funcionamiento de enormes biorreactores.

7.4 La micoproteína tiene éxito como proteína vegetal para el consumidor

Por el contrario, un producto con mucho éxito es la **micoproteína** (del griego *mykes*, hongo) de Rank Hovis McDougall (RHM), y actualmente de Marlowe Foods, una filial de ICI. RHM, el cuarto productor de alimentos de Europa Occidental, encontró su microbio en los años 1960 e invirtió más de 30 millones de libras esterlinas en el hon-

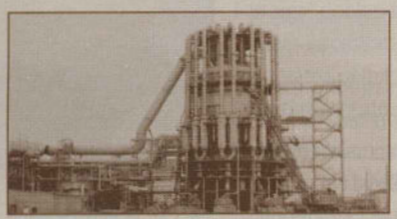


Fig. 7.10 La bacteria *Methylophilus methylotrophus* produce una proteína muy valiosa a partir del metanol.

Cuadro 7.2 Historia de la biotecnología: La proteína unicelular

En la Unión Soviética, en la década de 1960, bajo el mandato de Nikita Kruschev, envalentonados por un lado por los éxitos espaciales y por otro atormentados por las malas cosechas constantes, se inició un programa ambicioso para encontrar los mejores devoradores de alcanos. La idea era obtener proteínas valiosas a partir de petróleo barato.

Se buscaron también otras posibilidades en paralelo para degradar la celulosa de los bosques siberianos en azúcar y luego "usarlo en levadura" para obtener proteínas. En 1963 empezaron a funcionar las primeras instalaciones de prueba. En muestras de petróleo previamente purificadas crecieron cepas de levadura de la especie *Candida*, las cuales devoraron alcanos "con enorme apetito". Al iniciarse la producción de levadura a partir de los alcanos del petróleo hubo dudas por parte de médicos y veterinarios que opinaban que, debido a la difícil digestibilidad de los alcanos para los seres humanos y los animales, la proteína de la levadura de alcano podría ser problemática para seres vivos más complejos o incluso provocar cáncer. Si bien los experimentos rusos, de muchos años de duración, demostraron que la proteína de levadura probablemente se puede absorber en la cadena alimentaria de los humanos sin ningún peligro, en Occidente esto produjo un gran escepticismo (probablemente con razón). La primera gran fábrica de levadura de alcanos empezó a funcionar en la Unión Soviética en 1973, con una producción de 70 000 toneladas de levadura anuales. La instalación del complejo petroquímico de Schwedt, en la antigua RDA, punto final del oleoducto soviético *Drushba* (amistad), empezó a funcionar ininterrumpidamente a principios de 1986. Mediante reactores de chorro sumergido suministraba anualmente 40 000 toneladas del preparado alimenticio a base de levadura *Fermosin*®. Los biorreactores eran sin duda una obra maestra de los ingenieros y biotecnólogos germanoorientales. Después de la reunificación de Alemania, el proceso del *Fermosin*® se detuvo.



Biorreactor para levadura de alcanos (42 m de altura) en Schwedt, en la época de la RDA.

Pero también en Occidente fallaron los proyectos de la proteína (*single cell*): British Petroleum (BP) participó en 1971 en Cerdeña en la fabricación de *Toprina*®, un producto a base de levadura que crecía sobre restos de crudo, de la empresa italiana ANIC. Del fracaso del proyecto se culpó a los siguientes factores: la crisis del petróleo, el *lobby* de la soja que redujo los precios de ésta, la discusión sobre la inocuidad de *Toprina*® (elevado contenido en ácidos nucleicos, que provoca gota) y las dudas sobre el medio ambiente.



La factoría gigantesca de ICI junto a Billingham; biorreactores naturales en primer plano.

Al mismo tiempo, en Europa occidental se investigó con el consumo de metanol.
En un campo de rugby del condado británico de Durham, los biotecnólogos de la empresa británica Imperial Chemical Industries (ICI) tuvieron éxito: descubrieron la bacteria *Methylophilus methylotrophus* (Fig. 7.10).

Se estuvieron investigando y probando unos 10 000 microorganismos durante 13 años, en busca de uno que creciese rápidamente sobre materias primas petroquímicas y suministrase proteína concentrada para los animales domésticos: el resultado fue *Pruteen*®.
En primer lugar, ICI se concentró en el metano como fuente de carbono, ya que la compañía tenía acceso al gas abundante del Mar del Norte. Éste parecía ser un modo elegante de convertir la molécula orgánica más sencilla en una proteína compleja. Sin embargo, no sólo el peligro de explosión del metano, sino también su baja solubilidad y el problema de distribuirlo uniformemente en el medio, constituían argumentos contra el metano. Por el contrario, el metanol, es decir, el metano oxidado (o que contiene oxígeno), puede aplacar más fácilmente las necesidades de oxígeno de los microbios, es ilimitadamente soluble en agua y no provoca una liberación de calor tan elevada en el biorreactor.

Por consiguiente, los investigadores de ICI también se decidieron por la cepa *Methylophilus* (en latín, afín al metanol) porque era estable y carecía de efectos secundarios tóxicos. No obstante, la decisión de realizar un cultivo puro de las bacterias en un proceso continuo tuvo una consecuencia: ¡el proceso debía realizarse en unas condiciones extraordinarias de esterilidad! Al contrario, el proceso para obtener la levadura de alcano discurría sin necesidad de esterilidad, es decir, la cepa de levadura eliminaba por sí sola a todos los competidores –al igual que ocurre con la mayoría de procesos biotecnológicos para producir alimentos.

La empresa británica John Brown Engineers and Constructors construyó la gigantesca factoría de ICI en Billingham para el mayor bioproceso estéril del mundo. La biofábrica abarcaba una superficie de ocho hectáreas. El biorreactor, su núcleo, tenía una altura de 60 metros (con ocho fermentadores de columnas de burbujas) y contenía 150 000 litros de solución alimenticia absolutamente libre de gérmenes, en la cual viven las metanobacterias. Mediante un sistema ingenioso de 20 000 válvulas y filtros se mantuvo entre tres y cuatro meses libre de microbios extraños. El *Methylophilus* vive a 35 °C sólo de metanol, amoniaco y el oxígeno del aire. Continuamente se extraían microbios del biorreactor, se mataban con vapor de agua caliente, se hacían bolas con ellos formando grandes grumos y se dejaban secar. Así produjeron el producto granulado de color caramelo *Pruteen*®. Todo parecía funcionar perfectamente.



Uno de los biorreactores de ICI.

Cuando la factoría empezó a producir, en 1976, la empresa se tuvo que enfrentar a unos precios de la energía en aumento y a una cosecha de soja excelente; la proteína unicelular no se podía producir de forma tan económica. Por tanto, el *Methylophilus* se mejoró tanto por manipulación genética como por métodos de genética clásica: se aisló con éxito el gen para la enzima glutamato deshidrogenasa (para un consumo más efectivo de nitrógeno a partir del amoniaco). Se logró mejorar la producción de proteína entre un 5 y un 7%. La factoría de ICI funcionaba, pero la demanda fue inferior a las expectativas. No obstante, ICI considera los 100 millones de libras esterlinas invertidos hasta 1982 como "peaje de la biotecnología".

Pero las experiencias importantes desembocaron en la producción a gran escala de la proteína de hongo *quorn* (ver texto principal).

go, el cual se puede convertir en aceptables imitaciones de pescado, aves y carne (Fig. 7.13).

Los investigadores de RHM coleccionaron más de 3000 muestras de suelo de todo el mundo. No obstante, como suele suceder, el premio gordo estaba muy cerca: en las proximidades de la localidad de Marlowe, en Buckinghamshire, Inglaterra, se encontró ***Fusarium graminareum*** (actualmente *Fusarium venenatum*, Fig. 7.8). Previamente, su nombre sólo lo conocían los patólogos vegetales: el hongo pudre las raíces del trigo.

RHM producía entonces el 15% de la oferta británica de hongos comestibles. Debido a malas experiencias por prejuicios psicológicos de los consumidores contra las proteínas bacterianas, RHM dejó claro desde el principio que *Fusarium* es un hongo como nuestras setas comestibles y trufas, los cuales nos comemos sin pensarlo dos veces.

Aparte de que *Fusarium* casi no posee olor ni sabor (Fig. 7.11), siendo ideal como sucedáneo de la carne, contiene aproximadamente un 50% de proteína calculada en peso seco, como el bistec a la plancha. Sin embargo, el hongo tiene un contenido más bajo en grasa que el bistec, sólo de un 13%, y además se trata de grasa vegetal, no de colesterol (sino ergosterol), y un contenido en fibra del 25% –todo esto cuenta cada vez más para la gente que cuida su salud (Fig. 7.12).

Una ventaja principal en la obtención de hongos en lugar de células bacterianas es que típicamente poseen mayores dimensiones, es decir, se pueden separar con facilidad del medio de fermentación. Sin embargo, por otra parte, los hongos crecen mucho más despacio que las bacterias, tardando entre cuatro y seis horas en duplicar su tamaño, en comparación con los 20 minutos que tardan las bacterias. Esto también puede convertirse en una ventaja: un crecimiento más lento implica que el producto final contiene pocos ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos, ingeridos durante mucho tiempo y a elevadas concentraciones por mamíferos y seres humanos, producen gota.

Mientras que algunas bacterias contienen un 25% de ácidos nucleicos y las levaduras hasta un 15%, RHM logró reducir el contenido a menos del límite aceptable para el hombre, del 1%, con su nuevo alimento, la micoproteína. El hongo también contiene aminoácidos en su composición, lo cual recomienda la Organización Mundial para la Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) como "ideal".

Tal vez la característica más extraordinaria del hongo sea la manera en que puede convertirse en una gama de sucedáneos de alimentos, desde sopas a galletas, hasta imitaciones convincentes de aves, jamón y carne de ternera (Figs. 7.11 a 7.13).

La clave de esta capacidad de adaptación es la siguiente: la longitud de las fibras puede controlarse. Cuanto más tiempo "se permita" crecer al hongo en el biorreactor, más largas serán también las fibras y más áspera será la textura del producto. El medio consiste en jarabe de glucosa de origen hidrocarbonado con amoniaco como fuente de nitrógeno. El jarabe puede obtenerse a partir de todos los productos disponibles a base de almidón (patata, trigo, mandioca), y el proceso es mucho más eficaz que la transformación del almidón en proteína por parte de los animales domésticos.

ICI y RHM se dedicaron conjuntamente a la producción del hongo. En 1985, el MAFF (*Ministry of Agriculture, Fisheries and Food*) autorizó el producto en Gran Bretaña. El primer producto fue un pastel *Savory Pie*. En los años 1990 se fundó Marlowe Foods, en Marlowe. Mientras tanto, la proteína del hongo en Inglaterra se comercializa como *quorn*.

Si antes de 1993 el volumen de ventas era inferior a los tres millones de dólares americanos anuales, en 2001, gracias a la poderosa publicidad, ascendía a 150 millones. Los grupos de destino son interesantes: mujeres de edades comprendidas entre 25 y 65 años en Estados Unidos, y entre 25 y 45 años en Gran Bretaña. La



Fig. 7.11 Micoproteína antes del procesamiento. A la izquierda "ternera", a la derecha "pollo".



Fig. 7.12 Primera comida de prueba de micoproteína "refinada".



Fig. 7.13 Productos del *quorn* procedente del *Fusarium*: albóndigas y salchichas sin carne.

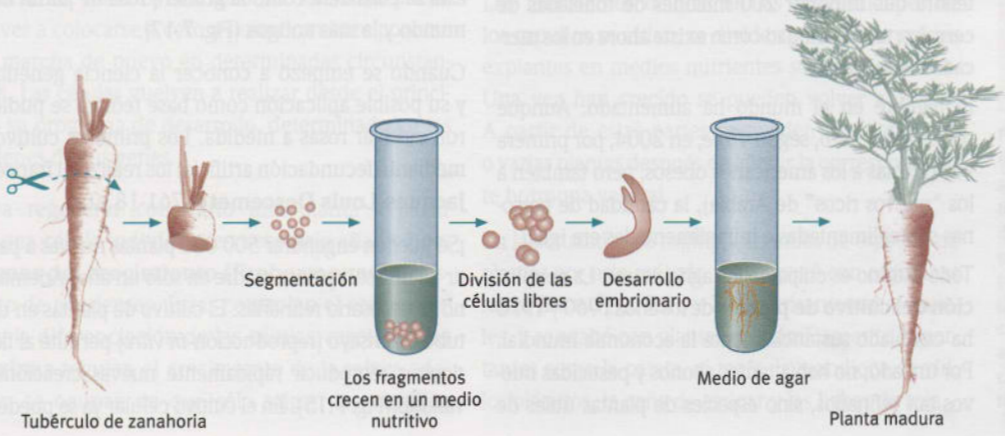


Fig. 7.14 Izquierda: cómo se pueden multiplicar las plantas *in vitro*.

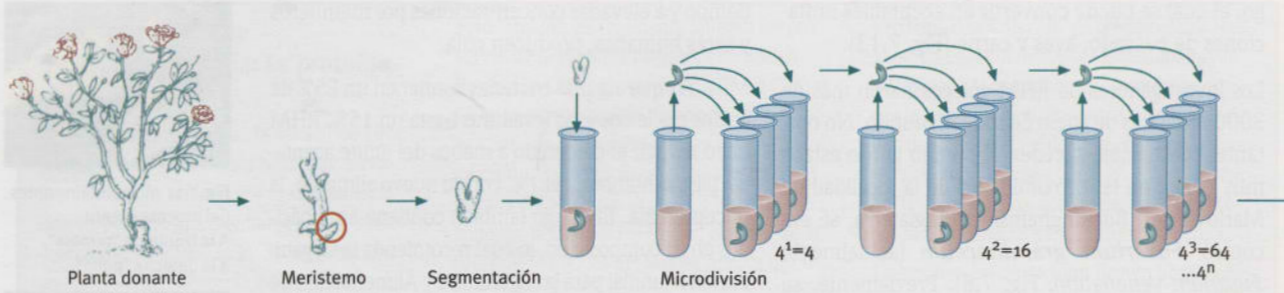


Fig. 7.15 Multiplicación *in vitro* de rosas.



Fig. 7.16 Una rosa de tubo de ensayo.







Fig. 7.17 Rosas: desde la rosa salvaje a las especies modernas.

generación anterior es precisamente conservadora, aunque la empresa habla de forma intencionada, e imprecisa, no de microbios, sino de "proteína vegetal".

En principio, casi cada país podría transformar sus reservas de hidratos de carbono en proteína fúngica: en Europa, los cereales y las patatas; en los países tropicales, la mandioca, el arroz o la caña de azúcar. Muchos países tropicales utilizan la alimentación tradicional a base de hongos, por ejemplo el *tempeh*, una mezcla de habas de soja y hongos (Cap. 1). Por consiguiente, no habría que superar tantas reservas psicológicas contra los alimentos procedentes del biorreactor.

7.5 ¡La biotecnología "verde" *ante portas*!

Arrancar malas hierbas, regar, abonar, convertir en compost, combatir insectos y hongos de la forma más ecológica posible, sólo son placeres para el jardinero aficionado. Por el contrario, para los granjeros constituyen verdaderos factores económicos que desearían minimizar de forma drástica.

¿Nos podrá alimentar la tierra en el futuro? En 1950, en África vivía la mitad de gente que en Europa; actualmente, el doble. Hoy, en todo el mundo hay que alimentar a más de 6000 millones de personas, y en 20 años a 8000 millones de personas. Los chinos comen hoy cuatro veces más carne que hace 20 años: 32 kilos por persona. El Instituto Worldwatch estadounidense pronostica que, en el año 2030, China tendrá que importar 200 millones de toneladas de cereales; tanta cantidad como existe ahora en los mercados mundiales.

El hambre en el mundo ha aumentado. Aunque parezca macabro, según *Time*, en 2004, por primera vez (gracias a los americanos obesos, pero también a los "nuevos ricos" de Arabia), la cantidad de personas sobrealimentadas e infraalimentadas era igual.

Todo esto no es culpa de los agricultores. La **revolución del cultivo de plantas** de los años 1960 y 1970 ha cambiado sustancialmente la economía mundial. Por un lado, no había tantos abonos y pesticidas nuevos tan refinados, sino especies de plantas útiles de elevado rendimiento, como el arroz y el trigo, que constituyeron una innovación. Sin embargo, el **aumento de la productividad** se tuvo que pagar caro: las nuevas especies cultivadas necesitan constantemente que se les apliquen **abonos y pesticidas**. Ahora, no obstante, los agricultores han recibido una serie de herramientas nuevas más poderosas que nunca. La nueva esperanza de combatir el problema de la alimentación mundial está germinando. La biotecnología promete a los agricultores integrar genes extraños en las plantas con la finalidad de mejorar la calidad: por ejemplo, alcanzar un contenido más elevado en proteínas, vitaminas o energía, así como desarrollar **resistencia** contra los "parásitos", las enfermedades y las heladas; hacerse resistentes a los suelos secos o salinos y a los herbicidas para controlar las malas hierbas. Además, crea la posibilidad de producir medicamentos, cosméticos y aditivos alimentarios mediante cultivos vegetales manipulados genéticamente (transgénicos), o también cultivos en laboratorio, independientemente de la agricultura.

7.6 El campo en un tubo de ensayo: cultivo de plantas *in vitro*

Las rosas son las flores preferidas por los floricultores, desde las de formas sencillas hasta las de apariencia artística. Sin embargo, la historia del **cultivo de rosas** es relativamente tardía, aunque ya lo conocían los persas y los medas en el siglo XII antes de nuestra era. En aquel entonces se cultivaba la *Rosa gallica*, y ésta se considera como la primera rosa de jardín del mundo y la más antigua (Fig. 7.17).

Cuando se empezó a conocer la ciencia genética y su posible aplicación como base teórica se pudieron cultivar rosas a medida. Los primeros cultivos mediante fecundación artificial los realizó el francés **Jacques-Louis Descemet** (1761-1839).

¡Se pueden engendrar 500 000 plantas nuevas a partir de una sola planta madre en sólo un año! Además, no es necesario refinarlas. El cultivo de plantas en un tubo de ensayo (reproducción *in vitro*) permite al floricultor reproducir rápidamente nuevas creaciones valiosas (Fig. 7.15). En el cultivo celular ya se pueden



seleccionar características específicas, como la resistencia a las enfermedades y a los herbicidas.

Si se trata de una **planta híbrida** (cruce de diferentes especies o razas entre sí) hay que renunciar a la reproducción sexual mediante semillas, ya que la descendencia se desdobla según las leyes de Mendel. Hasta ahora, el único recurso que quedaba era la **reproducción vegetativa** –tal como la conocemos de forma tradicional por los vástagos de fresas o mediante esquejes. Sin embargo, no todas las plantas se pueden reproducir tan fácilmente por el modo vegetativo.

La **microrreproducción** es mucho más rápida y más efectiva que la reproducción por esquejes o vástagos que se realizaba hasta ahora. ¿Cómo es posible regenerar una planta completa a partir de células individuales? Esto puede realizarse gracias a la **totipotencia** de las células vegetales, sobre todo de las células de raíces y brotes: cada célula contiene todo el conjunto de cromosomas completo y también toda la información genética necesaria para que se desarrolle un individuo a partir de una célula. Según la función que asumen las células individuales y las uniones de células durante el desarrollo y en el organismo completo, se aprovechará solamente una parte específica de la información genética. La parte restante no se leerá.

A diferencia de las células animales, algunas células de muchas plantas dicotiledóneas pueden **desdiferenciarse**. Su reloj biológico de desarrollo puede volver a colocarse a cero y posteriormente ponerse en marcha de nuevo en determinadas circunstancias. Las células vuelven a realizar desde el principio su programa de desarrollo, determinado en las órdenes de sus genes.

Para regenerar con éxito una planta a partir de una célula individual es necesario añadir **hormonas del crecimiento (fitohormonas)** al sustrato de nutrientes. Éstas controlan el crecimiento y la diferenciación de las células vegetales: las **auxinas** regulan el crecimiento de la raíz y, además, se ocupan de que sólo salgan los capullos situados en la parte más alta de una planta. Por el contrario, las **citoquininas** inducen el crecimiento de los brotes e inhiben de este modo el crecimiento de la raíz. La proporción entre citoquininas y auxinas es decisiva.

En un metro cuadrado de laboratorio se pueden engendrar 100 000 plantitas nuevas (Fig. 7.15). Así se pueden multiplicar rápidamente plantas, procediendo todas ellas de células de una sola superplanta. Estos descendientes de una única planta se denominan **clones** –del griego *klon*, que significa tanto vástago como rama. El clon tiene –como los gemelos univitelinos– el mismo factor hereditario. Posteriormente volveremos a ocuparnos de este tema con los animales transgénicos (Cap. 8).

Según el tipo de célula del material de partida se establece una diferencia entre cultivos de meristemos y haploides, según el tipo de cultivo: el de callos y el cultivo en suspensión.

7.7 El cultivo de meristemos

El método moderno más importante de clonación de plantas es el cultivo de meristemos, en el cual se utilizan **tejidos divididos (meristemos)** de las plantas (brote, raíz o capullos axilares) (Fig. 7.21).

Los meristemos son tejidos divididos que se encuentran en diferentes lugares de la planta. Los más importantes son los **meristemos de los brotes**. Los meristemos ocultos en las profundidades de los capullos se aíslan, se dividen y se conservan los explantes en medios nutrientes sólidos o líquidos. Una vez han crecido se pueden volver a dividir. A partir de estas partes se pueden regenerar una o varias plantas después de añadir la correspondiente hormona vegetal.

En la actualidad se multiplican miles de especies de plantas por este método. Se empezó con orquídeas raras, lirios (Figs. 7.18 y 7.19), crisantemos y claveles, y se acabó con plantas económicamente importantes como la patata, el maíz, la mandioca, la vid, los plátanos, la caña de azúcar y las habas de soja.



Fig. 7.18 La mayoría de nuestras plantas decorativas se ha generado por microrreproducción.



Fig. 7.19 Las orquídeas también se reproducen masivamente *in vitro*.



Fig. 7.20 La palmera oleífera (*Elaeis guineensis*) suministra aceite de palma, el cual contiene ácidos grasos saturados. En Asia se destinaron extensiones enormes a plantaciones de monocultivo de palmeras generadas en cultivo celular y "mejoradas", a costa de las zonas selváticas tropicales, lo cual es objeto de fuertes críticas.

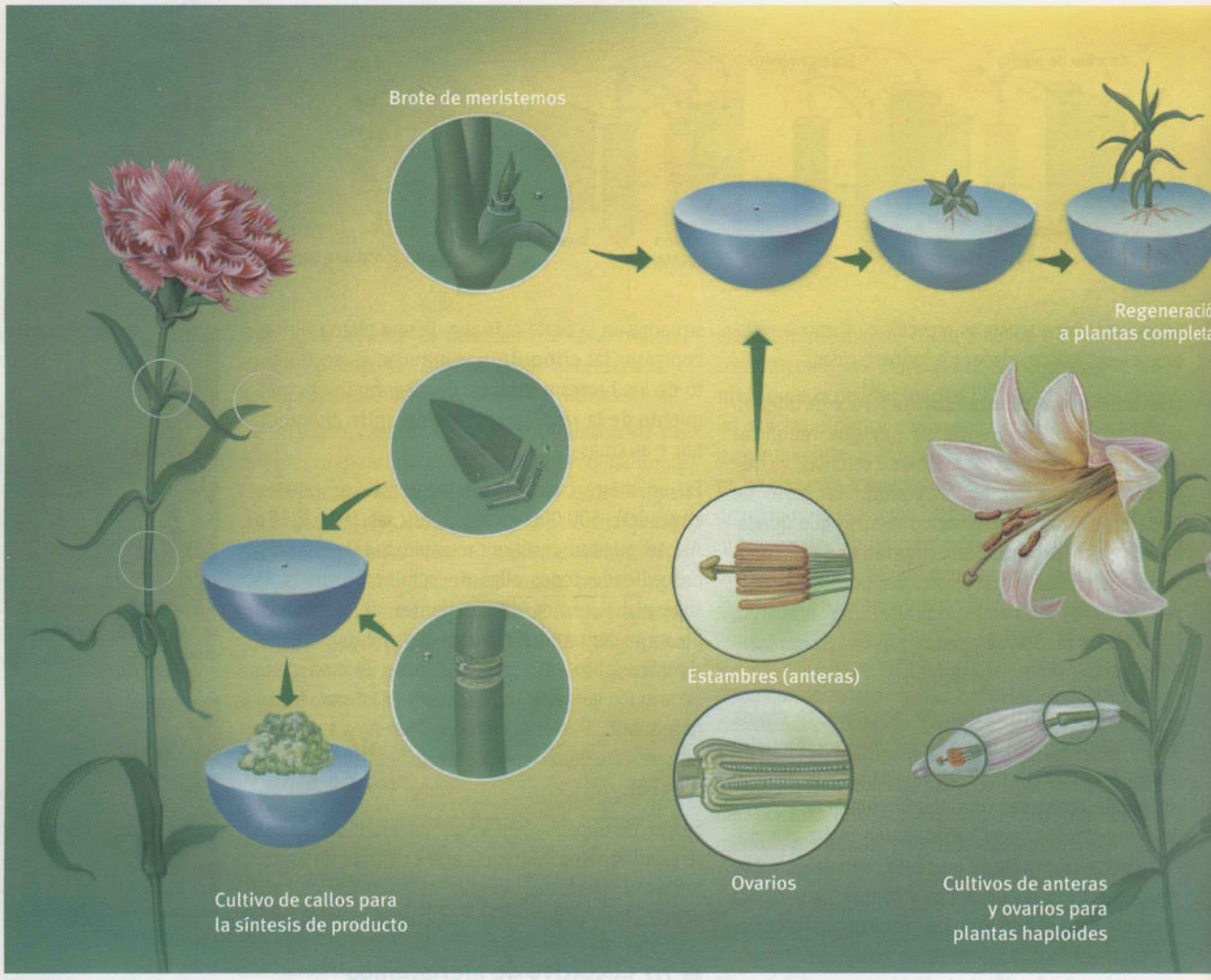


Fig. 7.21 Cultivo de meristemos (izquierda) y de anteras/ovarios (derecha).



Fig. 7.22 Un ejemplo de ataque de virus deseado: una hoja de *Abutilon* con las características manchas del mosaico.



Fig. 7.23 El símbolo de Hong Kong, la *Bauhinia*. Aquí se pueden ver claramente las anteras.

Las palmeras oleíferas (Fig. 7.20) extremadamente productivas de Malasia se reproducen desde los años 1960 por cultivo celular. No sólo producen un 30% más de aceite de palma que las palmeras normales, sino que también son claramente más pequeñas, lo cual facilita su recolección. Sin embargo, el monocultivo exagerado de palmeras supone una amenaza para las últimas selvas que quedan en Asia.

En el caso de las fresas, la reproducción vegetativa clásica mediante vástagos proporciona como máximo diez plantas de vástago. Por el contrario, con el cultivo de meristemos moderno se pueden obtener teóricamente hasta 500 000 plantas al año a partir de una planta madre.

Además, hay que tener en cuenta una ventaja definitiva: aunque la planta de partida haya sufrido el ataque de un **virus**, los descendientes vegetativos pueden crecer exentos de virus (Fig. 7.21). Para la reproducción sólo se eligen partes de plantas que no tienen virus. El tejido de los meristemos que se divide rápidamente parece "escapar" a la propagación de los virus. Por consiguiente, suele contener pocos virus. No obstante, a veces, los virus vegetales son incluso bienvenidos: el virus del mosaico *Abutilon* crea hojas interesantes en esta planta de interior (Fig. 7.22), y el virus *Poty* produce hermosos tulipanes flameados.

Los meristemos se cortan, se cultivan y se enraízan (Fig. 7.21). Se repite el ciclo completo hasta que se encuentran meristemos sin virus que luego producirán plantas exentas de virus. Sin embargo, éstas no son inmunes a un nuevo ataque de virus cuando se plantan en la naturaleza. Los cultivos de meristemos han revolucionado la jardinería. Se calcula que el mercado mundial asciende a más de 3000 millones de dólares americanos.

7.8 Cultivos haploides: anteras y ovarios

Los estambres (**anteras**, Fig. 7.23) constan de unos pocos gametos masculinos que son haploides,

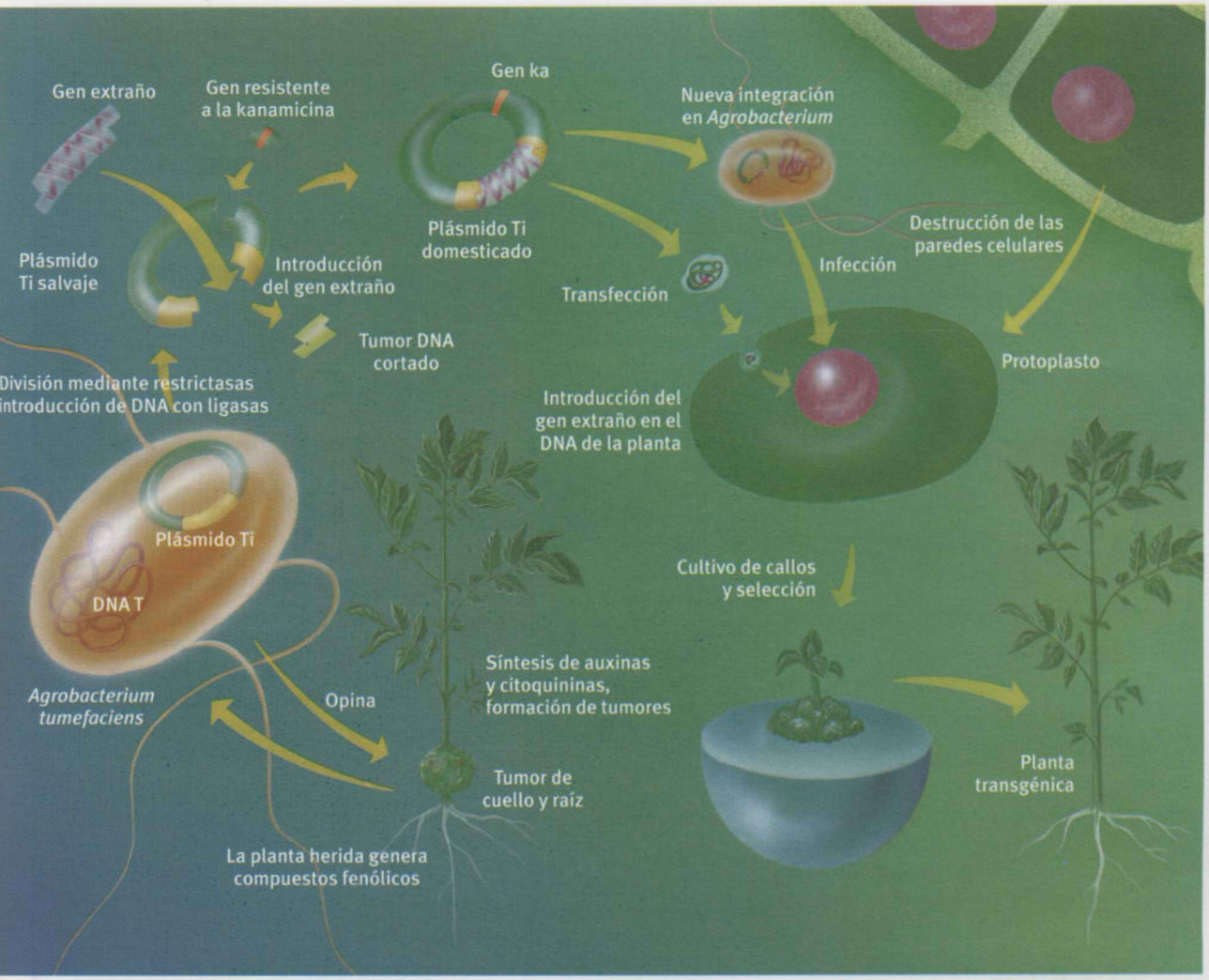


Fig. 7.24 Cómo se obtienen plantas transgénicas con *Agrobacterium*.

es decir, sus núcleos celulares sólo contienen un juego de cromosomas.

Cuando las anteras jóvenes se extraen estériles de la flor y se colocan en un medio nutriente (agar), crecen hasta convertirse en plantas haploides estériles completas.

Estas plantas son codiciadas para el cultivo porque, a partir de ellas, se pueden obtener en poco tiempo líneas diploides homozigóticas mediante la duplicación experimental de su juego de cromosomas con la ayuda del "veneno mitótico" colchicina. Las mutaciones recesivas no quedan cubiertas por el segundo cromosoma existente en los diploides y, de este modo, se ven de inmediato. ¡Enhorabuena a los cultivadores!

A partir de los **ovarios** (Fig. 7.21) también se pueden generar plantas completamente haploides, como en los cultivos de anteras. Los cultivos haploides se utilizan en la agricultura de tabaco, colza, patatas, cebada y plantas medicinales.

7.9 Cultivos de callos y en suspensión

Los tejidos dañados que crecen de forma desorganizada se conocen en las plantas como **callos**. En las plantas se forman en la superficie cortada de los esquejes. Los callos se pueden introducir en agar como cultivos superficiales para luego seguirlos cultivando como grumos celulares no diferenciados, o bien, añadiendo fitohormona, se obtienen de nuevo plantas completas (Fig. 7.25).

Una posibilidad especial de la reproducción vegetal la ofrecen los **protoplastos**, que son células de las que se han extraído las paredes celulares (Fig. 7.26). De las hojas se cortan franjas que se introducen en una disolución con enzimas que destruyen las paredes celulares (pectinasas, celulasas). Las células "desnudas" que se obtienen de esta forma, los protoplastos, se trasladan a un medio de cultivo donde sus paredes celulares se regeneran. Las células provistas de pared que se vuelven a obte-



Fig. 7.25 Tabaco en cultivo de callos.

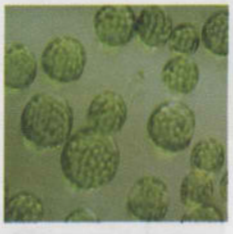


Fig. 7.26 Protoplastos.

Cuadro 7.3 Historia de la biotecnología: La "tomatata" y el lápiz de labios biológico



¡Un deseo soñado: la "tomatata" o "tomata", "producida" experimentalmente por el autor en sólo diez minutos!

Una posibilidad de modificar células vegetales de forma biotecnológica es la fusión de protoplastos. Se funden entre sí células de protoplastos "desnudas" mediante productos químicos como el polietilenglicol o mediante impulsos eléctricos. Ya se han logrado realizar cruces entre especies sólo emparentadas lejanamente de forma taxonómica (híbridos somáticos), mientras que no era posible realizarlos por métodos de cruzamiento naturales.



La verdadera "tomatata" (centro), producida en el Instituto Max Planck de investigación de cultivos de Colonia. Izquierda: tomate; derecha: patata salvaje.

El primero fue la "tomatata" o "tomata", un cruce de patata y tomate: en la parte superior de la planta debían madurar tomates y en los retoños subterráneos tubérculos de patata. El experimento lo logró realizar con éxito por primera vez en 1977 **Georg Melchers,** en el Instituto Max Planck de biología de Tübingen. Sin embargo, la "tomatata" no produjo patatas auténticas ni tampoco tomates auténticos. Las causas posibles podrían ser que en tales híbridos "no naturales" las divisiones celulares funcionan de forma atípica. En el Instituto Max Plank de investigación de cultivos de Colonia, **Inca Lewen-Dörr** y la empresa Green Tec desarrollaron una "tomatata" en 1994. Las plantas eran "vigorosas". Lo curioso era la flor amarilla de la "tomatata" en un fenotipo que, en todo lo demás, era muy similar al de la patata. Normalmente, en las patatas la flor no es de color amarillo (Fig. 7.1).

La hibridación somática es enormemente adecuada para fines de mejora genética y también se utiliza de forma práctica, por ejemplo, en el *Citrus* o la achicoria. Siempre es el método elegido cuando se necesita transferir ciertas características complejas poligenéticas, como por ejemplo la resistencia a las heladas (ya realizado para las patatas) o los colores de las flores, de un tipo salvaje a un tipo cultivado.

Existe una gran probabilidad de que las sustancias características que componen las patatas y los tomates, al mezclarse, hagan que el alimento no pueda comerse. Aunque tanto las patatas como los tomates pertenecen a las solanáceas (*Solanaceae*), es decir, a la misma familia de plantas, se producen grandes problemas.

Shikonina

«Una barra de labios convincente y sin química, hecha de colorante puramente biológico, ya conocida en la antigua medicina china –para las mujeres modernas. ¡Un producto japonés de alta tecnología!»

La barra de labios biológica fue la estrella del mercado de la cosmética: en pocos días, en 1985 se vendieron en Japón dos millones de unidades, a pesar del "precio orgulloso" de 3500 yen. El anuncio publicitario correspondiente utilizó el resentimiento de los japoneses contra los productos químicos, su conciencia de la tradición y el orgullo que sienten por sus rendimientos en tecnología punta. El colorante rojo de la barra de labios es un producto biológico auténtico: la shikonina (un compuesto de la naftoquinona), un medicamento utilizado durante siglos en la antigua medicina china que se obtenía con dificultad de las raíces de la planta de la shikonina (*Lithospermum erythrorhizon*). Se tardan entre tres y siete años hasta que la planta ha concentrado como máximo un 2% del principio activo en sus raíces. En la medicina tradicional se utilizó shikonina contra las enfermedades bacterianas y las inflamaciones. Los japoneses importaban anualmente de China y Corea del Sur diez toneladas de materia prima de shikonina a unos 4500 dólares el kilo. Para un producto tan caro valía la pena intentar cultivar las células vegetales que producen shikonina en una solución nutritiva. La empresa de Tokyo Mitsui Petrochemical Industries Ltd. lo consiguió con gran éxito.

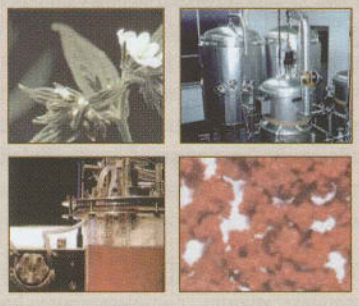
La idea genial de ventas la tuvieron después los directores de la empresa de cosméticos Kanebo: el espléndido color es enormemente adecuado para barras de labios y polvos (colorete). El truco era que el color no sólo se producía de forma biológica sino que, además, ¡protegía contra las bacterias y actuaba como antiinflamatorio!



El lápiz de labios biológico de Kanebo, un breve éxito de ventas.

En primer lugar se cultivaron líneas celulares de células de *Lithospermum* que producían un mayor contenido en shikonina, del 12 al 15% (peso en seco). Se cultivaban las células en un medio de crecimiento y se mantenían después en un medio de producción. Optimizando el medio de fabricación, la productividad aumentaba 13 veces.

Hoy se cultivan células de *Lithospermum* a escala industrial en un biorreactor de 200 litros con medio de crecimiento, y luego se trasladan a un reactor más pequeño con un medio que estimule la producción de shikonina. Con estas células se inyecta un biorreactor de 750 litros en el que se produce shikonina. Seguidamente, las células de la raíz generan un 23% de shikonina en sólo 23 días. Se vuelve a comparar esto con la naturaleza: ¡sólo un 2% en un periodo de tiempo de tres a siete años! En cada proceso completo del biorreactor parece que se obtienen aproximadamente cinco kilos de shikonina pura. En un principio, Mitsui logró producir aproximadamente 65 kilos de shikonina al año para unas necesidades de 150 kilos en Japón.



Grupos de células de *L. erythrorhizon* de cultivos con medio M9, de color rojo por su contenido en shikonina.

ner de esta forma generan pequeños callos mediante divisiones continuas. Añadiendo hormonas, en los callos se inducen pequeños brotes que con otras hormonas se enraízan. A partir de una única hoja se pueden obtener miles de plantas completas nuevas con el cultivo de protoplastos (Fig. 7.21).

Puesto que a los protoplastos aislados les falta la pared celular, pueden unirse entre sí con relativa facilidad mediante **fusión celular** (química) o mediante campos eléctricos (electrofusión) (como en las células de híbridos con polietilenglicol, Cap. 5).

Seguidamente, las células fusionadas se pueden extraer como plantas híbridas somáticas. Esta **hibridación somática** produjo en 1977 la "tomatata" o "tomata" (mezcla de tomate y patata), por desgracia no comestible (Cuadro 7.3). Incluso aunque la "tomata" hubiese tenido éxito, habría sido difícil suministrar a la vez dos reservas de sustancias nutritivas, a saber, bulbos y frutas. Sin embargo, la unión de células de dos tipos de estramonio (*Datura*) constituyó un éxito práctico. La nueva especie de estramonio produjo más alcaloides (escopolamina) que cualquiera de las especies de partida, y creció mejor.

7.10 Las células vegetales en un biorreactor producen principios activos

Para producir sustancias vegetales en un reactor no se necesitan partes de plantas diferenciadas; basta con un "grumo celular", un callo que sintetiza las sustancias que contienen los vegetales.

Si se aíslan fragmentos de tejido de una planta, se pueden cultivar sin límite en medios nutrientes totalmente sintéticos. En primer lugar se esteriliza un trozo de un órgano de la planta, y seguidamente se extrae del interior una parte y se cultiva en un suelo nutriente rico en agar de tipo gelatinoso. El suelo nutriente debe contener sales alimenticias, un azúcar como fuente de energía, algunas vitaminas y también hormonas. Si se ha encontrado la combinación correcta para un cultivo celular determinado, se formará un callo. En ese momento se puede transferir este tejido calloso a un medio nutriente líquido. Si se agita el cultivo para proporcionar el oxígeno suficiente, las células vegetales se seguirán multiplicando (Fig. 7.21).

Dichas células se pueden cultivar también en grandes biorreactores de muchos metros cúbicos de capacidad. Si las condiciones de cultivo son adecuadas, las sustancias existentes en las plantas se enriquecen y luego se pueden aislar, por ejemplo liofilizando todo el material celular y extrayéndolo con un disolvente adecuado. Sin embargo, no todas las plantas producen "voluntariamente" sus componentes de elevada complejidad en cultivo celular.

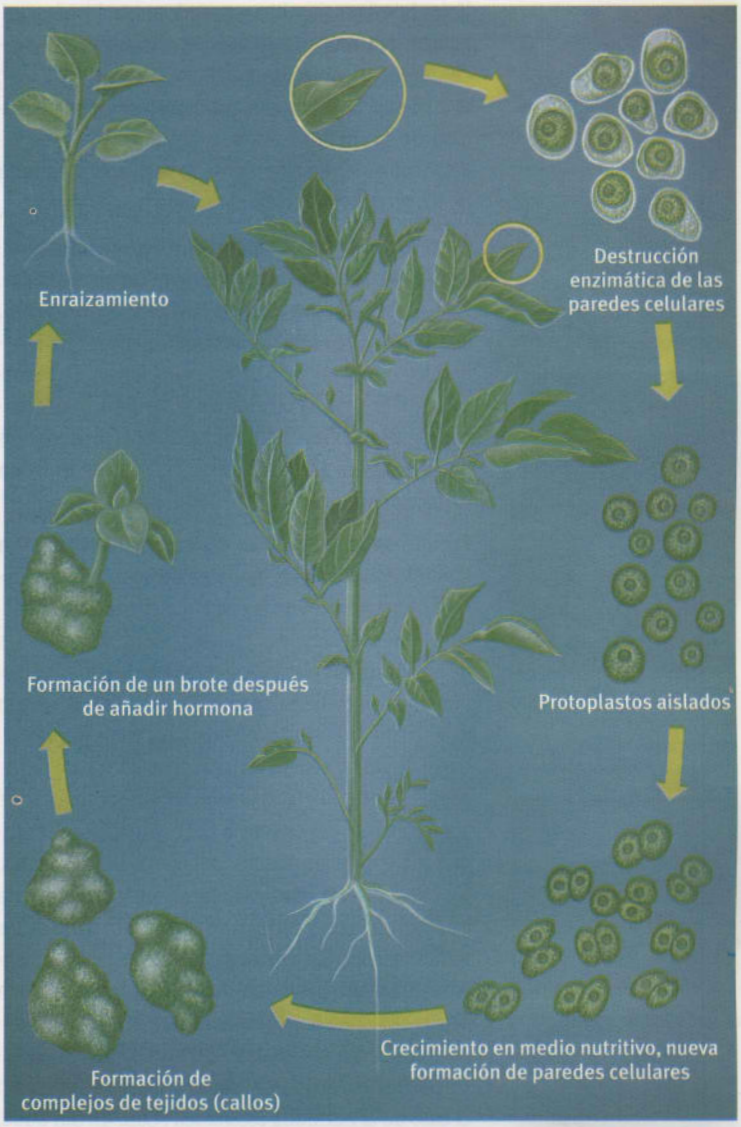


Fig. 7.27 Principio del cultivo de protoplastos.

En la Universidad de Tübingen, el grupo de **Lutz Heide** utilizó dos genes de la biosíntesis de la ubiquinona de *E. coli* y un gen del metabolismo vegetal (HMG-CoA reductasa) para transformar la planta de la shikonina *Lithospermum erythrorhizon* (Cuadro 7.3). En los cultivos celulares de *Lithospermum*, mediante la expresión de estas enzimas se influencian de forma selectiva diversas etapas de la biosíntesis en la producción biotecnológica del medicamento y colorante **shikonina**.

La shikonina se ha hecho popular (Cuadro 7.3.) gracias al lápiz de labios biológico. ¿Le seguirán otros productos vegetales que salgan del biorreactor?



Fig. 7.28 La dedalera púrpura (*Digitalis purpurea*) proporciona sustancias medicinales efectivas para el corazón.



Fig. 7.29 A partir de la corteza del sauce (*Salix*) se obtuvo el antipirético ácido salicílico (Cap. 9).



Fig. 7.30 *Catharanthus roseus* proporciona medicamentos contra el cáncer.







Fig. 7.31 Eckard Wellmann (Universidad de Freiburg) fue el primero que tuvo éxito con el cultivo *in vitro* de la *Huperzia* (arriba). Especies de *Huperzia* chinas colgando de un armario de productos de medicina tradicional china (TCM).

Ya los hombres primitivos, cazadores y nómadas, utilizaban **plantas curativas**, como la corteza de sauce que contiene ácido salicílico (*Salix*) (Fig. 7.29), el cual baja la fiebre, o plantas que aceleran la curación de las heridas. Incluso hoy día, en la era de los medicamentos sintéticos, no se puede prescindir de los productos vegetales en la farmacoterapia.

Entre los más importantes se encuentran los esteroides (la **diosgenina** procedente de la raíz de ñame, Cap.4), la **codeína** (tranquilizante y antitusígeno), la **atropina** (para dilatar la pupila cuando se examinan los ojos y en caso de intoxicaciones), la **reserpina** (para bajar la presión de la sangre), la **digoxina** y la **digitoxina** (tónicos cardiacos) procedentes de la dedalera (*Digitalis*, Fig. 7.28), y la **quinina** (medicamento contra la malaria, aromatizante).

Los inconvenientes de los **procesos de obtención tradicionales** son los siguientes: disponibilidad limitada, fluctuaciones en la calidad, peligro de putrefacción de especies de plantas raras, necesidades de espacio de las plantaciones (tala de bosques húmedos, muy poca tierra para la agricultura), aparición de enfermedades de las plantas y parásitos (monocultivos), impurezas debidas a los productos para proteger las plantas, metales pesados procedentes del aire contaminado, dependencia del contenido en principios activos de las plantas, del clima, las tormentas, las estaciones, la edad y la ubicación, y dependencia de crisis políticas y cárteles de precios por parte de los terratenientes. Sin embargo, el último inconveniente mencionado solamente se presenta, en la mayoría de los casos, en los consorcios farmacéuticos multinacionales, los cuales, con toda probabilidad, se saben defender muy bien –como se ha demostrado en el caso de la hormona esteroidea (Cap. 4). Sin duda, los temores de los países en vías de desarrollo, cuyas exportaciones a menudo dependen de productos vegetales, están justificados: para ellos se trata literalmente de su supervivencia física.

Las plantas superan con diferencia todo lo que puedan sintetizar las manos de los químicos hasta un futuro predecible. Se cuenta con decenas de miles de moléculas extremadamente complejas. Todas estas sustancias han surgido, obviamente, a causa de la presión de selección de animales y microbios; muchas de ellas van dirigidas también contra los seres de sangre caliente. Por lo tanto, es de suponer que existe un tesoro enorme de sustancias interesantes para la farmacología, que espera con impaciencia a ser desenterrado. Sólo se ha investigado una pequeña parcela del mundo vegetal hasta el momento, y en parte sólo con métodos anticuados y ampliamente superados e insuficientes para detectar los principios activos. Hay que temer que con la tala de los bosques tropicales también se extinguirán especies de plantas antes de poder probar sus aplicaciones. Puesto que la síntesis química de los principios activos o bien no es posible todavía o es muy costosa, los productos naturales obtenidos a partir de las plantas no se van a sustituir en la farmacoterapia.

Para poder garantizar y ampliar este suministro en un futuro, se deberá considerar la obtención de principios activos vegetales con la ayuda de la técnica de los cultivos celulares.

7.11 ¿Qué principios activos vegetales seguirán a la shikonina?

Para los investigadores de cultivos celulares, la siempreviva de Madagascar (*Catharanthus roseus*) (Fig. 7.30) es un objeto de investigación agradecido, ya que contiene una serie de principios activos, entre ellos los alcaloides del bisindol **vinblastina** y **vincristina**, de estructura extremadamente compleja y prácticamente inaccesibles en forma sintética. Ambos principios activos cuestan varios miles de dólares por kilo y se importan de países tropicales en vías de desarrollo.

A partir de la dedalera (*Digitalis*, Fig. 7.28) se pueden aislar en cultivo celular los cardioglicósidos esteroides **digoxina** y **digitoxina**. Desde el punto de vista terapéutico son interesantes, sobre todo, la digoxina y sus derivados. La digoxina se diferencia de la digitoxina únicamente por tener un grupo hidroxilo más.

Eckard Wellmann, de la Universidad de Freiburg (Fig. 7.31), en colaboración con nuestro grupo de Hong Kong logró producir una sustancia enormemente interesante en cultivo celular, que utilizan los chinos desde tiempo inmemorial contra la pérdida de memoria.

Hoy conocemos esta afección como **enfermedad de Alzheimer.** El licopodio *Huperzia* crece muy lentamente en las montañas chinas; necesita entre ocho y diez años, y prácticamente los recolectores casi lo han hecho desaparecer para obtener la codiciada **huperzina A.** Ahora se ha podido obtener por primera vez la huperzina A en cultivo celular. Si se logra el cultivo a gran escala, se podrá fabricar huperzina A en grandes cantidades y a un precio ventajoso.

Los cultivos celulares de plantas han demostrado ser el método de elección para sustancias de elevado valor cuando su fabricación sintética es demasiado costosa o no es posible su fabricación microbiana (ver Cuadro 7.3).

Y no menos importante es el hecho de que es de esperar que presten una contribución importante

a la protección de especies de plantas raras y ahorren superficies de cultivo valiosas que se necesitan urgentemente para los vegetales alimenticios.

7.12 *Agrobacterium* –Un parásito como ingeniero genético

Si se pueden cultivar células vegetales como microorganismos en caldos de cultivo, ¿por qué no se debería poder modificarlas también genéticamente (Cap. 3)?

Cultivar plantas que sean resistentes a la sequía, a los insectos y a los productos protectores de las plantas, y que crezcan en suelos salinos y contengan más proteínas y sustancias nutritivas, son los objetivos de los ingenieros genéticos en plantas.

Los ingenieros genéticos "naturales" son bacterias del tipo ***Agrobacterium tumefaciens***, las cuales viven en el suelo y cuando hay lesiones provocan proliferaciones de tipo canceroso (tumores de cuello y raíz) en las plantas dicotiledóneas. Este descubrimiento ya se hizo en el año 1907.

Las bacterias se ven atraídas por elicitores –moléculas que se liberan cuando hay una herida. Poseen un gran plásmido (una doble cadena de DNA en forma de anillo –ver Cap. 3– de una longitud de 200 a 800 kilobases), que provoca el tumor y, por tanto, se denomina **plásmido Ti** (del inglés, *tumor inducing*). El parásito es, por consiguiente, adecuado como "caballo de Troya" o vector para genes extraños (Fig. 7.24).

Los plásmidos Ti son portadores de genes para el consumo de opinas y la formación de fitohormonas. Las **opinas** son aminoácidos especializados que se forman en las células atacadas y sólo pueden ser utilizados por *Agrobacterium*. Por ello, la bacteria programa también la célula de la planta en su propio beneficio. La **auxina** y la **citoquinina**, las fitohormonas, estimulan el crecimiento y la división celular de las células transformadas en el tumor de cuello y raíz. Además, los plásmidos Ti son portadores de genes para identificar células dañadas y movilizar y transferir el **DNA- T** a la planta. Después de la transferencia, el DNA de transferencia se integra en el DNA vegetal del núcleo celular. Éste es un ejemplo poco frecuente de una transferencia genética de un procariota a un eucariota.

En 1983, **Marc von Montagu** y **Jeff Schell** (1935-2003) (Figs. 7.32 y 7.33), en Gent (Holanda), y **Robert Fraley** en el Condado de Monsanto (St. Louis, Estados Unidos), presentaron por separado un método revolucionario.

Ellos "debilitaron" a los plásmidos Ti "salvajes" implantando un gen extraño en el DNA-T de un tamaño de 15-30 kb. Se eliminaron los genes de fitohormonas y de opinas para dejar espacio a la integración del DNA extraño; al mismo tiempo, ya no aparecían proliferaciones. Es decir, a partir de tejidos cancerosos se pueden regenerar plantas completas sólo con esfuerzo.

En el **plásmido Ti "domesticado"** se puede integrar cualquier tipo de genes extraños, como por ejemplo para la resistencia a los herbicidas y los antibióticos. Además del gen extraño se introducen genes resistentes a los antibióticos (la mayoría para la kanamicina o la ampicilina), a fin de poder seleccionar posteriormente las células "eficaces" con facilidad (Fig. 7.24).

Los plásmidos recombinantes se pueden introducir directamente en las células vegetales "desnudas", es decir, en los protoplastos, o bien se vuelven a implantar en *Agrobacterium*, el cual a continuación infecta células vegetales intactas. Este último es el método estándar.

Se incuban trozos de hojas en una suspensión de células recombinantes de *Agrobacterium*. Seguidamente, añadiendo hormonas se induce la formación de brotes. Las bacterias se matan añadiendo antibiótico y se seleccionan las plantas que se han logrado transformar en un medio con kanamicina. Las células resistentes a la kanamicina (Cap. 3) también deberán contener el gen extraño. Seguidamente se induce el crecimiento de las raíces y las plantas se regeneran. En este momento ya no se forman más tumores de cuello y raíz, pues faltan los genes DNA-T para producir auxina, citoquina y opina.

En realidad, el proceso es aún más refinado: se hacen interactuar y recombinar los plásmidos recombinantes con plásmidos Ti intactos en células de *Agrobacterium*, en lo que se denomina "sistema binario o de dos vectores". Los vectores binarios permanecen en las células de *Agrobacterium* como vectores independientemente replicantes (¡ver más abajo los experimentos *antisense* del "tomate antifofo"!).

7.13 Transferencia genética biolística: un disparo de DNA

Sin embargo, no todas las plantas se pueden transformar por esos medios. Las **monocotiledóneas** casi no resultan infectadas. ¡Pero precisamente las

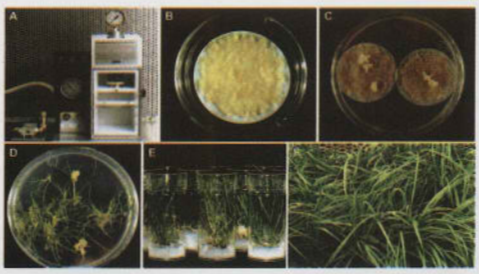




Fig. 7.32 Marc van Montagu, uno de los padres de la ingeniería genética de plantas.



Fig. 7.33 Jeff Schell (1935-2003), pionero de la biotecnología "verde".



Fig. 7.34 El actor de cine Hans Albers en la película de UFA "Münchhausen", cabalgando sobre la bola del cañón. Al igual que el barón Münchhausen sobre la bola, el DNA se dispara a las células en la transferencia genética biolística.

Fig. 7.35 (a la izquierda, abajo) Transferencia biolística en el césped "turf". Zeng-yu Wang, de la Fundación Samuel Roberts Noble, de Oklahoma, transfirió genes por transferencia genética biolística a una especie de cañuela ovina (*Festuca*). A: el aparato PDS/1000 para microproyectiles. B: suspensión celular antes del bombardeo. C: callos tras la selección de la higromicina. D, E: se regeneran las plantitas transgénicas. F: plantas de *Festuca* transgénicas en el invernadero.

Cuadro 7.4 Opinión de los expertos: Cifras de transgénicos y hechos sobre los alimentos OMG y su identificación

Anualmente, la Agencia de Agrobiotecnología Internacional ISAAA publica un informe sobre el desarrollo mundial del cultivo de plantas útiles modificadas genéticamente. En 2004, 8,25 millones de agricultores de todo el mundo cultivaron plantas modificadas genéticamente (MG). El crecimiento superficial absoluto (7,2 millones de hectáreas) fue por primera vez mayor en los países en vías de desarrollo y emergentes (China, Argentina, Brasil, India) que en los países industrializados.

En el caso de las **habas de soja**, las superficies de OMG (organismos modificados genéticamente) aumentaron a 48,4 millones de hectáreas. En todo el mundo, el 56% de las habas de soja se genera con especies transgénicas (55% el año anterior). El mayor crecimiento se produjo en Brasil, donde actualmente hay habas de soja transgénicas en cinco millones de hectáreas. Además de Estados Unidos, Argentina y Brasil, cultivan habas de soja transgénicas Canadá, Paraguay, Uruguay, Rumanía, Sudáfrica y México.

De nuevo, el mayor crecimiento lo registró el **maíz** transgénico. Entre 2004 y 2005, las superficies crecieron un 25%, hasta 19,3 millones de hectáreas. El maíz transgénico se cultiva en Estados Unidos, Argentina, Canadá, España, Uruguay y Filipinas.

En cuanto a la **colza**, se cultivan 4,3 millones de hectáreas de especies transgénicas (un aumento del 20%). El cultivo se limita a Canadá y Estados Unidos. También en el caso del algodón, el crecimiento disminuyó claramente a un 25%. Ahora se cultiva algodón transgénico en nueve millones de hectáreas. Los países cultivadores son Estados Unidos, China, Argentina, India, Australia, México, Sudáfrica y Colombia.

Diecisiete países cultivan plantas transgénicas en los campos; seis países tienen superficies de OMG superiores a un millón de hectáreas.

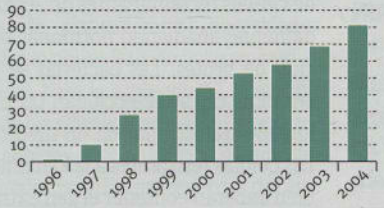
Ha habido un crecimiento significativo del **algodón** transgénico: en la India, las superficies han aumentado hasta las 500 000 hectáreas (aumento del 400%). China obtiene dos tercios de su producción nacional de algodón con plantas transgénicas.

Uruguay dobló la superficie de OMG. Las habas de soja cultivadas allí están genéticamente manipuladas casi en su totalidad.

En Europa, sólo Rumanía (soja, 100 000 hectáreas) y España (maíz, 60 000 hectáreas) cultivan plantas transgénicas a gran escala. En Alemania se ha iniciado el cultivo de prueba del maíz.

Clive James, el presidente de la ISAAA, ve sobre todo en el maíz y el algodón el mayor potencial de crecimiento de los tipos transgénicos.

Para el año 2015 se prevé el cultivo de plantas transgénicas en 30 países, en una superficie de 150 millones de hectáreas. James parte de la base de que el cultivo de plantas transgénicas seguirá siendo atractivo económicamente en los próximos años. Sobre todo, las especies transgénicas resistentes a los insectos contribuyen a una mejora de los ingresos, ya que reducen las malas cosechas por culpa de los parásitos.



Superficies de cultivo con plantas modificadas genéticamente entre 1996 y 2004 en millones de hectáreas.

Hasta el momento no hay ningún vegetal que se consuma crudo o preparado como alimento que se pueda comprar en su forma genéticamente modificada. Manzanas y berenjenas, fresas y melones, calabacines y coliflores... Todas las frutas y verduras están "exentas de ingeniería genética". Si bien en Estados Unidos están autorizados las papayas, los melones y los calabacines "squash" (calabacines amarillos pequeños) modificados genéticamente, no se pueden exportar a Europa. Hasta ahora, en Europa no se habían cultivado plantas genéticamente modificadas (transgénicas) –a excepción de pequeñas superficies en España y Alemania. Hasta 2004 ni siquiera se podían comprar libremente semillas. Para cultivar plantas transgénicas los agricultores deben cumplir normas especiales. De este modo se evita una mezcla incontrolada con productos convencionales.

En el resto del mundo esto es diferente. En 1996, en Estados Unidos se cultivaron las primeras plantas genéticamente modificadas en superficies explotadas para la agricultura. Hasta 2004, sus superficies de cultivo habían aumentado en todo el mundo hasta más de 81 millones de hectáreas. Sobre todo, estas superficies se encuentran en Estados Unidos, Argentina, Canadá y China.

Mientras, más de la mitad de las habas de soja que se producen en todo el mundo ya proceden de especies genéticamente modificadas. Muy extendidas están las plantas transgénicas de maíz, colza y algodón. En todos los demás tipos de plantas –también en el trigo–, actualmente no tiene un significado práctico.

La soja y el maíz proporcionan materias primas para numerosos **ingredientes alimenticios.** De este modo, muchos alimentos entran en contacto con plantas genéticamente modificadas sin que ellos mismos estén modificados genéticamente. Así, el aceite de la margarina, la lecitina del chocolate, las galletas o el helado, las proteínas de soja o las vitaminas, pueden proceder de la soja. Cada año, los países de la UE importan aproximadamente 35 millones de toneladas de soja como materia prima. Los países productores son Estados Unidos, Argentina y Brasil –en todas partes se cultivan en grandes superficies habas de soja transgénicas. Puesto que, comparativamente, Europa importa menos maíz de Estados Unidos y Argentina, es mucho menos probable que los ingredientes del almidón, por lo menos en parte, contengan maíz modificado genéticamente, al contrario de las sustancias que contienen habas de soja.

Identificación

Desde 1997, la identificación de los alimentos OMG se regula en el **Reglamento sobre nuevos alimentos**. Sólo era obligatorio identificar la utilización de plantas o microorganismos modificados genéticamente para fabricar alimentos cuando los organismos modificados genéticamente (OMG) en cuestión podían detectarse en el producto final.

Hoy la identificación se basa en otro principio: cada uso directo de un OMG en el transcurso de la fabricación o producción de alimentos o piensos debe identificarse obligatoriamente. El hecho de que se pueda detectar o no un OMG introducido en el producto final no tiene ninguna relevancia.

Este concepto de identificación facilita información sobre el uso de la ingeniería genética, con independencia de la composición material del alimento en cuestión. Puede ocurrir que alimentos materialmente idénticos se deban identificar una vez sí y otra no. La diferencia decisiva es la utilización de los OMG en etapas previas de producción, aun-

que en el proceso de tratamiento posterior éstas se descompongan tanto que ya no sea posible diferenciarlas materialmente.

En muchos casos ya no es posible controlar el cumplimiento de la identificación en el alimento. La protección a los consumidores contra el fraude es considerablemente más costosa que en el concepto de identificación basado en la detección.



El maíz es la base del almidón –elemento básico no sólo para la industria química y papelera, sino también para numerosos aditivos alimentarios. De este modo se pueden fabricar la fructosa y el jarabe de glucosa, contenidos en muchos productos dulces, a partir del almidón de maíz.

Trazabilidad en lugar de control de la detección

Para la nueva identificación relacionada con la aplicación se deben crear "sistemas de trazabilidad" adecuados. Cualquiera que produzca ingredientes o materias primas agrarias a partir de OMG o comercie con ellos, está obligado a facilitar información de todos los OMG contenidos en un alimento o materia prima al siguiente nivel de procesamiento. Los documentos deberán conservarse durante cinco años.
En cada momento deberá ser posible seguir la ruta de un OMG, desde su fabricación hasta el producto final (*from farm to fork*). Junto con la autorización, cada OMG recibe un número de identificación con el cual puede identificarse en cada momento.

El principio básico de la "trazabilidad" y los requisitos de la economía alimentaria están definidos en un reglamento propio de la UE (1830/2003). Con este concepto de identificación, el consumidor recibe sólo información completa y fiable sobre si se han utilizado plenamente los sistemas de trazabilidad adecuados y si, además, es posible realizar un control.

En Alemania, los "Länder" tienen competencias para verificar el estado de la identificación. Sin embargo, si no se puede demostrar que un producto contiene DNA, no será posible efectuar un control directo. Para su verificación, en tales casos se recurre la mayoría de las ocasiones a documentos escritos, ya sean certificados o resultados de investigaciones de OMG en etapas de procesamiento realizadas previamente. Sólo se puede efectuar un control analítico en etapas previas de la cadena de procesamiento en que el DNA típico de los OMG todavía está prácticamente intacto. No obstante, sobre todo en el comercio agrario internacional, sería difícil una comprobación completa.

Valores umbral para mezclas de OMG

Siempre que los productos contengan casualmente OMG y no sea técnicamente evitable, éstos no tendrán obligación de identificarse hasta llegar al valor umbral correspondiente. El valor umbral asciende a un 0,9% (en relación con el ingrediente correspondiente). Sólo existe un valor umbral para aquellos OMG que están autorizados en la UE y que pueden clasificarse de forma probada como seguros. Para aquellos OMG que no están autorizados de forma concluyente en la UE, pero que ya se han sometido a una valoración de seguridad científica, el valor umbral admitido asciende a un 0,5%. Después de un periodo de transición de tres años se reducirá a un 0,0%.

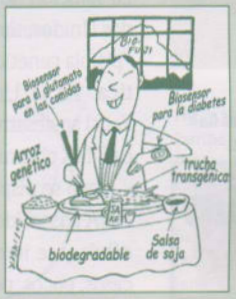
Los alimentos o ingredientes que no están fabricados a partir de organismos modificados genéticamente (OMG), sino con la ayuda de éstos, no están sujetos a identificación. Dicho de otra forma: un alimento sólo deberá identificarse si procede de un organismo modificado genéticamente.

El requisito de cada identificación es que las sustancias implicadas se consideren **alimentos desde el punto de vista jurídico**. Entre las sustancias que no se consideran alimentos se encuentran las sustancias auxiliares técnicas (como las enzimas), las sustancias portadoras (para aromas o vitaminas) o las soluciones nutritivas para microorganismos (como en la reproducción de levaduras). Las posibles aplicaciones de los OMG en "no alimentos" no precisan identificación.

No existe una relación directa entre alimentos y organismos modificados genéticamente, ni tampoco existe una obligación de identificación en alimentos o animales que se han alimentado con piensos modificados genéticamente: carne, salchichas, huevos, leche y productos lácteos. Los piensos propiamente dichos deben identificarse obligatoriamente si están fabricados total o parcialmente a partir de organismos modificados genéticamente.

Los aditivos, las vitaminas y los aromas fabricados con la ayuda de microorganismos modificados genéticamente en principio no están sujetos a identificación. En teoría, los microorganismos y los restos de éstos ya no pueden estar presentes en la sustancia correspondiente. Entre ellos se encuentran la vitamina B_2 (riboflavina), el glutamato y el aspartamo, fabricados en sistemas cerrados con la ayuda de microorganismos transgénicos.

Algunos microorganismos que se utilizan en la industria alimentaria crecen en sustancias nutritivas (sustratos) que pueden constar de organismos modificados genéticamente. Sin embargo, los alimentos, los ingredientes o los aditivos producidos con estos métodos no proceden directamente de alimentos OMG.



En la "tierra prometida" de la biotecnología, Japón, aún persiste la fascinación.

Los alimentos y los ingredientes fabricados con la ayuda de sustancias OMG no se identifican. Entre ellos se encuentran las levaduras de panadería que crecen en sustancias nutritivas que proceden de almidón de maíz transgénico, además de la vitamina C o el ácido cítrico que se producen con la ayuda de microorganismos. Sus sustancias nutritivas (melaza) pueden obtenerse, por ejemplo, de remolachas transgénicas.

Desde el punto de vista jurídico, las enzimas no se consideran alimentos. Por tanto, no deben identificarse si se han fabricado con la ayuda de microorganismos modificados genéticamente.

Junio de 2005: en Alemania se cultiva maíz Bt en algunos centenares de hectáreas en cultivos de prueba prácticos; sin embargo, aún no existe una autorización regular de variedades (ver www.transgen.de).

Por gentileza de *Trans-gen und bioSicherheit 2005*.

Cuadro 7.5 Insectos contra insectos: métodos alternativos para combatir parásitos

Los investigadores de todo el mundo buscan métodos biológicos para combatir parásitos que respeten el medio ambiente. Así, hoy se crían millones de ejemplares de la avispa icneumón de tamaño milimétrico, *Trichogramma*, "en una cadena de montaje" y se liberan en los campos atacados por parásitos.

Una sola hembra de *Trichogramma* pica hasta 300 huevos de insectos dañinos (por ejemplo mariposas de la col) y deja, respectivamente, uno de sus huevos dentro. Las larvas de *Trichogramma* se comen luego el huevo del huésped.



Mariquita (arriba) y avispa icneumón.

Un ejemplo famoso fue la salvación de las plantaciones de limoneros de California de la plaga de cochinilla en 1870.

El germano-americano **Albert Köbele** había experimentado en su tierra natal con las mariquitas (*Coccinella*) como enemigos naturales de las cochinillas e introdujo mariquitas con un éxito rotundo: doce años más tarde, las plantaciones de limoneros ya no tenían cochinilla.

Sin embargo, en Australia, de donde procedían las cochinillas de Nueva California, fueron bien acogidas: como insectos útiles actuaban de parásitos en las opuntias, que se habían llevado allí conscientemente y luego proliferaron de forma salvaje, por lo que se querían volver a deshacer de ellas.



Fig. 7.36 Aplicación de herbicida contra las llamadas malas hierbas.



Fig. 7.37 Logo de *Round Up®*, un herbicida con base de glifosato.





Fig. 7.38 La agricultura ecológica permite que haya plantas silvestres en los bordes de los campos (arriba). Un ramo de plantas silvestres de un campo de trigo.

monocotiledóneas maíz y arroz, al igual que otras gramíneas, son las plantas alimenticias más importantes que existen!

La solución no llegó de los protoplastos sino de Estados Unidos, típicamente, mediante un disparo de una "pistola genética": **la transferencia genética biolística**. En la Universidad Cornell de Ithaca (Nueva York) se desarrollaron cañones en miniatura. Se coloca DNA plásmido en partículas de oro o de wolframio y luego se disparan a un tejido sin dañar la célula. El DNA adsorbido permanece cuando la bala entra en la célula y se integra en el DNA genómico en algunos casos, pocos, pero suficientes. De este modo se puede introducir DNA ajeno, tanto en el DNA del núcleo como en el DNA de los cloroplastos. Otros métodos permiten introducir genes extraños solamente en los cromosomas del núcleo celular. La gran ventaja de la transformación biolística es que puede utilizarse también para cualquier otro organismo, incluso para los animales vertebrados.

7.14 Plantas transgénicas: resistencia a los herbicidas

Las plantas manipuladas genéticamente se denominan plantas transgénicas. Cada año, agricultores de todo el mundo cultivan estas plantas modificadas genéticamente en mayores cantidades. En comparación con el año 2003, en 2004 las superficies donde se cultivaban plantas transgénicas aumentaron un 20%, hasta los 81 millones de hectáreas. Diecisiete países implantaron comercialmente la ingeniería genética verde en su agricultura. En casi todas partes aumentaron las superficies de cultivo (ver Cuadro 7.4).

En Estados Unidos ya hay registradas más de 30 plantas transgénicas. Algodón, patatas, maíz, colza, habas de soja y tomates transgénicos, protegidos contra herbicidas, insectos dañinos o virus. Ya se han cultivado en más de 35 millones de hectáreas de tierra.

Aproximadamente el 10% de la cosecha media se pierde debido a las "malas hierbas" (Figs. 7.36 a 7.38). El **herbicida** ideal debería ser activo en pequeñas cantidades pero no impedir el crecimiento de las plantas útiles, degradarse rápidamente y no alcanzar las aguas subterráneas. Los químicos trabajan de forma intensiva en la sustancia; los biotecnólogos se concentran en la manipulación genética de las plantas útiles. El mercado de los herbicidas tiene un volumen de ventas de 6000 millones de dólares americanos.

La compañía genética estadounidense Calgene logró ser la primera en introducir genes bacterianos en plantas de tabaco y petunias, que las hacen resistentes a la sustancia **glifosato**. De este modo, estas plantas resisten cantidades de herbicida *Round Up®*, el más vendido en Estados Unidos, que matarían a las plantas normales. El cliente de la empresa genética era Monsanto, el principal proveedor de *Round Up®* (Fig. 7.37).

El glifosato daña las plantas porque inhibe una enzima importante en el metabolismo de los aminoácidos (enol-piruvil-shikimato-fosfato-sintasa, la **EPSP sintasa**). Se aislaron cepas de *E. coli* resistentes al glifosato, se obtuvo el gen de la EPSP sintasa y se clonó. Seguidamente se transfirió el gen con *Agrobacterium* a células de petunia, tabaco y habas de soja. Luego, estas células volvieron a convertirse en plantas completas.

Las plantas obtenidas poseían una concentración mucho más elevada de la enzima y, por tanto, sólo sufrían daños a mayores concentraciones del herbicida. Es decir, las "malas hierbas" se exterminaban, mientras que la planta transgénica sobrevivía.

No obstante, los ecologistas ven este desarrollo de forma crítica. Reciben con escepticismo las medidas dirigidas a exterminar por completo grandes superficies de un factor dañino. Sin embargo, es justo reconocer que el glifosato es un herbicida sistémico excelente, que permite aplicar dosis ínfimas, mantiene la carga ecológica a niveles extremadamente bajos y apenas deja restos en las plantas y el suelo.

Desde el punto de vista ecológico, más interesante que proteger las plantas aumentando su contenido enzimático es la utilización de las plantas transgénicas, que degradan de forma activa el herbicida y, por tanto, descontaminan. Sólo de esta forma se puede evitar una acumulación del herbicida.

Esto lo ha logrado el herbicida ***Basta®***. Su principio activo es la fosfinotricina, PPT. *Basta®* inhibe la síntesis del aminoácido glutamina en la planta mediante la **glutamina sintetasa (GS)** (Fig. 7.39). De este modo, el amoniaco tóxico que mata las células no se procesa y se acumula. Se aisló el gen para una enzima que modifica la PPT (la acetila, PPT acetiltransferasa) a partir de los estreptomicetos y se transfirió al tabaco, a las patatas, a la colza y a otras plantas. De esta manera se anula la inhibición de la formación de glutamina en las plantas transgénicas, pero no en las malas hierbas del entorno.

Durante tres años, en tres regiones de Inglaterra de diferente clima se estuvieron utilizando plantas de colza resistentes a *Basta®* para estudiar su **entrenamiento ecológico** en comparación con las plantas de colza convencionales. Los resultados, publicados en *Nature* en 1993, dieron lugar a discusiones acaloradas: las plantas de colza transgénicas tenían un "menor potencial medio de invasión" que las no transgénicas. Los que se oponen a su implantación siguen criticando hasta el momento que los experimentos tipo siempre son incompletos y que, en conjunto, la colza transgénica sí es inferior en promedio, pero en lugares concretos de Inglaterra también podría ser superior.

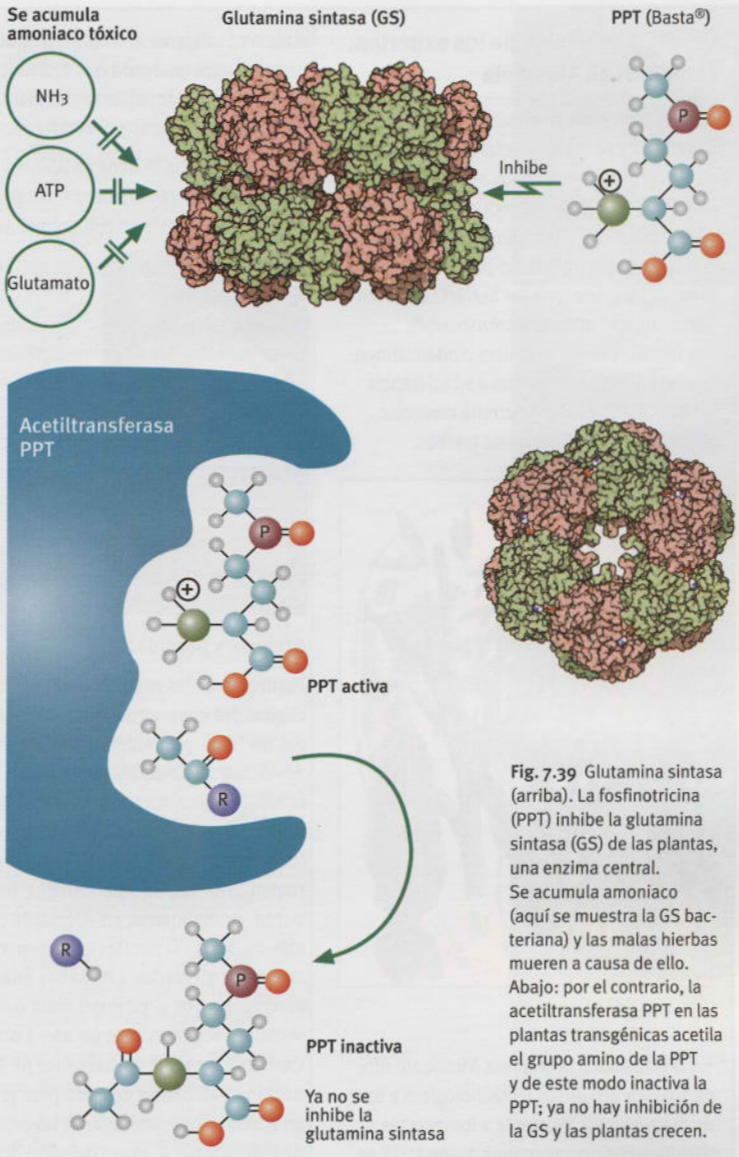


Fig. 7.39 Glutamina sintasa (arriba). La fosfinotricina (PPT) inhibe la glutamina sintasa (GS) de las plantas, una enzima central. Se acumula amoniaco (aquí se muestra la GS bacteriana) y las malas hierbas mueren a causa de ello. Abajo: por el contrario, la acetiltransferasa PPT en las plantas transgénicas acetila el grupo amino de la PPT y de este modo inactiva la PPT; ya no hay inhibición de la GS y las plantas crecen.

7.15 Insecticidas biológicos

En algunos países en vías de desarrollo, aproximadamente el 80% de las cosechas se ven aniquiladas por insectos y roedores. En Europa se producen pérdidas del 25 al 40%. En los países tropicales también se teme a los insectos por ser transmisores de malaria (mosquito *Anopheles*) o de la enfermedad del sueño (mosca tsé-tsé). En cuanto a número de enfermos, la malaria, con 300 millones de nuevos casos anuales, se encuentra en la cúspide de todas las enfermedades mundiales.

Por este motivo, es imprescindible combatir ciertos insectos. Hasta ahora esto se realizaba con medios químicos. Sin embargo, los **insecticidas** no sólo eliminan los parásitos, sino también muchos otros insectos que entran en contacto con ellos. De este modo, perturban el sensible **equilibrio ecológico**. Además, hay otros seres vivos que se envenenan paulatinamente, como los pájaros que comen insectos o el águila marina de cabeza blanca (el símbolo de Estados Unidos) que come peces, que se hallan al final de la cadena alimentaria. Finalmente, los restos de insecticida llegan también, por la cadena alimentaria, al hombre. Además, los insectos dañinos de todo el mundo desarrollan una fuerza de oposición **(resistencia)**. Para combatirlos, o se incrementa la cantidad de veneno o hay que utilizar insecticidas nuevos. ¡Un círculo vicioso!



Fig. 7.40 Cristales de proteína tóxicos procedentes de *Bacillus thuringiensis*.

Cuadro 7.6 Opinión de los expertos: El maíz Bt en Alemania

El maíz Bt se protege de ser devorado por las larvas de los parásitos gracias a la producción de una proteína de *Bacillus thuringiensis*. Es uno de los primeros productos de la biotecnología verde y, por ello, está muy bien considerado por la opinión pública. Además, existe maíz tolerante a los herbicidas, como por ejemplo el maíz *RoundupReady®* (en Estados Unidos se cultiva comercialmente desde 1998), que gracias a su tolerancia al herbicida *Roundup®* permite controlar un amplio espectro de malas hierbas.



Maíz (*Zea mays*)

En la actualidad, la empresa Monsanto ofrece diversos productos biotecnológicos a base de maíz: el maíz resistente a los insectos *YieldGard®-Cornborer* –que desde 1997 se cultiva comercialmente en Estados Unidos– se distingue por su protección eficaz contra el piral del maíz, la cual dura todo el periodo de cultivo. El *YieldGard® Rootworm* destaca por una resistencia incorporada contra el escarabajo del maíz y se cultiva en Estados Unidos desde 2003.

Los demás productos son combinaciones de éstos: la protección combinada de *RoundupReady®* y *YieldGard® Cornborer*, introducida en Estados Unidos en 1999, otorga a las plantas, por ejemplo, tolerancia al herbicida *Roundup®* y al mismo tiempo evita que las devore el piral del maíz. En el año 2005, en Estados Unidos estaba previsto introducir en el mercado el maíz *YieldGard® Plus/ RoundupReady®*, que contiene las tres innovaciones de mejora. Próximamente este maíz será tolerante al *Roundup®* y al mismo tiempo estará equipado con una amplia protección contra los parásitos del maíz más importantes –el piral y el escarabajo.

¿Qué experiencia se tiene en Alemania? Se probó ampliamente el maíz Bt con protección frente a los parásitos en cultivos prácticos.





Piral del maíz (mariposa y larva).

Ataques y pérdidas

Partiendo de las zonas clásicas atacadas por el piral del maíz, situadas al sur de la línea del río Main y en algunos lugares prósperos de Alemania Oriental (por ejemplo Oderbruch), recientemente está aumentando notablemente el ataque y se observa sobre todo en Renania del Norte-Westfalia, Thüringen, Sajonia, Sajonia-Anhalt y Brandenburgo. Actualmente, en Alemania existen más de 300 000 hectáreas de superficie cultivable afectadas. Los daños financieros producidos por el piral del maíz oscilan según las regiones y de un año a otro. Con un panorama conservador de 100 000 hectáreas afectadas de maíz para grano, en Alemania se equilibrarán las pérdidas de ingresos por ataques del piral del maíz, del 5%, con aproximadamente 40 000 toneladas de mercancía seca. Esto correspondería a unas pérdidas por valor de 4,4 millones de euros. Para un 20% de pérdidas de ingresos se deberían compensar entonces 17,6 millones de euros.

En cualquier caso, debido al estrés fisiológico, los ataques del piral del maíz dañan el rendimiento de ingresos producidos por las plantas del maíz y, de este modo, reducen el valor del pienso. Además, en las partes devoradas por el parásito en las plantas se asientan mohos (fusarias) que pueden formar sustancias tóxicas para la salud (micotoxinas). Una protección contra el piral lo más completa posible también proporciona, en este caso, otra ventaja decisiva, ya que permite reducir el ataque del hongo en las cosechas.



Daños en el maíz causados por la larva del piral

Cultivo práctico de maíz Bt

Aunque en todo el mundo se cultivan más de 20 millones de hectáreas de maíz Bt desde que se introdujo en 1996, la parte correspondiente a Alemania es hasta la fecha muy modesta. En este país se cultivaron entre 1998 y 2004 varios centenares de hectáreas de maíz Bt en cultivo práctico.

Entre 1998 y 2002, en zonas atacadas de Baden-Württemberg (Valle del Rin) y Brandenburgo (Oderbruch) se realizaron ensayos comparativos en grandes parcelas con maíz Bt y con las especies convencionales correspondientes, conjuntamente por parte de las empresas Syngenta Seeds, Pioneer Hi-Bred Northern Europe GmbH y Monsanto Agrar Deutschland GmbH, y en parte en colaboración con el servicio oficial de protección de plantas.

La consideración de las avispas icneumón (*Trichogramma*) y las variantes de insecticida permitieron valorar los diferentes métodos para combatir los ataques del piral del maíz en condiciones medioambientales idénticas. Los híbridos Bt utilizados en las pruebas están autorizados en la UE para su cultivo. El cultivo práctico en Alemania se produjo con especies que se encontraban en el proceso de verificación de especies alemán o que ya estaban autorizadas en otros países de la Unión Europea.

Comparación experimental

En parcelas grandes contiguas de un mínimo de 0,5 hectáreas, por cada elemento de prueba se verificó lo siguiente:

Maíz Bt / control sin tratamiento / insecticidas autorizados / proceso *Trichogramma* que se puede obtener comercialmente.

En el control sin tratamiento en el Valle del Rin, cada año la plaga de piral del maíz oscilaba entre 0,11 y 0,42 larvas por planta de maíz. La presión del parásito era notablemente superior en Oderbruch en todos los

años examinados en las parcelas sin protección contra el piral: oscilaba entre 0,68 y 1,18 (!) larvas por planta. Las aplicaciones de insecticida produjeron una reducción clara de la plaga. La introducción de *Trichogramma* sólo tuvo un efecto satisfactorio en el Valle del Rin. En Oderbruch, a pesar del tratamiento con avispas icneumón, un promedio del 70% del maíz resultó atacado por el parásito.

En las parcelas de maíz Bt, salvo unas pocas excepciones que se debían principalmente a mezclas de semillas normales (pocas plantas no portadoras del gen resistente), no se encontraron larvas de piral. Así de claros son los resultados de los efectos biológicos del proceso. El uso de insecticidas produjo en las parcelas correspondientes de ambas regiones una reducción clara del piral, de más del 80%.



El maíz Bt garantiza ingresos elevados.

En función de la gran cantidad de larvas que aún había en las parcelas de *Trichogramma*, allí los efectos sólo fueron de un 59% (Valle del Rin) o de un 29% (Oderbruch). Por el contrario, con el maíz Bt se alcanzó un control completo del parásito.

Los rendimientos absolutos de los híbridos del maíz fueron diferentes de un año a otro en los distintos entornos en función de las expectativas. Sin embargo, la tendencia era clara: cuánto más efectivo era el proceso para controlar el piral, mayor era la cosecha de granos de maíz. Independientemente de la región, la diferencia entre control sin tratamiento y la variante del maíz Bt era más o menos de una tonelada de granos de maíz.

Si se consideran los rendimientos relativos (el control sin tratamiento corresponde a un rendimiento del 100%), la aplicación de *Trichogramma* produce un rendimiento adicional del 2 al 3%. Con la aplicación del insecticida, en el Valle del Rin se produjo un crecimiento medio de un 7% y en Oderbruch de un 10% de la cosecha superior de granos de maíz. En relación con los efectos biológicos preferentes arriba mencionados contra el piral del maíz, se obtuvo la mejor garantía de rendimiento (14 o 15%) contra el piral con el maíz Bt.

Cálculo de la rentabilidad

Por cada tonelada de granos de maíz (producto seco) un agricultor obtiene aproximadamente 110 euros. Para el uso de *Trichogramma* hay que calcular unos costes de producto de aproximadamente 60 euros por hectárea. El sembrado manual doble se calcula en 15 euros. La aplicación de insecticida (producto y única aplicación) cuesta al agricultor aproximadamente 40 euros por hectárea.

El precio adicional de las semillas de maíz Bt asciende aproximadamente a 35 euros por hectárea. En ninguno de los años de cultivo se amortizaron directamente los costes de la aplicación de *Trichogramma*. Mediante el efecto limitado del piral y los costes del proceso relativamente elevados, se produjeron, en comparación con el control sin tratamiento, pérdidas medias de 52 euros (Valle del Rin) o de 57 euros (Oderbruch) por hectárea.

Por el contrario, con los insecticidas se obtuvieron ingresos adicionales de 18 euros por hectárea en el Valle del Rin y de 55 euros por hectárea en Oderbruch. A causa de los costes de producción bajos y del elevado efecto biológico contra el piral del maíz, el agricultor obtuvo con el maíz Bt una media de 84 euros o 93 euros más por hectárea.

Otra ventaja del cultivo de maíz Bt es que sólo se controla de forma selectiva el parásito, mientras que los insectos útiles no se ven afectados. Además, el maíz Bt está protegido durante todo el periodo de cultivo y con una protección segura en función del clima frente a daños causados por el piral del maíz. Es fácil de manipular, elimina las consideraciones relativas a los costes elevados de la situación de la plaga (control de la propagación) del piral y evita tener que recorrer el terreno para fumigar. El maíz Bt puede desarrollarse sin problemas y aprovechar por completo su potencial de beneficios.



El Dr. Norbert Müllleder es el investigador principal del proyecto de biotecnología de Monsanto Agrar Deutschland GmbH.

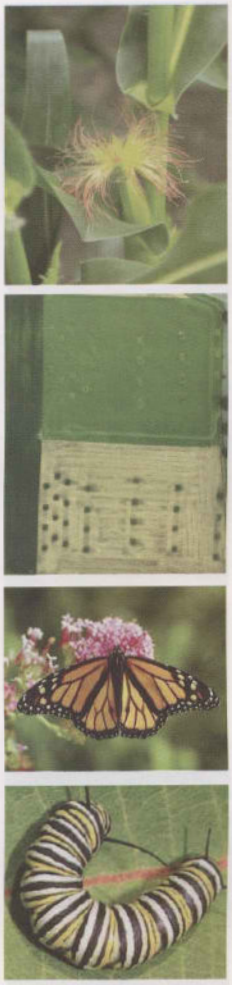


Fig. 7. 41 La polémica del maíz transgénico (arriba). En junio de 2005, la Comisión de la UE fracasó a la hora de levantar una prohibición de cultivo de una variante del maíz Bt, ya que debido a experimentos con ratas había dudas sobre la salud. En general, en el cultivo del maíz Bt se necesitan menos insecticidas. Centro: campos de pruebas para determinar el índice de liberación de polen a la atmósfera (vista aérea). Abajo: las orugas de la popular mariposa monarca (*Daunus plexippus*) se estuvieron investigando en Estados Unidos durante cinco años de forma intensiva para ver si sufrían daños por el polen del maíz Bt. Hubo algunas orugas que sufrieron daños en condiciones de laboratorio extremas, pero no el conjunto de la población. Por el contrario, ésta fue atacada por los insecticidas.



Fig. 7.42 Preparado de *B. thuringiensis* contra el escarabajo de la patata.





Fig. 7.43 Larvas de escarabajo de la patata.



Fig. 7.44 Medidor de polen para calcular el índice de polen desprendido a la atmósfera por las plantas transgénicas. Sobre todo en el caso de la colza, se teme una interacción con otras crucíferas (mostaza silvestre, rabanillo).





Fig. 7.45 Los preparados a base de *B. thuringiensis* son inocuos para las abejas.

Bacillus thuringiensis, descubierto en Thüringen, ha resultado ser un excelente aniquilador de orugas. Se pulveriza sobre los campos y las orugas se lo comen con los alimentos. En primer lugar, los microbios sólo forman proteínas en forma de cristales de baja toxicidad (Fig. 7.40), las cuales se convierten en el intestino de las orugas en su forma venenosa y lo perforan. Al mismo tiempo, se paralizan los mecanismos de alimentación. La oruga muere a causa de ello. *Bacillus thuringiensis* se produce en grandes cantidades en biorreactores. Basta una tonelada del preparado microbiano **toxina Bt** (Fig. 7.42) para liberar de insectos dañinos 300 hectáreas de bosque, campos de nabos, algodón o plantaciones de frutales.

Existen nuevas cepas bacterianas que tienen un efecto particular contra las larvas del **escarabajo de la patata** (Fig. 7.43). Algunos parásitos de los bosques, como los enrolladores del roble y diversos tipos de arañas, pueden eliminarse de forma selectiva, al igual que las moscas caseras y las orugas de zurrón, sin matar otros insectos y abejas.

El subtipo *israelensis* de *Bacillus thuringiensis* ha resultado ser eficaz contra los mosquitos. Anteriormente, a menudo se producían daños graves para todo el mundo animal debido a la utilización de insecticidas. En los centros de jardinería alemanes ya se puede adquirir un preparado para el jardín obtenido a partir de *B. thuringiensis* var. *israelensis*. Éste actúa de forma especial contra las larvas de mosquito y no contra otros insectos útiles, como las abejas (Fig. 7.45), y es totalmente inocuo para los humanos, los peces y los animales de sangre caliente. Sin embargo, a pesar de todos estos esfuerzos, el consumo de toxina Bt sigue siendo bajo en comparación con el de otros insecticidas, y está limitado a cultivos especiales. Las radiaciones UV la degradan rápidamente. Por lo general, no puede alcanzar las raíces de las plantas ni los insectos que se hallan en los tallos de éstas.

El siguiente paso es lógico: ¡aislar el gen Bt, multiplicarlo e introducirlo en plantas de cultivo con *Agrobacterium*! De este modo sólo se alcanzaría a los insectos que actúan de parásitos en estas plantas transgénicas. El **maíz Bt** transgénico y resistente al piral del maíz (denominado por los críticos "maíz genético", Cuadro 7.6) ya está autorizado en Estados Unidos y se está probando en Alemania, a pesar de las protestas. En el algodón, el tabaco, los tomates, las patatas y los álamos se introducen genes Bt.

¿Los insectos no se hacen resistentes al maíz Bt? Con una presión selectiva masiva, así podría ocurrir. No obstante, hasta ahora, en Alemania no se han descubierto todavía animales resistentes.

No es que los animales se vayan a marchar de los campos de Bt a los campos con plantas no transgénicas. Los insectos que crecen en las plantas no transgénicas no están sometidos a una presión selectiva. Los genes resistentes recesivos (suprimidos) en los insectos no reciben ventajas selectivas.

En Estados Unidos, los granjeros están obligados a reservar, cerca de los campos Bt, otros campos para plantas no Bt. En la actualidad, la reserva de tales **superficies de refugio** se considera la medida más importante para evitar que aparezcan parásitos resistentes al Bt y retrasar su propagación. Estas superficies se encargan de que los parásitos "normales", no resistentes, sobrevivan y posteriormente –si existen– se puedan aparear con parásitos resistentes de los campos de maíz Bt cercanos. Si se parte de genes resistentes recesivos, los descendientes con mezcla genética (con sólo un alelo de resistencia) no sobreviven en el maíz Bt. Para garantizar esto, las plantas Bt deberán contener toxina Bt en cantidades lo suficientemente elevadas para poder matar insectos no resistentes (y no homozigotos resistentes).

Para los grandes granjeros estadounidenses es fácil resarcirse de tales pérdidas de refugios. Sin embargo, se dice que el cumplimiento de las normas se controla de forma laxa. Pero en Europa esto afecta a los pequeños agricultores, que no tienen superficies adicionales para usar como refugio.

Otra cuestión que se investiga es si los genes resistentes a los herbicidas se pueden transmitir de las plantas de cultivo a las malas hierbas. En tal caso, éstas crecerían en estado más salvaje que nunca (por ejemplo, de la colza transgénica a sus parientes la mostaza silvestre y el rabanillo).

Por lo general, las plantas modificadas genéticamente no pueden resistir mejor en la naturaleza. Al menos, hasta ahora esto no se ha refutado. Se cultivan en los mismos lugares donde se cultivan plantas no manipuladas y, por tanto, no son nuevas especies devastadoras para el ecosistema como la branca ursina en Europa o el conejo en Australia.

¿Y cómo se comportan en cuanto a la **liberación de polen a la atmósfera**? (Fig. 7.44) Esto se ha investigado de forma intensiva para el maíz Bt. Hasta el momento, los resultados obtenidos en experimentos en Alemania indican claramente que el porcentaje de las pruebas de cosechas disminuye rápidamente cuanto más se aleja de la parcela de maíz Bt (Fig. 7.41).

Los porcentajes de OMG (organismos modificados genéticamente) situados sobre el umbral del 0,9% determinante para su identificación sólo se localizan dentro de una franja de diez metros de ancho

directamente junto al campo de maíz Bt. A mayor distancia, por lo general los valores de OMG se hallan por debajo del umbral del 0,9%. La medida consistente en plantar simultáneamente especies de maíz de floración temprana y tardía no es adecuada en la práctica para evitar invasiones de OMG.

El maíz convencional que se cosecha en una franja al margen de diez metros de ancho debería estar sujeto a la obligación de identificación, ya que se espera que tenga una proporción de OMG superior al 0,9%. El maíz situado a mayor distancia no precisa identificación debido a la baja proporción de OMG, y se podría consumir sin limitaciones ni reservas (Cuadro 7.4).

Por consiguiente, los agricultores que cultivan maíz Bt deben prever una franja de separación de veinte metros alrededor de las superficies donde se cultiva maíz OMG. De este modo se descartarán ampliamente los posibles daños económicos motivados por cruces con cultivos vecinos.

7.16 Claveles azules y tomates "antifofos"

El gen portador de la "enzima de la luciérnaga", la **luciferasa,** se aisló con éxito en las células del tabaco. Cuando el sustrato luciferina llegó a la planta con el agua de riego y con el ATP rico en energía se transformó mediante la luciferasa, ¡y las plantas transgénicas verdaderamente empezaron a iluminarse de amarillo verdoso! El gen de la luciferasa sirve a los científicos como marcador fácilmente reconocible, al indicar qué genes se han "conectado" en qué partes de la planta (la Fig. 7.46 muestra esto para la GFP, Cap. 8).

Actualmente, la fantasía ya (casi) no tiene límites: la empresa australiana Florigen concedió una licencia para **claveles azules transgénicos** a la destilería japonesa de whisky Suntory: se transfirió a los claveles un gen de las petunias (Fig. 7.47). La enzima de las petunias generó en el clavel un pigmento azul maravilloso.

Los pigmentos principales de las plantas proceden de las antocianinas y de los carotenoides amarillos. Los tres pigmentos vegetales primarios son la cianidina, la pelargonidina y la delfinidina. La enzima dihidroflavinol reductasa (DFR) modifica todos los precursores de pigmentos incoloros en los productos coloreados. Cualquier mutación del gen DFR da como resultado flores blancas.

En los claveles falta el gen de la síntesis de la delfinidina. Florigene transfirió el gen de la delfinidina de las petunias azules a los claveles y lo combinó con el gen mutado DFR del clavel. Por consiguiente, los claveles eran incoloros y sólo se colorearon ligeramente con el azul de las petunias. El resultado fueron los claveles azules *Moondust* y *Moonglow,* un gran éxito en el mercado japonés y en el americano. Sin embargo, el objetivo soñado son las rosas azules (Fig. 7.48), que parece que pueden generarse mediante el RNA de interferencia (**RNAi**, Cap. 10).

Por el momento, una gran mayoría de alemanes rechaza (todavía) los alimentos producidos genéticamente; sin embargo, al mismo tiempo, otro grupo está a favor de la biotecnología cuando se trata de temas de salud. Casi ningún diabético alemán rechaza la insulina, que se produce por manipulación genética.

Los **tomates** son el cultivo preferido de los agricultores y los consumidores: ¡en Alemania se consume casi medio millón de toneladas de tomates al año!

Los tomates transgénicos, que maduran más lentamente, tienen una piel más gruesa y contienen un 20% más de almidón, por lo que constituyen una fuente de alegría para los productores de *ketchup.* El tomate "antifofo" no madura hasta que los consumidores lo desean y no se pudre tan rápidamente (Figs. 7.49 y 7.50).

La empresa californiana Calgene Inc. tuvo una idea al respecto: hasta el momento, los tomates se recogen verdes para evitar que maduren y se reblandezcan antes de que lleguen al mercado. Se les inyecta etileno para que adquieran color rojo, pero no desarrollan un sabor verdadero. Por el contrario, en el caso del tomate transgénico, las frutas se quedan en la planta hasta que maduran.

El gen de la enzima **poligalacturonidasa** (PG) hace que la pared celular de los tomates primero se reblandezca y luego quede desprotegida frente a las bacterias. La enzima degrada la pectina (Cap. 2). El sentido de los frutos consiste precisamente en la rápida propagación de las semillas que contienen.

Ahora se ha "desconectado" el gen de forma selectiva y se han obtenido tomates *Flavr Savr*™ (que preservan el aroma). ¿Cómo se desconectan los genes? Se utiliza la **técnica *antisense*** (en inglés, contrasentido). Se trata de una nueva técnica de gran importancia, y por eso se explica con el ejemplo de la poligalacturonidasa (PG): el gen (en la doble hélice del DNA) de la PG se transcribe en el núcleo celular mediante la polimerasa a RNA mensajero de una hebra para la PG (RNAm de PG), luego logra llegar al ribosoma a través del citoplasma y seguidamente se traduce allí. Los aminoácidos correspondientes se combinan formando la proteína de la PG, la cual se pliega convirtiéndose en la enzima activa PG.

¿Cómo se puede evitar esto? Se introduce un gen sintético anti-PG en el DNA del núcleo celular, que

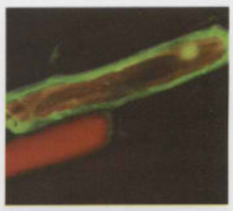


Fig. 7.46 En la transferencia genética de la proteína de fluorescencia verde (GFP), en las células vegetales se puede hacer bien visible el resultado, la expresión en la proteína.



Fig. 7.47 Claveles azules transgénicos por transferencia genética a partir de petunias (arriba a la derecha); abajo: el resultado de la transferencia genética.



Fig. 7.48 El primer resultado de Suntory en el campo de la biotecnología verde (arriba) y la representación de las rosas azules (abajo).







Fig. 7.49 Uno de los cultivos preferidos de la biotecnología verde y de los consumidores: los tomates.
Arriba: cartel de la empresa Calgene que hace propaganda para que se comprenda la tecnología del tomate *Flavr Savr*™.
Centro: los tomates se recogen verdes y maduran posteriormente.
Abajo: de momento, en China nadie quiere saber si estos tomates están manipulados genéticamente o no. Tienen un sabor "normal", pero sorprendentemente se conservan durante mucho tiempo.



Fig. 7.50 Originales protestas contra los alimentos genéticos (Greenpeace Attac) con "tomates gigantes de ocho metros".

al transcribirse se convierte en anti-RNAm de PG. Éste es complementario (o una imagen especular) del RNAm PG.

¿Qué sucede ahora cuando ambos se encuentran de camino hacia el ribosoma? ¡Ambos son hebras simples y se unen en una doble hebra! No obstante, el ribosoma ya no acepta una doble hebra y la célula lo degrada como "DNA extraño". ¡De esta forma se interrumpe la producción de PG!

Esta misma técnica *antisense* se utiliza cada vez más también para medicamentos. Así ha surgido una clase nueva de productos biotecnológicos. La empresa Isis Pharmaceuticals (Carlsbad, California) obtuvo en 1998 la autorización de la *Food and Drug Administration* (FDA) para fabricar el primer medicamento *antisense*, *Vitravene*®, con el principio activo formivirsen. Con éste se puede curar por vez primera la retinitis por citomegalovirus, una enfermedad de la retina en pacientes de sida, que si no se trata produce ceguera de forma irremediable. Actualmente también se están desarrollando medicamentos contra el cáncer y antiinflamatorios con la base *antisense* (Cap. 9).

7.17 ¿Son peligrosos los alimentos genéticos?

"Tomate genético, maíz genético, alimentos genéticos" –todos estos conceptos son confusos.

Todas las plantas que comen los hombres o los animales contienen, obviamente, genes o DNA. Con los alimentos "normales", cada individuo ingiere diariamente aproximadamente un gramo de DNA, con independencia de que este DNA provenga de animales, plantas o bacterias, y los seres humanos no lo modifican. Los genes o el DNA son, ante todo, información biológica. Como parte integrante de la alimentación constituye un producto químico inocuo que se descompone rápidamente en el estómago o en el intestino.

El **tomate antifofo** fue el primer alimento genético autorizado de la historia. La *Food and Drug Administration* (FDA) verificó si las características –no los métodos de producción– cumplían las normas de 1992 relativas a seguridad para el consumo.

El hecho de utilizar un gen para la resistencia frente a los antibióticos no constituía un riesgo de seguridad para la FDA, que opinaba que el tomate de Calgene no se diferenciaba de forma significativa de un tomate no manipulado y tenía las características esenciales de un tomate normal, es decir, que era tan seguro como un tomate cualquiera.

No obstante, finalmente, el tomate genético no tuvo éxito: no alcanzó una "incorporación amplia en el mercado". El tipo inicial no era de una calidad especialmente buena y los tomates madurados en la mata fueron dañados por las máquinas recolectoras, que estaban diseñadas para frutos duros y no maduros.

¿Pero qué sucede cuando un producto transgénico tiene verdaderamente mejor sabor y contiene menos pesticidas y más sustancias nutritivas (vitaminas, aceites) que los productos anteriores, además de ser más barato?

Ya se han producido **patatas transgénicas** (Fig. 7.51) con un contenido de amilopectina (almidón ramificado) un 25% mayor. La amilopectina es más adecuada para su procesamiento que la amilosa no ramificada.

En el Instituto Max Planck de fisiología vegetal molecular de Golm (Brandenburgo) se ha desarrollado un nuevo tipo de patata: gracias a la introducción de dos genes, en su tubérculo no sólo se forma almidón sino también hidratos de carbono especiales: el **fructano** (también denominado inulina). A estas fibras dietéticas, abundantes en las alcachofas y en la achicoria, se les atribuye un efecto beneficioso para la salud.

Por una parte, la patata con fructano aún está lejos de introducirse en el mercado, pero por otra parte constituye un organismo modelo interesante para la investigación de la seguridad.

El elemento básico es la fructosa, la cual se une en moléculas largas y en forma de cadena. Estos enlaces entre las unidades de fructosa no pueden romperlos las enzimas digestivas humanas.

La consecuencia es que, al contrario del almidón vegetal, los fructanos pasan por el estómago y el intestino delgado sin sufrir modificaciones. En el intestino grueso potencian el crecimiento de determinadas bacterias que se consideran útiles. Así pues, los fructanos son fibras dietéticas con un efecto probiótico: mejoran la flora intestinal por el hecho de potenciar las bacterias "buenas" a costa de las "malas". Esto no sólo favorece una buena digestión y una mayor absorción de ciertas sustancias minerales. Algunos estudios observaron incluso indicios de una mejora en los valores de lípidos en la sangre (menos colesterol) y un descenso del riesgo de cáncer de intestino grueso.

Mientras tanto, otros alimentos enriquecidos con fructanos o con otros oligosacáridos han obtenido un gran éxito en el mercado. En la mayoría de las ocasiones, tales yogures y postres lácteos combinan suplementos de fructano (*prebióticos*) con ciertas bacterias del ácido láctico "sanas", como el LC1 o las cepas de bífidus (*probióticos*), a fin de completar sus efectos positivos.

Después de que el Instituto Max Planck de Golm lograse encontrar los genes para las enzimas de la biosíntesis de fructano en el genoma de la alcachofa y los transfiriese al genoma de la patata, los tubérculos de la patata verdaderamente produjeron fructano –en su variante de cadena larga y especialmente estable en la digestión, como es típico en las alcachofas. Las patatas de Golm contienen hasta un 5% de fructano (en relación con la masa seca); de todas maneras, todavía faltan algunos años hasta que los consumidores puedan comprar en los comercios estas patatas nuevas para poder equilibrar la baja ingesta de inulina de su alimentación diaria.

Las **variedades de colza y soja transgénicas** con un mayor contenido en el aminoácido esencial lisina tienen más valor nutritivo. La colza transgénica, con un espectro modificado de ácidos grasos, se convierte en competidora de las palmeras de aceite: el ácido laurínico (C_{12}) es una materia prima importante para la fabricación de tensoactivo soluble en agua fría. Sólo se encuentra en el aceite de coco y en el de semillas de palmera. El aceite de semillas de colza transgénica contiene ahora ácido laurínico. Malasia, el principal productor de aceite de palma, ve esto como una amenaza real: ¿hay que cultivar colza en lugar de palmeras?

Las **remolachas resistentes a los virus** resisten al BNYVV (*beet necrotic yellow vein virus*) (Fig. 7.52), que ataca las hojas y reduce la producción de azúcar. Utilizan el truco del erizo en el cuento de los Hermanos Grimm: "¡Estoy aquí!", dicen alternativamente el erizo macho o su mujer, que es igual que él. Se introduce en la planta la información genética para una proteína envolvente del virus y se simula que ya ha sido atacada por el virus.

Se está trabajando en plantas resistentes contra la *Phytophtora infestans*, el patógeno del **mildiu de la patata**, que fue la causa de la hambruna en Irlanda en el siglo XIX. La *Phytophtora* pertenece a los oomicetos que obligaron a emigrar a los antepasados irlandeses de John F. Kennedy. La ironía de la historia es que sin el "hongo de la patata" Kennedy probablemente nunca se habría convertido en presidente de Estados Unidos. Las plantas transgénicas resistentes a los hongos producen celulasas que actúan contra las paredes de los hongos y las disuelven.

En el año 1999, en Franconia y en el Palatinado se autorizaron las **cepas de vid** modificadas genéticamente. El objetivo de los ingenieros genéticos es poder encontrar finalmente una estrategia eficaz contra los patógenos fúngicos, ya que constituyen un gran problema en la producción de vino, especialmente en los tipos tradicionales Riesling, Merlot y Chardonnay.

7.18 ¿Hay que identificar a los alimentos genéticos?

¿Hay que identificar a los alimentos genéticos? **Oliver Kayser**, de la Universidad de Groningen (Holanda), insiste con urgencia en que en la discusión se debe establecer la siguiente diferencia: «Nadie va a temer que se le ponga la cabeza roja cuando muerda un tomate, aunque, evidentemente, al consumir el tomate está consumiendo su genoma completo. [...] En principio, es cierto que la información del color rojo también la entiende la célula humana, pero no puede procesarla, ya que los elementos de control preconectados en el ser humano no funcionan».

Es decir, aunque se manipule un gen "fofo" del tomate, el ser humano no tiene las paredes celulares del tomate. No obstante, es obvio que las mezclas complejas de productos recombinados deberían identificarse claramente. El *ketchup* contiene tanto DNA extraño como las proteínas codificadas por este DNA. ¡O sea que hay que identificar! Por ejemplo, en el caso de azúcares muy refinados obtenidos a partir de remolachas resistentes a la barba de raíz, esto no estaba claro. Se creía que azúcar es azúcar. Por ello, a partir de 2005 entraron en vigor nuevas directrices de la UE (Cuadro 7.4 y lo más nuevo en www. transgen.de), no todas lógicas, pero un primer paso en la dirección correcta.

7.19 *Gene-Pharming* (granja de producción genética)

Las hormonas producidas por ingeniería genética, como la insulina y la del factor de crecimiento (Cap. 3 y 9), indican que no se puede renunciar a la biotecnología. Las necesidades ascienden de forma vertiginosa. Ahora se presenta un nuevo dilema: ¡no tenemos suficiente capacidad de producción!

Según un estudio de la compañía Arthur D. Little Inc. del año 2002, en la actualidad hay 1167 proteínas "en marcha" investigadas por los biotecnólogos, con un índice de crecimiento del 20%. El mercado para éstas era en el año 2005 de 42 000 millones de dólares americanos, y se calcula que en el año 2010 será de 100 000 millones.

A las "pobres" colibacterias y también a las células de los mamíferos se les exigirá demasiado en el futuro. Por ello, expertos como **Jörg Knäblein** (Schering AG, Berlín) están firmemente convencidos de que las plantas transgénicas ganarán la carrera (Cuadro 7.7).

¿Qué está a favor de esto? ¡Los costes! Las plantas se producen con unos costes entre 10 y 50 veces más baratos que *E. coli* e incluso 100 veces más baratos que las células de los mamíferos. Un invernadero







Fig. 7.51 Las patatas (arriba con flores blancas) producen fructanos.
Centro: preparación de patatas transgénicas cultivadas para pruebas de piensos para ganado.



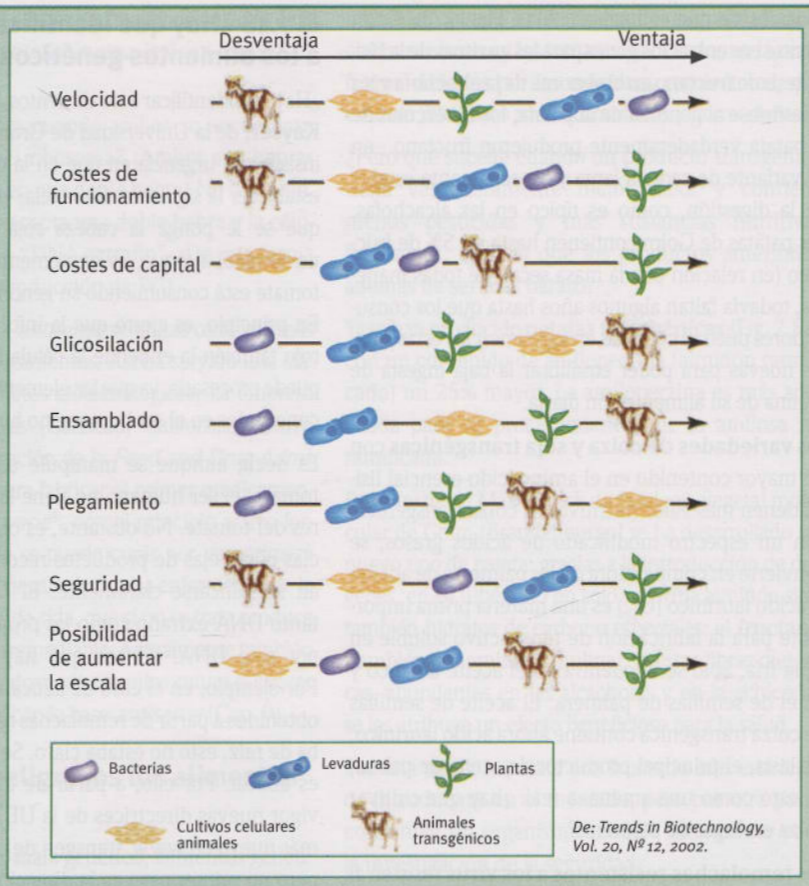
Fig. 7.52 Los tubérculos se pueden proteger contra los virus de las hojas.

Cuadro 7.7 Opinión de los expertos: Sistema de expresión vegetal –Una plataforma tecnológica "madura"

Actualmente, uno de cada cuatro medicamentos nuevos es un biofármaco cuyos principios activos se han producido en biorreactores: en bacterias, levaduras de cerveza, células de insectos o hámsters, animales o plantas. La cuota de mercado de estos principios activos crece enormemente. Sin embargo, mientras tanto ha quedado claro que la capacidad de la fermentación microbiana está limitada.

Sólo en anticuerpos se esperan ganancias de 8000 millones de dólares americanos en el año 2008. Diez anticuerpos monoclonales (ver Cap. 5) abarcan más del 75% de la capacidad de producción industrial. Sesenta nuevos anticuerpos monoclonales entrarán en el mercado en los próximos años. En total hay "en marcha" 1200 productos basados en proteínas. Para el año 2010 se prevé un mercado de 100 000 millones de dólares americanos. Actualmente se habla cada vez más a menudo de las plantas transgénicas que de los biorreactores.

En el análisis SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) se ve claramente por qué las plantas transgénicas son tan adecuadas como sistema de expresión para la fabricación de biofármacos: se pueden fabricar medicamentos en grandes cantidades de forma económica y relativamente rápida.



De: Trends in Biotechnology, Vol. 20, Nº 12, 2002.

Strengths (puntos fuertes):

- Descubrimiento de capacidades de producción adicionales.
- Elevado rendimiento de producción y de obtención de proteínas.
- Breve periodo de desarrollo hasta llegar a la proteína.
- Ventajas de seguridad: no hay patógenos humanos implicados.
- Líneas celulares estables: tienen una elevada estabilidad genética.
- Medio simple: agua, minerales y luz.
- Preparación sencilla (por ejemplo intercambiadores de iones).

Weaknesses (puntos débiles):

- Todavía no existe un medicamento autorizado (fase III).
- Todavía no existen directrices definitivas de las autoridades.

Opportunities (oportunidades):

- Se esperan menores costes y un mayor margen de beneficio.
- Se evitan atascos de producción.
- Glicosilación de las proteínas parecida a la humana (al contrario que las bacterias).

Threats (peligros):

- Contaminación de la cadena alimentaria.
- Escape de DNA.

Los "medios" (en principio agua y sales nutritivas) son económicos y están exentos de gérmenes (patógenos, virus, priones, etc.), y las plantas son muy resistentes en cuanto a las condiciones de cultivo. Por ejemplo, el musgo transgénico produce grandes cantidades de la proteína deseada a temperaturas de 15 hasta 25 °C, y con valores de pH de 4 a 8.

El socio colaborador de Schering, ICON Genetics, de Halle, cultiva plantas de tabaco manipuladas genéticamente para producir tres biofármacos que hasta ahora se producían en cultivos bacterianos o celulares. La primera proteína es un principio activo que ya se encuentra en el mercado; para la segunda va a presentarse próximamente la solicitud de autorización como fármaco contra la



Fig. 7.53 Los tomates transgénicos deberían poderse reconocer claramente, por ejemplo, tiñéndolos de azul.

cuesta 10 dólares americanos por metro cuadrado, en comparación con los 1000 que cuesta el metro cuadrado de cultivos de células animales. Un biorreactor de 10 000 litros para bacterias cuesta entre 250 000 y 500 000 dólares americanos y tarda cinco años en ponerse en funcionamiento (Cuadro 7.7). Por una parte, los animales transgénicos (Cap. 8) pueden producir medicamentos en la leche de forma ventajosa, pero los criadores de animales albergan serias dudas y los últimos contratiempos hacen que la expansión de la tecnología parezca cada vez menos factible. ¡Por el contrario, con las plantas no hay problemas éticos ni emocionales! Así pues, en las plantaciones farmacéuticas también crecen fármacos.

Las células vegetales tienen otra ventaja decisiva: las proteínas complicadas de los seres más complejos todavía se modifican en la célula después de producirse. Por ejemplo, se añaden azúcares complejos sin los cuales algunas proteínas no son activas

enfermedad de Crohn; la tercera se encuentra en fase de desarrollo clínico. El sistema de expresión viral de ICON Genetics se representa en la figura e ilustra claramente cómo el virus ha infectado la mayor parte de las células de las hojas al cabo de pocos días. Estas células se ven verdes con luz UV porque expresan proteína de fluorescencia verde (GFP, ver Cap. 8).

A menudo los biofármacos son demasiado grandes y demasiado complejos para su síntesis química. En la mayoría de los casos se trata de moléculas de proteína de cadena larga que deben estar plegadas correctamente y llenas de azúcares y otras moléculas para poder ser efectivas como anticuerpos, enzimas, sustancias mensajeras o vacunas.

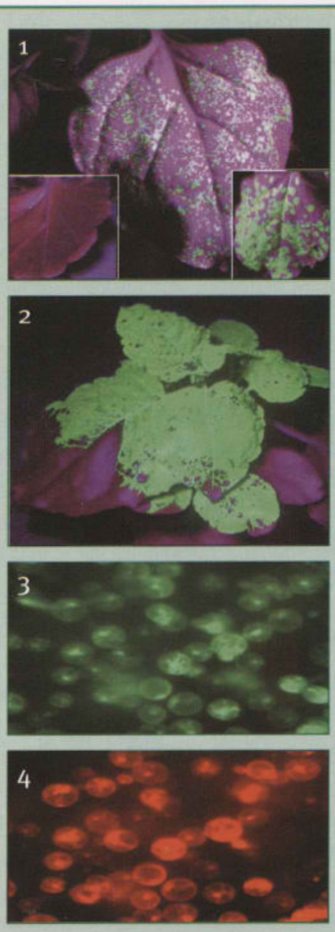
Para mí, como responsable de química microbiológica en Schering, el encanto discreto del musgo, el maíz y el tabaco radica en que disponen de un aparato de síntesis más complejo que las bacterias, su producción sería imbatiblemente económica y los medicamentos fabricados de este modo tienen la garantía de estar exentos de gérmenes animales.

Sin embargo, en las hierbas también se esconde el demonio: las plantas tienen también claramente otras preferencias de azúcar cuando se trata de la síntesis de proteínas. Además, las plantas manipuladas genéticamente entrañan el peligro de que pueden transmitir los genes manipulados a otras plantas accidentalmente.



La GFP (verde) y la DSRED (roja) son las dos proteínas fluorescentes que se pueden utilizar para controlar la expresión genética.

Los investigadores de ICON Genetics han solucionado estos problemas de una forma elegante. Impiden la propagación de los genes, por ejemplo, no introduciendo permanentemente las instrucciones de formación de los medicamentos en el material hereditario de las plantas. Un efecto secundario alentador es que la producción de los principios activos funciona de este modo al máximo rendimiento.



Sistema de expresión viral en un experimento: la GFP (verde) y la DSRED (roja) son las dos proteínas fluorescentes que pueden expresarse juntas.

Los procesos innovadores de la empresa tienen como objeto la precisión, la velocidad, la expresión controlada y la seguridad en el contacto con los productos transgénicos introducidos en la planta.

El sistema magnICON es adecuado para un ensamblado rápido de genes/vectores y una optimización, al igual que para la expresión de alto rendimiento vegetal (*high throughput expression*) para una explotación óptima. Además, ICON ofrece el sistema lexICON, que permite marcar con claridad las plantas modificadas genéticamente ("código de barras DNA").

La proteína de fluorescencia roja procedente de la anémona marina indopacífica *Discosoma species* y la proteína de fluorescencia verde (GFP) (ver Cap. 8) son marcadores ideales para la expresión genética.

En la figura se ilustra la expresión: en la fotografía 1 se ve la planta poco después de la infección viral; en la fotografía 2 después de aproximadamente una semana. Con luz UV se reconoce que casi todas las células de la hoja fabrican GFP. Las fotografías 3 y 4 representan el mismo corte. Al microscopio se reconoce que las mismas células expresan tanta GFP (verde) como DSRED (roja).

Esto significa que una célula se puede transformar de forma doble. De este modo, por ejemplo, se podría fabricar en una célula tanto la cadena ligera de un anticuerpo como la cadena pesada. Una célula así también podría expresar funcionalmente un anticuerpo completo consistente en una cadena ligera y una cadena pesada.

Así que veo el futuro lleno de esperanza. Hace unas pocas semanas recibí las primeras pruebas de proteínas de Halle. Siempre y cuando los ensayos clínicos funcionen según lo previsto, los mismos principios activos, aunque procedentes de plantas, podrán sustituir en parte a los medicamentos actuales en un futuro no muy lejano.



El Dr. Jörg Knäblein, Jefe de Química Microbiana de Schering AG en Berlín.

(Cap. 4). ¡Las bacterias no tienen esta capacidad! ¿Qué se puede hacer entonces?

Los anticuerpos ya pueden fabricarse en plantas en grandes cantidades: los llamados ***plantibodies*** (del inglés, *plants* y *antibodies*). Ya se producían anticuerpos contra la adhesina de las bacterias de la caries (*Streptococcus mutans*) en el tabaco transgénico. También se probó con éxito producir vacunas en patatas y plátanos: el consumo de patatas con una proteína de algunas cepas de *Coli* que produce diarrea (enterotoxina B) protegió a voluntarios humanos de forma efectiva contra los molestos efectos secundarios del ataque de las bacterias. Podemos imaginar que comemos un "tomate anticaries" (Fig. 7.53). Sin embargo, aquí habría que plantear de inmediato la pregunta de la seguridad (¡dosificación!). Se deberían identificar las plantas de forma llamativa; por ejemplo, los tomates deberían ser incoloros o ser de otro color. ¿Qué tal el azul?



Fig. 7.54 En un futuro podría evitarse el asentamiento de bacterias de la caries (*Streptococus mutans*) con anticuerpos en tomates transgénicos o en plátanos.

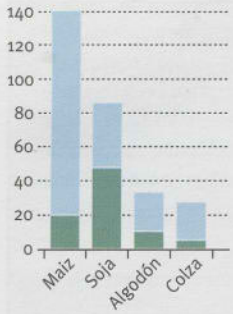


Fig. 7.55 La proporción de plantas transgénicas (verde) crece de forma constante (en millones de toneladas).





Fig. 7.56 Se transfirieron genes del narciso (arriba) y de la bacteria *Erwinia* al arroz para crear el "arroz dorado" con un elevado contenido en provitamina A. Ingo Potrykus (abajo) fue su creador.



Fig. 7.57 En Alemania cada vez se cultiva más la colza. Con la colza transgénica se produce el PHB. Sin embargo, el problema técnico lo constituye la fabricación del PHB procedente de la planta.

7.20 Plantas transgénicas – Un debate acalorado

La discusión sobre las plantas transgénicas y los alimentos transgénicos continúa. Los principales argumentos en contra son más bien de naturaleza política y difíciles de refutar: velan de forma masiva por los intereses de las grandes empresas y de los grandes agricultores, y hacen que los pequeños agricultores sean aún más dependientes. Socavan la agricultura sostenible y alternativa. Sin embargo, frente a esto se puede argumentar que tanto los grandes como los pequeños agricultores, incluso en los países en vías de desarrollo, han decidido cultivar estas plantas porque, a pesar de los elevados costes de las semillas, prometen ventajas económicas en última instancia.

Mediante la *Arabidopsis thaliana* transgénica se produce en la colza un verdadero producto ecológico: el **polihidroxibutirato** (PHB) –un polímero biodegradable (ver Cap. 6). Este bioplástico desaparece por completo del medio ambiente después de algún tiempo porque se lo comen las bacterias.

Mientras tanto, los genes de la biosíntesis de *Ralstonia eutropha* se han logrado expresar en *Arabidopsis thaliana*–uno de los objetos preferidos de los ingenieros genéticos de plantas– y hacen que la producción de PHB sea cada vez más económica y atractiva.

Casi 2400 millones de seres humanos se alimentan principalmente a base de arroz. Quien coma casi en exclusiva arroz corre el riesgo de padecer graves carencias, porque la vitamina A, el hierro, muchos oligoelementos e importantes proteínas no se encuentran en los granos blancos. Aproximadamente 800 millones de personas en el mundo entero sufren una **deficiencia aguda de vitamina A**. Su vista se debilita cada vez más, y lo mismo ocurre con el sistema inmunitario, la formación de sangre y el crecimiento del esqueleto. Los científicos estiman que ésta es la causa de dos millones de muertes al año y de que medio millón de niños se queden ciegos cada año por falta de vitamina A. A eso hay que añadir los síntomas muy extendidos debidos a carencias de hierro: para 1800 millones de mujeres, sobre todo en el Tercer Mundo, la anemia es inevitable.

Ingo Potrykus (Fig. 7.56), de la Escuela Técnica Superior Confederada (ETH) de Zurich, y su colega alemán **Peter Beyer** (Universidad de Freiburg), consiguieron desarrollar el **"arroz dorado"**. Ambos investigadores entregaron sus resultados al *International Rice Research Institute* (IRRI) de Manila para su uso gratuito. La opinión pública de Europa quedó fascinada con el "arroz dorado". En sus granos dorados brillantes contiene caroteno (provitamina A), un precursor previo a la vitamina A, en concentraciones elevadas. Para ello transfirieron los genes de la campanilla de Pascua (*Narcissus pseudonarcissus*) y de un hongo (*Erwinia uredovora*; ya conocemos la *Erwinia* por la síntesis de la vitamina C del Cap. 4).

La empresa Zeneca había anunciado –un caso especial en el sector de la ingeniería genética– que las simientes de este "arroz dorado" se entregarían gratuitamente a los pequeños granjeros de países en vías de desarrollo. Esto pareció primordial para los críticos. Sin embargo, se inició un debate inesperadamente intenso, que aún dura en la actualidad.

Un equipo de investigadores de la empresa de biotecnología Syngenta ha desarrollado una nueva variante de "arroz dorado" que contiene 23 veces más β-caroteno que el primero.

Los científicos del equipo de **Rachel Drake,** en el Centro de Investigación Internacional británico Jealott's Hill, de Bracknell, añadieron en el año 2005 un gen de maíz al genoma del arroz. Con la ayuda de la proteína codificada, las plantas de arroz produjeron provitamina A. Los investigadores dicen que el "arroz dorado II" podría cubrir aproximadamente la mitad de las necesidades diarias de vitamina A.

Existen otros proyectos que aquí únicamente mencionaremos: el café sin cafeína (el 20% de todos los habitantes de la Tierra toman descafeinado), álamos que acumulan metales pesados, y plantas de cultivo resistentes a la sequía y a la sal.

7.21 ¿Palmeras tropicales en Alemania?

¿En el futuro podremos tener palmeras tropicales en los jardines que resistan el invierno alemán?

El 24 de abril de 1987, a las 6:45 h, **Julie Lindemann**, una joven científica, escribió una página en la historia de la biotecnología. Caminó con paso seguro vestida con un traje espacial por un campo de fresas californiano y pulverizó un caldo de bacterias anticongelantes: por vez primera se liberaban microbios manipulados genéticamente con permiso de las autoridades estatales. De este modo finalizó una disputa que había durado muchos años sobre la liberación al entorno de seres modificados genéticamente. La historia de las bacterias anticongelantes se inició en 1980 en el laboratorio de la Universidad de California, en Berkeley.

Desde hacía mucho tiempo se sabía cómo las plantas sufren daños por las heladas: se forman cristales de hielo en las hojas y en partes de la planta que destruyen el tejido vivo. La novedad era que las bacterias desempeñasen un papel clave en ello. Esos seres

Cuadro 7.8 Historia de la biotecnología: Bacterias anticongelantes –La historia de su liberación

En abril de 1983, las autoridades sanitarias de Estados Unidos, cuya comisión de asesoramiento decide sobre experimentos de ingeniería genética, dieron luz verde a los experimentos al aire libre con bacterias anticongelantes. Sin embargo, no se tuvo en cuenta a la opinión pública americana. Algunos ciudadanos acudieron a los tribunales y criticaron que no se habían hecho estudios ecológicos amplios: ¿quién garantiza que las malas hierbas y los parásitos de las plantas no se benefician también de las bacterias protectoras de la congelación? ¿Se altera el equilibrio biológico? Una vez se han liberado microbios al medio ambiente, no se puede volver atrás. Ni siquiera se descartaron modificaciones climáticas.

En mayo de 1984 se decidió prohibir los experimentos al aire libre con organismos modificados genéticamente. Debía presentarse un dictamen ecológico en el cual se equilibraran las ventajas y los riesgos para el medio ambiente. En vista de ello, los investigadores siguieron experimentando en el laboratorio y en los invernaderos, y se pudieron rebatir algunos puntos críticos.

Sin embargo, mientras tanto la Universidad de California concedió una licencia a la empresa vecina Advanced Genetic Sciences (AGS). Según el derecho americano, la empresa no estaba afectada por la prohibición judicial, que sólo era válida para instituciones gubernamentales, como universidades. AGS planificó esparcir bacterias anticongelantes sobre 2400 plantas de fresas de un campo de la localidad de Salinas, para luego observarlas cuidadosamente durante tres meses. Si las bacterias traspasaban la zona de protección en un radio de 15 y 30 metros, se combatirían con antibióticos.

Entonces intervinieron las autoridades medioambientales, pero en noviembre de 1985 autorizaron el experimento. A consecuencia de esto, los habitantes de Salinas opusieron resistencia. Rechazaron los experimentos de campo por considerarlos demasiado arriesgados. Además, se filtró la información de que AGS ya había rociado clandestinamente árboles frutales con bacterias anticongelantes en la gran azotea de la empresa antes de obtener el permiso para realizar el experimento de campo. Así que el escándalo fue perfecto: las autoridades medioambientales retiraron a la empresa el permiso por tiempo ilimitado y le impusieron una multa de 20 000 dólares.

En ese momento la empresa tuvo que hacer experimentos adicionales y redactar dictámenes periciales. En un experimento en un invernadero se pulverizaron fresas con diferentes concentraciones de bacterias *Iceminus* y con bacterias normales. No obstante, ninguna de las cepas de bacterias obtuvo ventaja alguna en el tiempo sucesivo. Pero esto también significaba que no se podía descartar de forma absoluta una propagación descontrolada.



Los copos de nieve están formados por muchos cristales y son mayores cuanto más elevada es la temperatura cuando nieva.

Finalmente, en 1987, AGS cumplió las imposiciones de las autoridades medioambientales de Estados Unidos. Por una parte, y a pesar de las instalaciones de protección modernas, se arrancó una parte de las plantas de fresas poco antes de la primera prueba, aunque ésta discurrió de forma satisfactoria. **Julie Lindemann** se paseó de forma decorativa por los campos. No se encontraron microbios manipulados fuera de la zona de seguridad de 30 metros. Ni siquiera se propagaron las bacterias por los 15 metros de ancho.

En 1992, Frost Technologies Corporation registró ante la EPA una mezcla de tres cepas de *Pseudomonas* ("Frostban B") para controlar las heladas. Sin embargo, la EPA insistió en registrar el Frostban como pesticida, ya que hace disminuir las bacterias naturales. En aquel momento parecía que los costes habían detenido el proyecto.



Las bacterias se utilizan como gérmenes de cristalización para los cristales de hielo.

Por lo demás, en Europa se liberaron virus manipulados genéticamente en septiembre de 1986, concretamente para verificar la seguridad de los experimentos de ingeniería genética: los baculovirus suelen aniquilar a la oruga del pino, un parásito del bosque. Virólogos de Oxford colocaron en el material hereditario del virus un fragmento de DNA de 80 pares de bases de longitud, el cual sólo sirve para marcar genéticamente los virus y no modifica el metabolismo. El destino de los microorganismos liberados debía seguirse de ese modo en el campo. Las orugas parásitas se infectaron con virus "marcados". Ni las orugas ni las mariposas que salen de los capullos podían atravesar las redes del campo de pruebas. Cuando los experimentos son satisfactorios, en los Baculovirus debe introducirse el gen para un insecticida adicional y un "gen suicida" que se ocupa de que los virus mueran una vez realizado su trabajo.



¿Podrán crecer palmeras en el jardín invernal de nuestra diseñadora gráfica en el futuro?

ven a menudo como centros de cristalización para los cristales de hielo. El agua del grifo se hiela a 0 °C; por el contrario, el agua muy depurada y destilada puede helarse hasta a –15 °C, siempre y cuando no contenga impurezas que sirven como centros de cristalización. Hay una bacteria en especial que forma cristales y que está muy extendida en la naturaleza: *Pseudomonas syringae*. Los biotecnólogos **Steven Lindow** (Fig. 7.58) y **Nikolas Panopoulos** hicieron la prueba con este ejemplo: investigaron plantas normales atacadas con *Pseudomonas* en una cámara climática a temperaturas inferiores al punto de congelación. A –2 °C empezaron a aparecer los primeros daños por heladas. Las plantas cuyas bacterias se habían matado soportaron temperaturas de –8 °C e incluso de –10 °C sin sufrir daños.



Fig. 7.58 Steven Lindow.



Fig. 7.59 Las palmeras de las zonas frías pueden protegerse con bacterias anticongelantes.





Fig. 7.60 Publicidad de las bacterias *Pseudomonas* muertas y nieve artificial "Snowmax".



Fig. 7.61 Estudiantes de la Universidad de Innsbruck investigan la flora alpina. ¿Seguirá habiendo suficiente nieve en el futuro?

Por supuesto que no es realista en absoluto pretender matar todas las bacterias de las plantas de cultivo al aire libre. Por consiguiente, ambos investigadores buscaron las causas de que los microbios se convirtiesen en **bacterias congelantes**. Descubrieron que el tamaño de sus partículas de polvo no basta, sino que una proteína especial en la superficie de estos seres diminutos causa la formación de cristales de hielo. Si se pudiera cortar el fragmento de la cadena de DNA de las bacterias congelantes que contiene la orden de formar proteína congelante, también perderían su capacidad de formar cristales de hielo. Exactamente esto es lo que lograron Lindow y Panopoulos mediante manipulación genética.

A continuación poblaron plantas con las nuevas **bacterias anticongelantes**: ¡preservaron a sus huéspedes de los daños por heladas! Otros experimentos a mayor escala en el laboratorio demostraron que bastaba con pulverizar un líquido que contuviera bacterias anticongelantes sobre las plantas. Los microbios manipulados genéticamente eliminan entonces a los naturales. Este líquido de pulverizado se puede fabricar a bajo coste y en grandes cantidades en biorreactores.

Se abren perspectivas muy atractivas. Por ejemplo, en regiones septentrionales se podría cultivar una gran cantidad de plantas que hasta ahora sólo podían crecer en regiones más cálidas. Y lo que también es importante, se podrían reducir los daños por heladas (Fig. 7.59). Sin embargo, quedaba abierta una pregunta decisiva: ¿cómo se comportan los microbios creados en el medio ambiente? (Cuadro 7.7). Finalmente se interrumpió el proyecto.

7.22 Las bacterias de los cañones de nieve aseguran las vacaciones de esquí

Mientras tanto, los avispados directores de AGS tuvieron una idea: vendieron las bacterias congelantes naturales, producidas masivamente en biorreactores y luego eliminadas, con el nombre de "Snowmax" para producir nieve artificial (Fig. 7.60).

Las bacterias muertas se añaden al agua de los cañones de nieve. La producción de nieve con "Snowmax" aumenta un 45%. Además, "Snowmax" ahorra energía frigorífica. No hay ninguna autoridad en Estados Unidos que prohíba liberar microbios naturales no manipulados.

De momento, el negocio de la nieve artificial de "Snowmax" está floreciendo. Por cierto, las bacterias congelantes muertas salvaron las Olimpiadas de Invierno de 1988 de Calgary (Canadá) debido a una ola de calor inesperada.

Ya a principios de los años 1990, unos estudios en Suiza pusieron en duda la rentabilidad de las zonas de esquí situadas a baja altura (Fig. 7.61).

En el futuro, esta situación se seguirá agravando a la vista de los cambios climáticos. Sólo un 44% de las zonas de esquí suizas se pueden considerar como zonas de nieve segura en un futuro. Esto afecta a la totalidad de los Alpes. Incluso zonas de esquí tan grandes y significativas como Kitzbühel (Tirol) ya no pueden garantizar una temporada de esquí ininterrumpida. Un estudio actual de la Universidad de Graz (Austria) indica que la mitad de las zonas de esquí austriacas tendrá que luchar contra una gran falta de nieve en el año 2050. A pesar de las protestas vehementes, "Snowmax" está autorizado oficialmente en Suiza desde 1997.

Bibliografía utilizada y aplicada

- Libro decisivo y con continuación, un manual con mucha información: Kempken F, Kempken R, Stockmeyer K (2003) Gentechnik bei Pflanzen, Chancen und Risiken. 2. Aufl. Springer, Berlín
- La obra estándar para los investigadores de plantas, "el Strasburger": Sitte P, Ziegler H, Ehrendorfer F, Bresinsky A (1998) Strasburger. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 34. Aufl. Fischer, Stuttgart
- Buena introducción general, con un capítulo sobre biotecnología verde: Schellekens H et al. (1993) Ingenieure des Lebens. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Complementario a este libro *Biotecnología para principiantes*: Brown T A (2002) Gentechnologie für Einsteiger. 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlín
- Todavía la mejor introducción a la ingeniería genética en todos los ámbitos: Watson J D, Gilman M, Witkwski J und Zoller M (1993) Rekombinierte DNA. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- El compendio de ingeniería genética y biotecnología que constituye la obra estándar de los farmacéuticos en alemán: Dingermann T (1999) Gentechnik Biotechnik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Una buena introducción estadounidense: Thiemann W J, Palladino M A (2004) Introduction to Biotechnology. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco
- Bioquímica pura y muy bien ilustrada, "el Stryer": Berg J M, Tymoczko J L, Stryer L (2007) Bioquímica. 6. ed. Editorial Reverté, Barcelona.
- Investigación precisa, algo árida para principantes: Menrad K, Gaisser S, Hüsing B, Menrad M (2003) Gentechnik in der Landwirtschaft, Pflanzenzucht und Lebensmittelproduktion. Physica-Verlag, Heidelberg

Enlaces de web

- Spirulina: *www.biothemen.de/Qualitaet/algen/spirulina.html*
- La polémica del "arroz dorado": „The False Promise of Genetically Engineered Rice", en *www.greenpeace.org/~geneng/*
- Dieter Kiel, en: Das Parlament. Deutscher Bundestag (Hrsg.): *www.das-parlament.de/2001/44/Panorama/2001_44_040_6817.html*
- La mejor fuente de información en lengua alemana sobre plantas transgénicas: *www.transgen.de*
- Todo sobre bioseguridad: *www.biosicherheit.de*
- DECHEMA acerca de ingeniería genética y biotecnología: *www.dechema.de/deutsch/isb/isbo.htm*
- Monsanto: *www.monsanto.de/*
- Revista en Internet sobre biotecnología: *www.lifescience.de/*
- Una página web fantástica acerca de los libros antiguos de biología del Dr. Kurt Stüber del MPI para investigación de cultivos en Colonia. 90 880 páginas escaneadas de 343 libros para bibliófilos: *www.biolib.de*
- Botánica *online* por el profesor Peter Sengbusch: *www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/*
- Golden Rice project homepage: *www.goldenrice.org/index.html*
- International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA) *www.isaaa.org*

Ocho preguntas de autoevaluación

1. ¿Por qué las zonas con hambre no se autoabastecen "sencillamente" con granjas de algas?
2. ¿En qué fracasó la buena idea de obtener proteínas a partir del petróleo? ¿Qué bioproducto sirve para una alimentación sana y es un resultado tardío de esta investigación de la proteína unicelular?
3. ¿Cómo se denominan las bacterias que causan tumores de raíz y cuello, y cómo se pueden utilizar para la transferencia genética en las plantas?
4. ¿Funciona esta transferencia genética (de la pregunta 3) también para el maíz y el arroz? ¿Cuál es la solución?
5. ¿Es la clonación de las plantas totalmente nueva e inventada por los ingenieros genéticos?
6. ¿Qué principio se utilizó para crear el tomate "antifofo"? ¿Qué enzimas se inhiben de forma selectiva?
7. Nombre tres productos vegetales transgénicos "bienintencionados" según la ciencia.
8. ¿Cuál es la relación entre daños por heladas en las plantas y un ataque bacteriano? ¿Qué son las bacterias anticongelantes?

Embriones, clones y animales transgénicos

8.1 Inseminación artificial 204

8.2 Transferencia embrionaria y fecundación artificial 204

8.3 Las especies en peligro de extinción y amenazadas se pueden salvar mediante la transferencia embrionaria 205

8.4 Las quimeras tienen como mínimo cuatro padres genéticos 206

8.5 Animales transgénicos: ¿del ratón gigante al toro gigante? 207

8.6 Hormonas del crecimiento para bovinos y cerdos 208

8.7 *Gene-Pharming*: valiosa proteína humana a partir de huevo y leche 209

8.8 Peces transgénicos: del *GloFish®* a la trucha gigante 211

8.9 Ratones *knock out* 214

8.10 Xenotrasplantes 215

8.11 Clonación –Producción masiva de gemelos 215

8.12 Clonación de salamandras y ranas 219

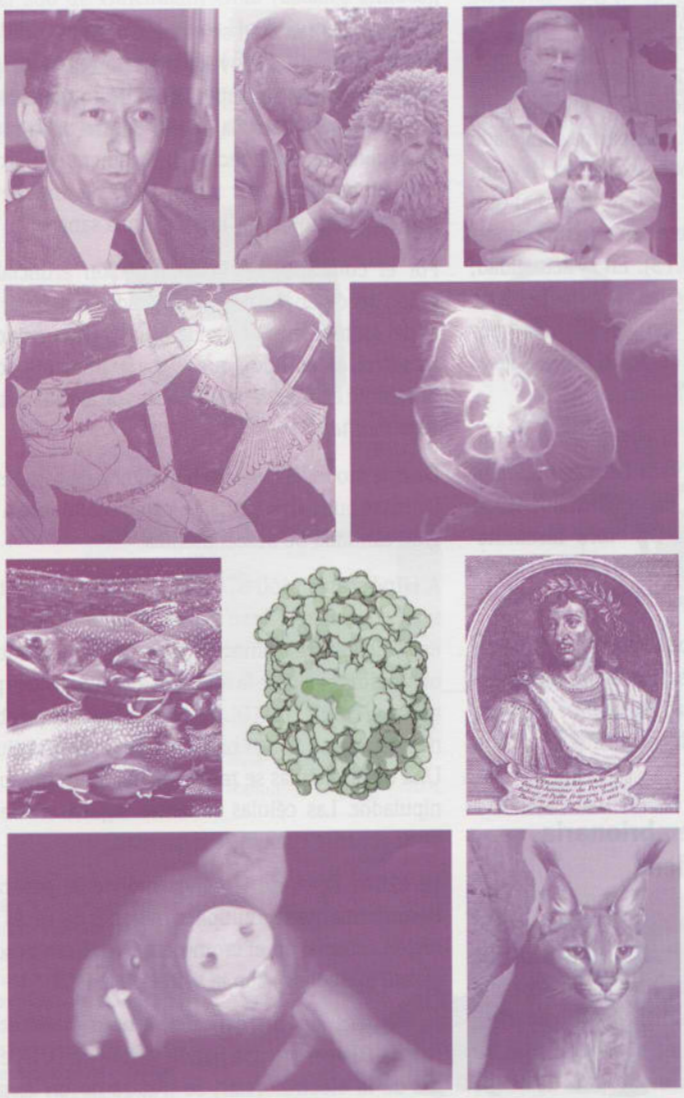
8.13 Dolly –El descubrimiento decisivo en la clonación 219

8.14 Dificultades de la clonación 221

8.15 Clonación de gatos –Las diferentes variantes de progenitores 222

8.16 ¿Y el ser humano? Clonación, FIV y DPI 223

8.17 El embrión cristalino y el proyecto del genoma humano 224



Capítulo 8

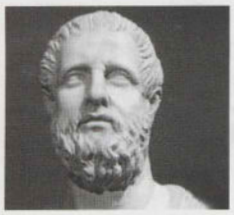


Fig. 8.1 Hipócrates (460-370 a.C.).



Fig. 8.2 En tiempos de Goya (1746-1827) los perros ya se inseminaban artificialmente.









Fig. 8.3 Inseminación artificial en los perros. De arriba a abajo: una hembra Golden Retriever fue inseminada artificialmente en Alemania por un mastín finlandés. El semen se envió congelado por servicio de mensajería. Control de la inseminación a través del monitor. Perra feliz con sus cachorros.

8.1 Inseminación artificial

La **inseminación artificial** de bóvidos que hoy se practica casi constantemente en todos los países industrializados es una forma convencional de transmitir cualidades valiosas de unos pocos toros sementales.

Ya hacia 1780, **Lazarro Spallanzani** (1729-1799, Cap. 2) describió la inseminación artificial en la cría de perros (Fig. 8.2). Por cierto, en Alemania, para la mayoría de las asociaciones de criadores de perros es obligatorio aparear a la perra una vez de forma normal antes de realizar una inseminación de este tipo. Así se evita que ya no sea posible una "monta natural" (lo cual es normal en la cría de bóvidos y en Estados Unidos también se tiene en cuenta para los perros) (Fig. 8.3) –los animales ya no se pueden aparear de forma natural.

En 1942 se creó en Alemania el primer centro de inseminación para bóvidos. En los años 1950 se desarrollaron técnicas para conservar esperma de toro en **nitrógeno líquido** (**–196 °C**), una revolución en la cría de animales. El esperma congelado se podía enviar entonces a todos los países. Hay una gran diferencia entre enviar un toro fogoso al otro lado del Atlántico o un paquete con esperma congelado de toro (Figs. 8.11 a 8.13). En la actualidad, aproximadamente el 90% de las vacas lecheras de los países industrializados son engendradas por fecundación artificial. En los cerdos el porcentaje es de aproximadamente un 60%.

El método es rentable: de la eyaculación de un semental que monta a una vaca falsa se obtienen 400 porciones de semen con 20 millones de espermatozoides cada una. Un "toro inseminador" sustituye aproximadamente a mil "toros de monta natural".

En los últimos 40 años, la producción de leche se ha incrementado de forma espectacular sin usar ingeniería genética (!). En la década de 1950, una vaca lechera daba 1000 litros de leche al año, y hoy son 8000 litros o más.

8.2 Transferencia embrionaria y fecundación artificial

Mediante la fecundación artificial se ha conseguido que para criar se utilice exclusivamente esperma de toros de gran valor. Sin embargo, ni siquiera una vaca fecundada de forma artificial con características sobresalientes puede traer al mundo más de un ternero, o como máximo dos, después de nueve meses. Por supuesto, el criador preferiría que una vaca así pudiera engendrar muchas más crías en poco tiempo (Fig. 8.11).

Las hormonas hacen que esto sea posible: la hormona gonadotropina inyectada produce una maduración simultánea de varios óvulos **(superovulación)**, que se **fecundan artificialmente.** Los embriones que aparecen posteriormente se pueden extraer sin dificultad del útero con un catéter o se pueden obtener por ultrasonidos mediante una punción folicular sin sangre. Se generan hasta ocho embriones válidos para la transferencia, de los cuales se engendra una media de cuatro terneros en madres de alquiler.

Para una conservación más larga se pueden congelar embriones (y también esperma) en nitrógeno líquido y guardarse prácticamente sin límite de tiempo. Después de descongelarse, dos tercios de los embriones seguirán siendo aptos para la transferencia embrionaria.

En este caso también se elimina el transporte caro y estresante de una vaca de primera clase para encontrarse con un supertoro. Puesto que además el ternero se desarrolla entero dentro de la madre de alquiler, también recibe directamente su protección inmunitaria. Por tanto, ya tiene anticuerpos contra "enfermedades locales" en la sangre.

Por el contrario, en la fecundación artificial, la unión del óvulo y el espermatozoide tiene lugar fuera del animal en un tubo de ensayo **(fecundación *in vitro*)**. El embrión que crece se implanta posteriormente en las nodrizas (madres de alquiler, *surrogate mothers*).

De este modo, el material hereditario de toros excelentes se puede transferir de forma económica a una gran cantidad de descendientes.

A **Hipócrates** (460-370 a.C., Fig. 8.1) ya le interesaba controlar el sexo de los descendientes. Hoy es posible **determinar el sexo** de los embriones obtenidos mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Cap. 10). En primer lugar, los embriones de toro se llevan hasta la fase de ocho células. Una de las células se retira mediante un micromanipulador. Las células restantes siguen creciendo normalmente cuando se implantan.

Se extrae DNA de la célula individual separada. Posteriormente se multiplica millones de veces una región especial en el cromosoma Y (el cromosoma sexual masculino) con la ayuda de la PCR.

Si después de marcar con bromuro de etidio (Cap. 10) aparece una banda visible de DNA en el gel de la electroforesis, se tratará de un ternero macho; si no aparece la banda, el embrión será

el de una ternera hembra. En el caso de los seres humanos, un **diagnóstico de implantación prenatal** (PID) de este tipo está muy cuestionado (ver más abajo).

Con la ayuda del diagnóstico de implantación prenatal, los granjeros productores de leche pueden obtener de forma selectiva terneras hembra, mientras que por el contrario, los productores de carne prefieren terneros macho. En la actualidad ya se pueden comprar en catálogos de Internet embriones de toro "clasificados según el sexo" para transferirlos a madres de alquiler (Fig. 8.13).

8.3 Las especies en peligro de extinción y amenazadas se pueden salvar mediante la transferencia embrionaria

En el zoo de Cincinnati, Ohio (Estados Unidos), se utilizaron en 1984 vacas Holstein como madres de alquiler del escaso gaur (*Bos gaurus*). En Kenia se utilizaron los abundantes alces (*Taurotragus oryx*) como madres de alquiler para restablecer la población del escaso antílope bongo (*Tragelaphus euryceros*) (Fig. 8.6). Los embriones congelados de antílope bongo volaron del zoo de Cincinnati a Kenia; por el contrario, los embriones de bongo salvaje se llevaron del Monte Kenia a Ohio para ser implantados en alces y vacas. Al mismo tiempo, los embriones de bongo de Estados Unidos se implantaron en los bongos aún salvajes de Kenia. Después de nacer y ser liberados, son monitorizados mediante emisores de radio en miniatura.

El Instituto Audubon de Nueva Orleans también ha alcanzado éxitos espectaculares con el lince africano, el caracal (*Felis caracal,* también *Caracal caracal*) (Fig. 8.7). El lince de orejas de pincel puede verse en la portada de este libro.

Hay una gran cantidad de especies de animales amenazadas en la lista de los expertos de los zoos: en Hong Kong tuvo lugar una primera fecundación artificial espectacular con delfines (Fig. 8.5). Más adelante se describirá la tan discutida clonación, que puede producir tantas copias idénticas de un animal como se desee.

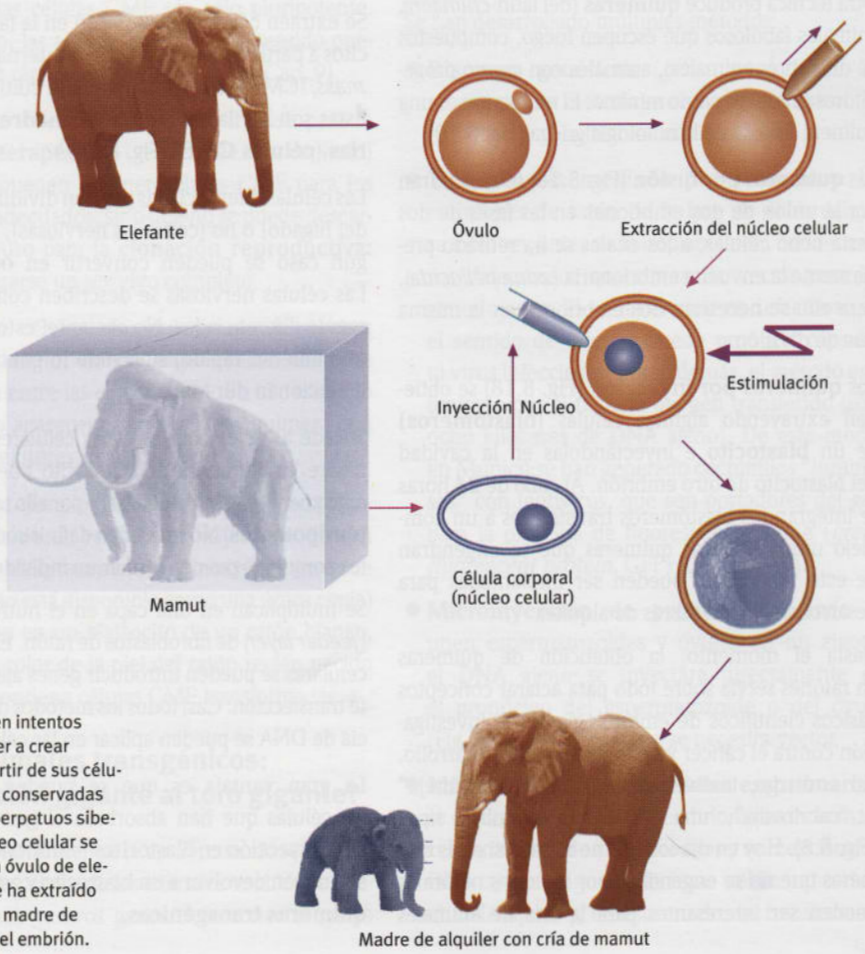


Fig. 8.4 Existen intentos serios de volver a crear el mamut a partir de sus células corporales conservadas en los hielos perpetuos siberianos. El núcleo celular se transfiere a un óvulo de elefante al que se ha extraído el núcleo. Una madre de alquiler gesta el embrión.





Fig. 8.5 Los delfines, mamíferos marinos extremadamente inteligentes, pueden reproducirse también mediante inseminación artificial.



Fig.8.6 Antílope bongo (*Tragelaphus euryceros*).



Fig. 8.7 En el año 2003, en el Instituto Audubon de Nueva Orleans se engendró un lince africano o caracal (*Felis caracal*) mediante fecundación *in vitro* de un embrión, que se congeló, se descongeló y se implantó en una madre de alquiler. La cría Azalea estaba sana y feliz.



Fig. 8.8 Cabrioveja o cabreja.

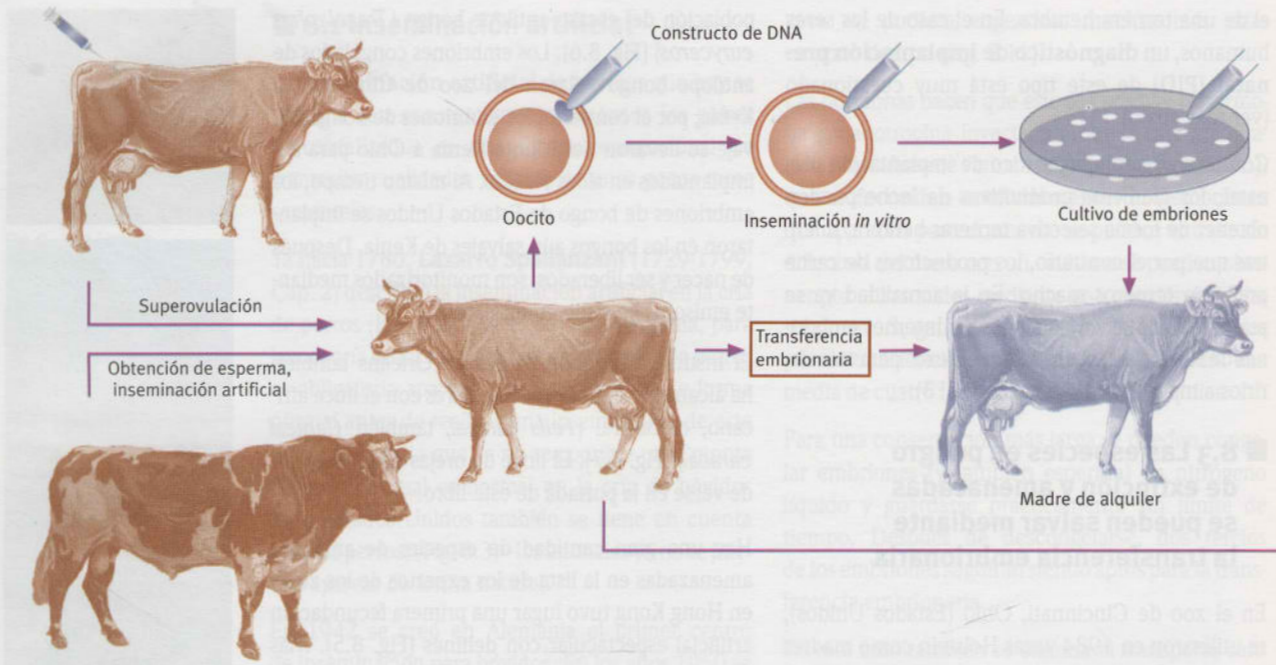




Fig. 8.9 La ley básica de la biogenética de Ernst Haeckel ilustrada por él; después, el desarrollo de un germen muestra una filogénesis acelerada de los seres vivos.



Fig. 8.10 El minotauro de la mitología griega, un monstruo con cuerpo de hombre y cabeza de toro, al cual el rey Minos mantenía prisionero en el laberinto y al que Teseo venció.

8.4 Las quimeras tienen como mínimo cuatro padres genéticos

Otra técnica produce **quimeras** (del latín *chimaera*, animales fabulosos que escupen fuego, compuestos de diferentes animales), animales con cuatro progenitores genéticos como mínimo. El minotauro es una quimera famosa de la mitología griega (Fig. 8.10).

Las **quimeras por fusión** (Fig. 8.16) se engendran por la unión de dos embriones en las fases de dos hasta ocho células, a los cuales se ha retirado previamente la envuelta embrionaria (*zona pellucida*). Para ello se necesitan dos embriones en la misma fase de división.

Las **quimeras por inyección** (Fig. 8.18) se obtienen extrayendo algunas células (**blastómeros**) de un **blastocito** e inyectándolas en la cavidad del blastocito de otro embrión. Al cabo de 24 horas se integran los blastómeros transferidos a un complejo unicelular. Las quimeras que se engendran de este modo sólo pueden ser implantadas para desarrollarse en hembras de alquiler.

Hasta el momento, la obtención de quimeras en ratones servía sobre todo para aclarar conceptos básicos científicos de embriología, en la investigación contra el cáncer y en la genética de desarrollo. Sin embargo, también se produjo una "cabreja" o "cabrioveja", una quimera de ambos tipos (Fig. 8.8). Hoy en día todavía no se sabe si estas quimeras que no se engendran por métodos naturales pueden ser interesantes para la cría de animales útiles. El desarrollo más interesante es el de las quimeras por inyección a partir de cepas celulares modificadas por ingeniería genética (detallado en Cap. 9).

Se extraen células del embrión en la fase de blastocitos a partir de la "masa celular interna" (*inner cell mass*, ICM) y se mantienen en un cultivo de tejido. Éstas son las llamadas **células madre embrionarias** (**células CME**) (Fig. 8.18).

Las células diferenciadas pueden dividirse (como las del hígado) o no (como las nerviosas), pero en ningún caso se pueden convertir en otras células. Las células nerviosas se describen como terminalmente diferenciadas. No obstante, esto no significa que mueran rápido, sino todo lo contrario –viven y funcionan durante años.

Sucede al revés con las cepas celulares: las células madre embrionarias del blastocito pueden generar cualquier otro tipo de células, y por ello se denominan **pluripotentes**. No se pueden definir como totipotentes porque no pueden formar un individuo completo.

Se multiplican en una capa en el nutriente celular (*feeder layer*) de fibroblastos de ratón. En tales líneas celulares se pueden introducir genes ajenos mediante transfección. Casi todos los métodos de transferencia de DNA se pueden aplicar en las células CME.

La gran ventaja es que se pueden seleccionar las células que han absorbido el gen ajeno antes de la inyección en blastocitos (embriones). Después se pueden devolver a un blastocito y así se obtienen **quimeras transgénicas.**

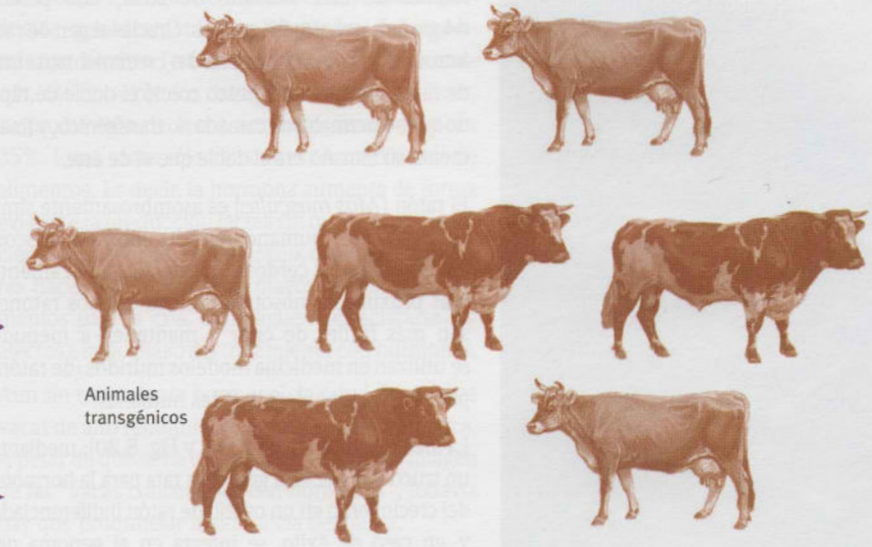


Fig. 8.11 Con la fecundación *in vitro* (FIV) y la transferencia embrionaria (TE) se puede aumentar el índice de multiplicación de los toros sementales. Se provoca la superovulación en las hembras mediante un tratamiento hormonal y se inseminan artificialmente (centro) o *in vitro* (fila superior). Los embriones se transfieren a madres de alquiler que aparentemente están gestando.



Fig. 8.12 Inseminación de un óvulo (dibujo de Ernst Haeckel en su "Antropogenia").

Totipotentes (a veces también denominadas omnipotentes) son las células hasta la mórula (núcleo de mora); a partir de ahí, es muy probable que el blastocito con las células CME sea sólo pluripotente. Sin embargo, las afirmaciones en este sentido pueden cambiar rápidamente (detallado en Cap. 9).

El problema es explosivo, ya que incluso para la **clonación terapéutica** (ver final de este capítulo) no sólo se pueden obtener células CME para los embriones adecuados, sino que no se puede descartar un mal uso para la **clonación reproductiva:** podría generarse un ser vivo completo.

Se inyectan células manipuladas en blastocitos intactos de ratón, donde estas células añadidas se disponen entre las células ICM. En el desarrollo embrionario aparecerá entonces una quimera con cuatro progenitores (Fig. 8.18).

Cuando, por ejemplo, las células CME se han obtenido a partir de un ratón marrón (el llamado gen *Agouti* que se expresa incluso como color marrón de la piel cuando está disponible como una única copia) y se inyectan en un blastocito de un ratón blanco, entonces el color de la piel del ratón recién nacido indicará si contiene células CME transformadas.

8.5 Animales transgénicos: ¿del ratón gigante al toro gigante?

Al igual que en las plantas (Cap. 7), cuando se implanta DNA en las células de los animales también se pueden introducir nuevos genes o desconectar genes existentes. Los nuevos genes se heredarán. Actualmente, estos animales transgénicos constituyen los productos más espectaculares de la biotecnología.

Se han desarrollado múltiples métodos:

- **Disparos genéticos** (*gene guns*) (Cap. 7): mediante este método se dispara DNA absorbido en bolitas y se introduce en las células.
- **Transgénesis mediada por retrovirus**: los embriones de ratón de la fase de ocho células se infectan, antes de la implantación, con retrovirus defectuosos que sirven de vector para los genes ajenos. El material viral es defectuoso en el sentido de que no puede producir cápsulas ni virus infecciosos. Por lo demás, el método está limitado por el tamaño del gen transferido (sólo ocho kilobases de DNA ajeno). De este modo, en Munich se han generado cochinillos "luminosos" con lentivirus, que son portadores del gen para la proteína de fluorescencia verde (*green fluorescent protein*, GFP) (Cuadro 8.3).
- **Microinyección de pronúcleo**: cuando se unen espermatozoides y óvulos en un zigoto, el DNA ajeno se inyectará directamente en el pronúcleo del espermatozoide o del óvulo (Fig. 8.14). Por tanto, no se necesita vector.
- **Método de las células madre embrionarias**: se extraen células madre embrionarias de la masa celular interna de los blastocitos y se mezclan con DNA ajeno. Algunas de estas células absorben el DNA ajeno y, de este modo, se transforman.



Fig. 8.13 Los centros de cría ofrecen esperma de toro y embriones por Internet.

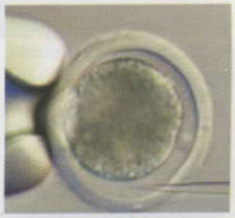


Fig. 8.14 Microinyección: se aspira el óvulo sosteniéndolo mediante una pipeta; se controla al microscopio una aguja de microinyección con un micromanipulador.



Fig. 8.15 Toro clonado.

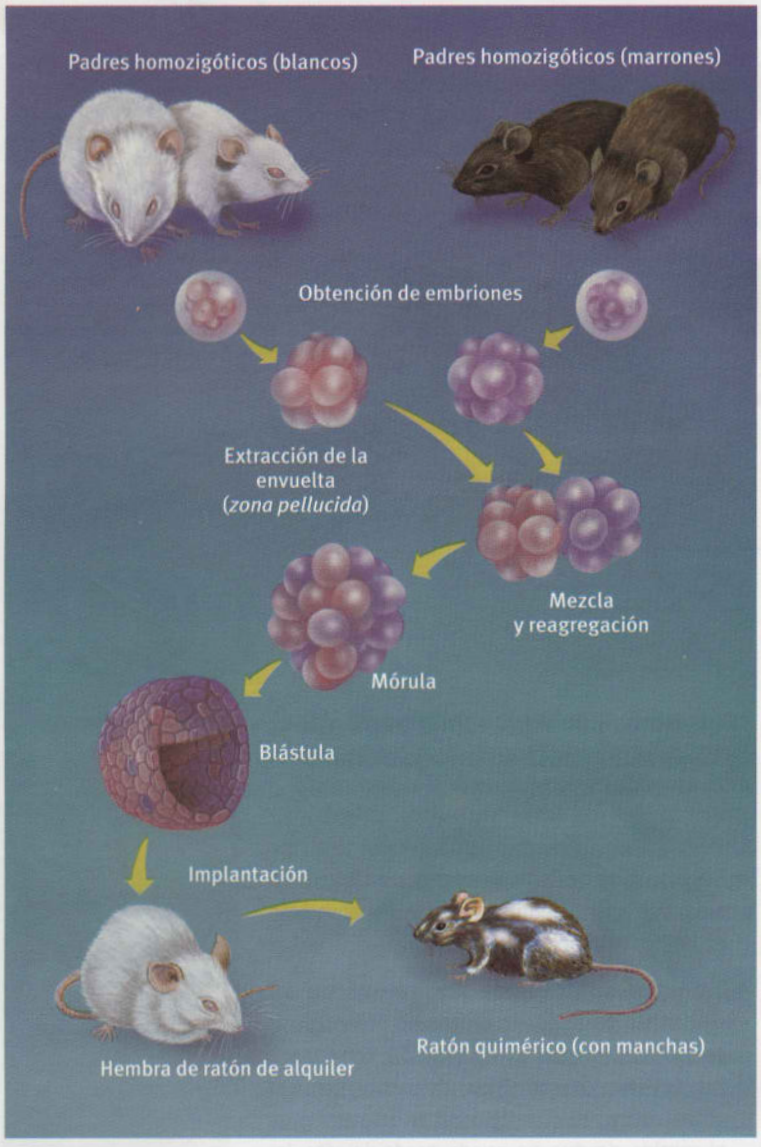


Fig. 8.16 Cómo se generan las quimeras por fusión.



Fig. 8.17 Mediados de 2005, el éxito más reciente de los clonadores: el perrito afgano Snuppy (con un donante al que se extrajeron células de la oreja). El investigador de células madre Woo-Suk-Hwang, de Corea del Sur, lo consiguió (Cap. 9).

Seguidamente, estas células se inyectan en la masa celular interna de un blastocito. De momento, este método es el más importante. No obstante, los animales jóvenes son quimeras (ver punto 8.4), es decir, sólo una parte de las células son portadoras de genes ajenos. En la segunda generación ya se obtienen animales transgénicos que contienen el material genético ajeno en todas las células. Si se siguen realizando cruces, se podrán establecer finalmente líneas transgénicas homozigóticas (de pura raza).

- **Transferencia mediada por esperma**: utiliza "proteínas de enlace" para unir el DNA a las células de los espermatozoides y transportarlo al óvulo como "caballo de Troya".

El ***ratón gigante*** engendrado en 1982 (Cuadro 8.1) por **Richard Palmiter** (Universidad de Washington) y **Ralf Brinster** (Universidad de Pensilvania) ya mostraba las consecuencias de la nueva técnica. De dos ratones de diez semanas de edad, uno pesaba 44 gramos y el otro 29 gramos. Gracias al gen de rata introducido para la hormona del crecimiento, la cría de ratón gigante transgénico creció el doble de rápido que su hermano de camada no transgénico, y finalmente su tamaño era el doble que el de éste.

El ratón (*Mus musculus*) es asombrosamente similar a los seres humanos en términos fisiológicos. Sin embargo, los cerdos aún están fisiológicamente más próximos a nosotros. Puesto que los ratones son más fáciles de criar y mantener, a menudo se utilizan en medicina modelos múridos (de ratón) para investigar enfermedades humanas.

La idea es genial (Cuadro 8.1 y Fig. 8.20): mediante un truco se inyecta el gen de la rata para la hormona del crecimiento en un ovario de ratón indiferenciado y, en caso de éxito, se integra en el genoma del embrión. El gen se acopla entonces a otro gen junto con su "gen conector" (promotor), de forma que posteriormente no forma la hormona en el cerebro del ratón (como se preveía en realidad), y desde allí se extrae de forma controlada. Pero no ocurre así, ya que en primer lugar se forma en otro tejido, por ejemplo en el hígado, y en segundo lugar lo hace de forma incontrolada, sin control por parte de la hipófisis. De este modo, el ratón alcanza el doble de peso que otros congéneres de la misma edad no tratados.

Sus descendientes también crecen más rápidamente y se hacen más grandes. Por consiguiente, el gen de la rata es estable en el material hereditario del ratón.

8.6 Hormonas del crecimiento para bovinos y cerdos

Por el contrario, en el caso de los bovinos el tamaño no es lo que constituye el centro de interés, ya que nadie quiere construir establos mayores, sino controlar la calidad de la leche, el crecimiento, la fertilidad y la resistencia a las enfermedades.

La calidad de la leche cambia. Así pues, hay que obtener más caseína-κ, una fosfoproteína, para producir mejor queso. Millones de personas con intolerancia a la lactosa han obtenido grandes ventajas con la leche sin lactosa. Pueden digerir la leche sin sufrir flatulencia (Cap. 2, hasta ahora la lactosa se descompone enzimáticamente con la galactosidasa).

Otro de los objetivos es la resistencia a la mastitis bacteriana (inflamación de las ubres). En Estados Unidos, la mastitis causa anualmente pérdidas de dos mil millones de dólares en la producción láctea. Parece que se está reduciendo claramente la cantidad de inyecciones a las vacas.

Ya se obtuvo un éxito económico con vacas lecheras adultas a las que se inyectó una hormona producida genéticamente, la **hormona del crecimiento bovino** (*recombinant bovine somatotropin*, rBST): según los datos de algunos científicos, su producción de leche aumentó de un 10 a un 25%. Estas vacas sólo consumieron un 6% más de alimentos. Es decir, la hormona aumenta de forma evidente la producción láctea sin que el gasto financiero sea mayor. Por el contrario, otros investigadores hacen referencia a un mayor consumo de alimentos para la cría. Aún siguen sin aclararse los efectos a largo plazo del tratamiento con hormonas.

Aun sin tratamiento hormonal, la salud de muchas vacas de alto rendimiento parece ser problemática. A pesar de que se ha explotado en exceso la imagen de las "vacas consumidas con hormonas", todavía hay que pronunciar la sentencia definitiva.

Los excedentes de leche en Europa contribuyen a alimentar el escepticismo del Viejo Continente. Sin embargo, esta controversia sobre el tratamiento hormonal, en parte encarnizada, podría acabar pronto: el gen de la hormona del crecimiento se transfiere a los bovinos y ya no debe inyectarse. Las vacas transgénicas lo producen por sí solas.

La introducción de hormonas del crecimiento en los **cerdos** debería tener más sentido. En este caso, la hormona del crecimiento hace aumentar la cantidad de carne a costa de la grasa. Sin embargo, siempre se necesita un contenido mínimo en grasa, ya que la carne sin grasa no tiene sabor. Por lo demás, inyectar diariamente a los animales es impracticable. Hay que fabricar preparados de acción retardada que sólo deban inyectarse cada varias semanas.

¿Y los cerdos transgénicos musculosos y sin grasa? En realidad se logró hacer una transferencia genética, pero con resultados mucho menos satisfactorios que con el ratón. Hasta ahora ha sido una decepción. En los cerdos, una superproducción de la hormona del crecimiento tiene como resultado una mayor velocidad de crecimiento con menor cantidad de grasa, pero por otra parte, al mismo tiempo, también se producen enfermedades del riñón, cambios en la piel e inflamaciones en las articulaciones. A menudo los cerdos transgénicos cojean y no son especialmente fértiles, lo cual no es de extrañar con los síntomas que se acaban de describir.

Las **cabras y ovejas** transgénicas no parecen tener problemas de salud. Se está experimentando con las glándulas mamarias de ovejas y cabras como "biorreactores" para secretar con la leche, albúmina humana (factor VIII y IX, activador del plasminógeno), una *Gene-Pharming*.

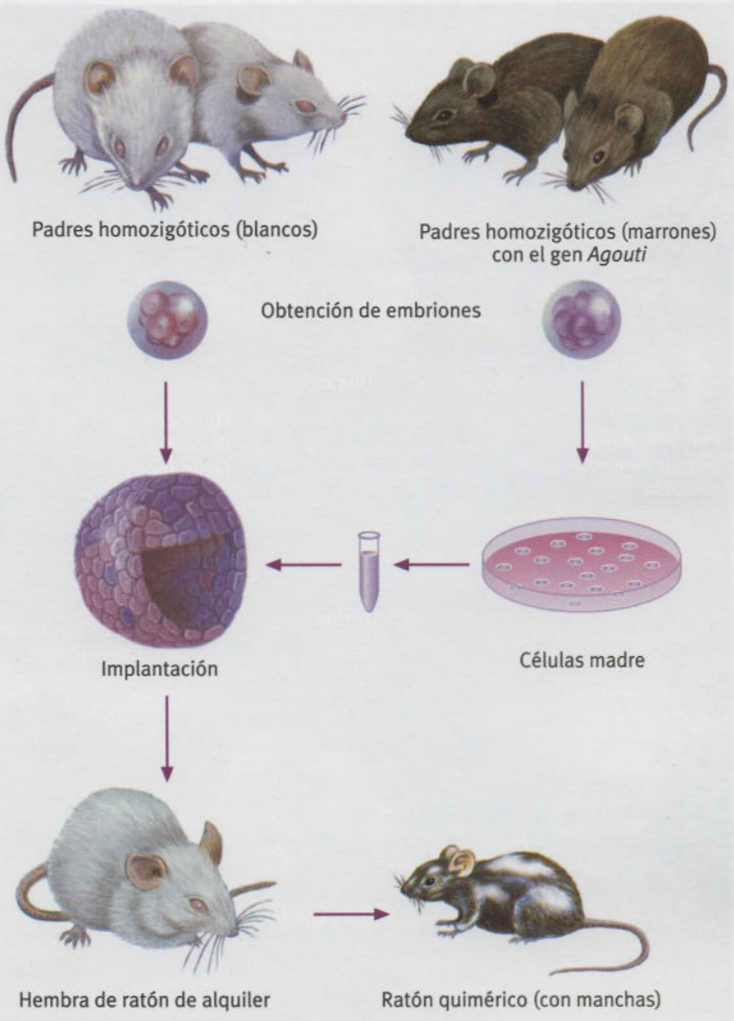


Fig. 8.18 Quimeras por inyección que se obtuvieron con la ayuda de células madre embrionarias (CME). Las CME se pueden manipular genéticamente de modo adicional.

8.7 *Gene-Pharming*: valiosa proteína humana a partir de huevo y leche

Los biotecnólogos no consideran una broma el poder ordeñar hembras de ratón. En ratones normales seguro que el gasto no vale la pena, pero en ratones transgénicos manipulados genéticamente tal vez sí. En 1987, unos ratones produjeron por primera vez **activador del plasminógeno tisular** (*tissue Plasminogen Activator*, t-PA; Fig. 8.20) humano y lo excretaban en su leche en concentraciones elevadas. El t-PA es un principio activo importante que disuelve trombos (coágulos de sangre) en el infarto de miocardio.

La idea básica fue inyectar el gen del t-PA humano (Cap. 9) en el óvulo fecundado de los ratones, igual que se había realizado con éxito con otros genes de mamíferos. En algunos casos, el material hereditario se integró de forma estable en la sustancia hereditaria.

Para poder obtener productos genéticos ajenos, como el t-PA, a través de la leche sin complicaciones (Fig. 8.20), se unió el gen promotor de la



Fig. 8.19 Arriba: cabra clonada. Los bovinos transgénicos pueden secretar proteínas humanas con la leche.

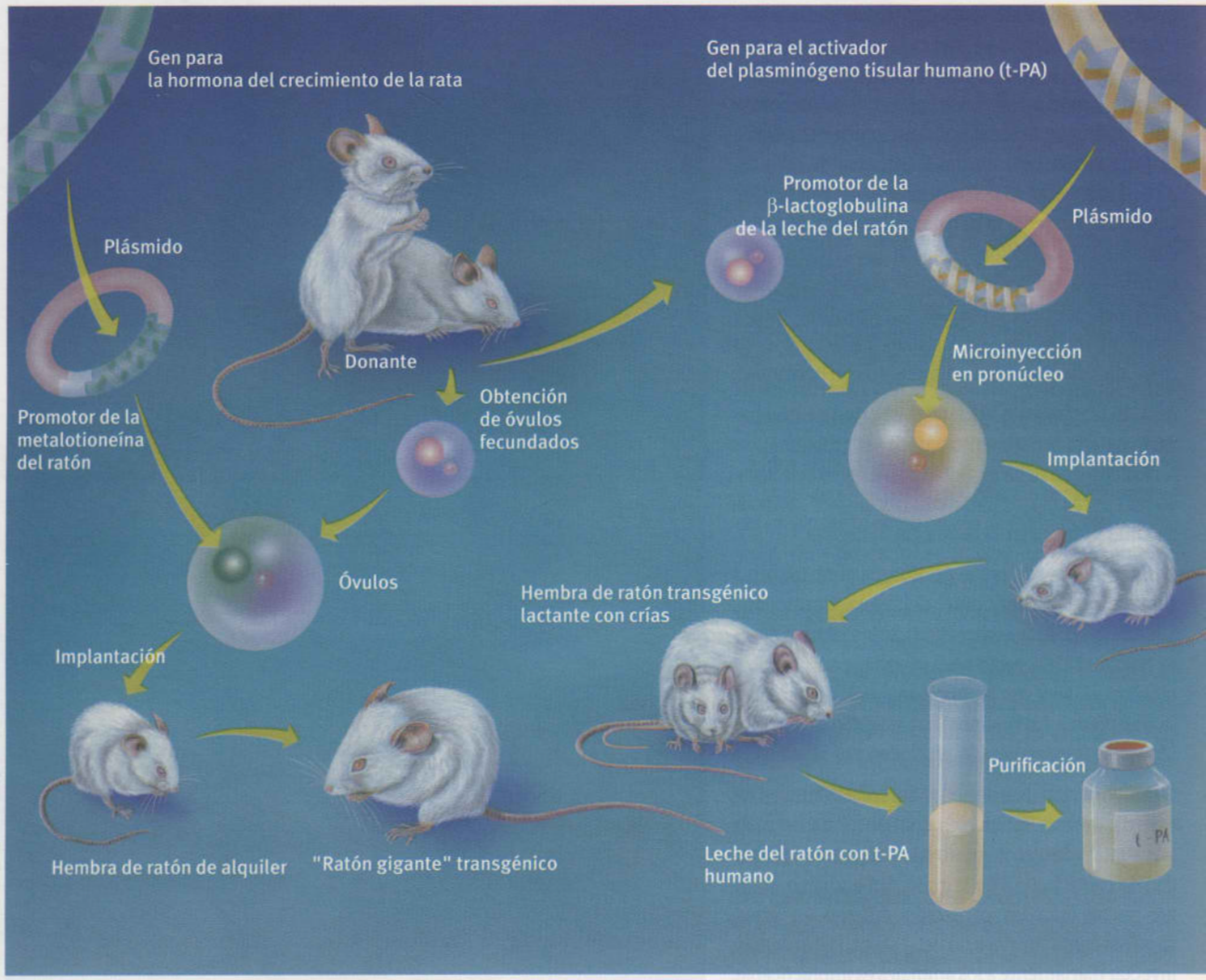


Fig. 8.20 Izquierda: cómo se produjo el ratón gigante. Derecha: los ratones transgénicos producen el activador del plasminógeno tisular humano (t-PA) con la leche.



Fig. 8.21 Un litro de leche de vaca pesa aproximadamente 1030 gramos y contiene en promedio de 3 a 8 g de vitaminas y minerales, de 15 a 35 g de proteínas, de 50 a 70 g de lactosa, 40 g de grasa de leche y el resto es agua. Las proteínas de la leche pueden ser principios activos terapéuticos humanos en un futuro.

β-lactoglobulina, la más abundante en la leche de los ratones, con el gen aislado del t-PA humano. Además, en realidad, el t-PA humano sólo se formó en el tejido de la glándula mamaria de los ratones transgénicos y se produjo de forma activa con la leche. Por el contrario, en la sangre de los ratones no se encontró t-PA humano (Fig. 8.20).

Hay muchos métodos que se pueden concebir. Las **granjas de animales domésticos**, baratas, pueden producir productos manipulados genéticamente para cultivos de células de mamíferos en lugar de los biorreactores, que son caros. Cada ratón que se ordeña en 15 minutos con una máquina especial de ordeñar ratones suministra al día cuatro mililitros de leche. En poco tiempo se podrán engendrar colonias enormes de animales transgénicos.

A finales de los años 1980, la empresa holandesa GenePharming empezó a manipular embriones de toro para estos fines. El objetivo era que la vaca produjese en su leche la proteína humana **lactoferrina** en mayores cantidades. La lactoferrina parece servir como suplemento de la alimentación de los lactantes. Para empezar se manipularon genéticamente 2400 embriones. De estos objetos de ensayo se siguieron desarrollando 128 y se implantaron en vacas normales. Sin embargo, el animal que vino al mundo, vivo y transgénico, como estaba previsto, en diciembre de 1990, que aproximadamente a los dos años de edad hubiese podido producir leche con lactoferrina, no era una hembra.

Al ternero se le bautizó con el nombre de Hermann. En marzo de 1993, el gobierno holandés permitió utilizar esperma transgénico para inseminar vacas no transgénicas. A finales de 1993 nacieron los descendientes de Hermann.

De los 55 terneros que nacieron, ocho fueron hembras transgénicas. Tres de ellas murieron y las cinco restantes alcanzaron la madurez sexual en la primavera de 1995 y fueron inseminadas con esperma normal. En marzo de 1996, las hijas de Hermann

trajeron terneros al mundo y empezaron a producir leche. ¡Cuatro de estas hijas de Hermann formaron lactoferrina humana en concentraciones de 0,3 a 2,8 gramos por litro de leche!

Esta lactoferrina es idéntica a la que contiene la leche materna humana y mejora la absorción del hierro y la protección contra las infecciones intestinales.

Mientras tanto, las **cabras** aún siguen siendo animales transgénicos codiciados: se reproducen con más rapidez y son más baratas de mantener que los bovinos. En la leche de cabra se ha producido con éxito un factor para la coagulación de la sangre. Un rebaño de cien cabras puede suministrar anualmente productos por valor de 200 millones de dólares americanos. ¿Por qué utilizar entonces sólo glándulas mamarias como "biorreactores"?

Una **gallina** pone una media de 250 huevos al año, y la clara del huevo contiene aproximadamente de tres a cuatro gramos de proteína. Aún cuando sólo una pequeña parte sirva para fármacos, la producción es rentable. Se pueden expresar anticuerpos monoclonales en huevos (Fig. 8.22).



Fig. 8.22 Insulina humana producida en los huevos de gallinas transgénicas, un sueño realista. En la actualidad, en Alemania, un 90% de los huevos de gallina se producen en instalaciones ponedoras intensivas. En Alemania, las gallinas de esta especie ponen unos 280 huevos anuales.

8.8 Peces transgénicos: del *GloFish*® a la trucha gigante

El sabio Lao-tse (Fig. 8.24) dijo: «Si das pescado a un hombre hambriento, le nutres durante una jornada. Si le enseñas a pescar, le nutrirás toda su vida». El consumo de pescado aumenta vertiginosamente. Cada año se pescan unos 80 millones de toneladas de pescado. Sin embargo, muchas reservas de peces están amenazadas (Fig. 8.30) y desciende la cantidad que se puede pescar.

Cuadro 8.1 El ratón gigante

Normalmente, el gen para la hormona del crecimiento en los ratones (y también en los seres humanos) sólo se expresa en la glándula pituitaria (hipófisis). Produce la hormona y la transfiere a la sangre mediante el control del cerebro. La cría del ratón crece "controlada de forma inteligente" por el cerebro.

La idea genial de **Ralf Brinster** fue la siguiente: se trataba de producir hormona del crecimiento en el ratón fuera del control de la hipófisis (por ejemplo en el hígado) y, de este modo, se alcanzaría un mayor crecimiento. La síntesis de la proteína **metalotioneína** se produce en el hígado y se estimula mediante metales pesados como el zinc, contra el cual el tejido se debe proteger. ¿Se puede utilizar su gen como "arrastrador"?

Cuando entonces se combinan dos genes (es decir, DNA) con un "conectador" (promotor) (gen de la hormona del crecimiento y gen de la metalotioneína más conectador de metalotioneína) y se implantan en un embrión de ratón, existe la esperanza fundada de que, como mínimo, una parte del gen de la hormona del crecimiento se exprese en el hígado y allí produzca dicha hormona.

Lo más inmediato es implantar al microscopio un nuevo gen en una célula inyectando el DNA purificado, simplemente con una cánula, en el núcleo celular de un óvulo, y esperar que se integre en el genoma. Esto funciona muy bien en los ratones.

En primer lugar, se prepara el DNA con el gen de la hormona del crecimiento y el gen de la metalotioneína y su promotor inducible. Todo el conjunto se integra luego en un plásmido y se reproduce en bacterias millones de veces. Seguidamente se vuelve a cortar en gran cantidad el fragmento de DNA deseado con restrictasas. Actualmente también se puede multiplicar el DNA con la PCR, pero cuando se realizó el experimento del ratón gigante este método aún no estaba disponible.

Se observan los embriones ampliados entre 100 y 200 aumentos al microscopio con una lente especial. Las estructuras celulares del embrión se identifican con gran contraste. Entre ocho y doce horas después de la fecundación se pueden ver con claridad ambos pronúcleos redondos. El paterno es ostensiblemente más grande que el materno.

Con una pipeta de aspiración se sujeta suavemente un zigoto. Se pincha el óvulo con una aguja de microinyección y se inyectan de 50 a 500 copias de genes en el pronúcleo macho. No todos los embriones sobreviven, pero por lo general un 60 a 80% de ellos podrá vivir.

Las hembra-madres de alquiler potenciales se aparean sólo con ratones macho esterilizados. Luego tendrán una preñez aparente, entrarán en el ciclo hormonal de la gestación, pero no llevarán ningún embrión.

Los embriones implantados se desarrollan en la hembra de alquiler hasta convertirse en fetos normales. Los recién nacidos permanecen tres semanas junto a su madre de alquiler, hasta que son lo suficientemente mayores para el destete.

¿Es transgénico el ratón recién nacido? ¿Lleva ya integrado en su genoma el DNA que se le ha inyectado? ¿Se multiplica el DNA con cada división celular durante el crecimiento del embrión?

Una muestra de tejido extraída de la cola del ratón nos da la respuesta. La PCR indica, en caso normal, que como mínimo aproximadamente un 27% de los descendientes ha integrado el DNA extraño, que el DNA está activo y que se transmite también a los descendientes con sus células sexuales.

El ratón gigante creció tanto al exponer el embrión a pequeñas cantidades de zinc porque las células del hígado sintetizaron tanto metalotioneína como hormona del crecimiento de la rata. El gen conector de la metalotioneína había activado verdaderamente ambos genes. En el hígado ya no se podía seguir controlando la división de la hormona como en el cerebro. El excedente de hormona estimuló el desarrollo del ratón de forma ininterrumpida.

Actualmente, en todo el mundo existen ya 2000 cepas de ratón transgénicas para la investigación científica. Esto facilita el análisis de la función del genoma humano. Los ratones son buenos modelos para las enfermedades humanas: artritis, enfermedad de Alzheimer y enfermedades cardiovasculares.

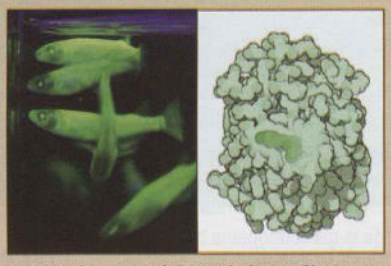


Ralf Brinster y el ratón gigante

Cuadro 8.2 Historia de la biotecnología: *GloFish®* –El primer animal doméstico transgénico

Al igual que el pez payaso Nemo de la película de dibujos animados, un pececito de verdad está haciendo furor en Estados Unidos: un pez de acuario que se ilumina de un color rojo precioso con luz fluorescente. ¡Ha llegado el primer animal doméstico manipulado genéticamente!

La euforia luminosa de los biotecnólogos comenzó hace aproximadamente 20 años, cuando se inyectó el gen de la enzima de la luciérnaga **luciferasa** en las células del tabaco. Cuando el sustrato luciferina llegaba con el agua de riego a la planta y se convertía en luciferasa, las plantas manipuladas genéticamente (transgénicas) empezaban a iluminarse en color amarillo verdoso. No se pretendía recoger en el futuro la cosecha de tabaco por la noche ni que el árbol de Navidad se iluminase poco a poco por sí solo. Más bien el gen de la luciferasa sirvió a los científicos como marcador fácilmente identificable para ver qué genes se habían colocado en qué partes de la planta.



Peces cebra transgénicos criados en Singapur, que se iluminan con fluorescencia si tienen estrés o en presencia de metales pesados o estrógenos en el agua. Derecha: la molécula GFP con el grupo fluorescente activo.

La proteína de fluorescencia verde (GFP) convierte la luz UV en luz verde de menor energía. Las soluciones de GFP purificada son amarillas con la luz eléctrica normal y se iluminan en verde con la luz solar. Lo que se acopla con la GFP puede hacerse visible siempre, por ejemplo cómo se mueven las proteínas por una célula o los virus por el cuerpo. Cuando el gen de la GFP se inyecta junto con otros genes, se puede percibir fácilmente dónde se expresa.



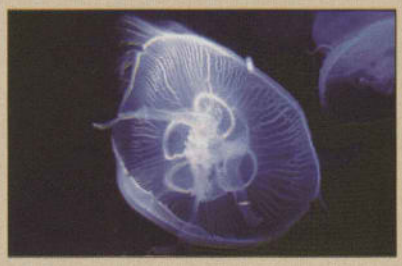
GloFish®, el primer aminal doméstico transgénico, se ilumina de color rojo con las radiaciones de luz UV.

Los investigadores de Singapur intentaron manipular el pez cebra de rayas negras y blancas (*Danio rerio*), originario del Ganges índico, de forma que en caso de estrés el pez se iluminara en verde o en rojo. De este modo se puede observar con facilidad la hormona sexual femenina (estrógeno) o los metales pesados en el agua.

Los japoneses, taiwaneses y estadounidenses hicieron un negocio de esta "idea luminosa": el primer animal doméstico manipulado, el *GloFish®* (pez luminoso). Desde enero de 2005, en Estados Unidos se puede comprar el *GloFish®* por cinco dólares. La comercialización rápida ha irritado a muchos conocedores de la situación. Ninguna de las tres autoridades competentes estadounidenses pudo –o quiso– evitarlo. Evidentemente, porque nadie se sentía responsable.

La agencia medioambiental EPA ("¡Los peces decorativos no contaminan el medio ambiente!") también lo denegó, al igual que la agencia de autorización de medicamentos FDA ("¡Los peces decorativos no son medicamentos!") y el Departamento de Agricultura USDA ("¡Los peces decorativos no son alimentos!"). Sin embargo, aunque hubiese que llenar este vacío, aún existen dudas y muchas preguntas. Hay otros peces que están esperando desde hace años una autorización, por ejemplo la trucha del Pacífico transgénica (con hormona del crecimiento adicional).

La perca del Nilo (*Lates niloticus*), que se liberó en el Lago Victoria africano con buenas intenciones, ha constituido un ejemplo muy negativo que no tiene nada que ver con la manipulación genética. Eliminó casi todas las especies locales de peces, sobre todo las percas multicolor de Victoria (*Cichlidae*), provocó su extinción y ni siquiera proporcionó carne de alta calidad. Un laboratorio viviente, hoy día aún en evolución, se destruyó para siempre, alegremente y por falta de perspicacia, por un competidor exógeno.



Medusa luminosa.

Los investigadores de la Universidad de Purdue (West Lafayette, Estados Unidos), que desde hace muchos años investigan los peces transgénicos, descubrieron en el pariente japonés del salmón de piscifactoría, el *medaka*, que los seres transgénicos poseen una clara ventaja: fecundan los huevos hasta cuatro veces más a menudo que sus colegas salvajes. Los investigadores han llegado a la conclusión, a partir de sus simulaciones por ordenador, de que como muy tarde dentro de cincuenta generaciones las formas salvajes habrán desaparecido de la naturaleza.



Fig. 8.23 El pez cebra (*Danio rerio*) procede del Ganges índico y es muy popular entre los biólogos. En la fotografía se muestran sus variantes biotecnológicas.

¿Consiste la solución en criar **peces gigantes** en piscifactorías? En la actualidad se crían unos 40 millones de toneladas de pescado anuales en piscicultura. A las truchas arco iris jóvenes se les inyectó hormona del crecimiento para truchas fabricada con ingeniería genética (*salmon growth hormone*). Los peces crecieron el doble. Sin embargo, es difícil y caro pescar miles de truchas e inyectarles la hormona. O sea, que se intentó producir truchas transgénicas.

Las **modificaciones genéticas** en los peces son considerablemente más sencillas que en los mamíferos. La fecundación de los huevos es extracorporal y el desarrollo de los embriones no se produce en la madre sino en el fondo de las aguas. Allí se pueden recoger los huevos con facilidad, y después de introducir nuevos genes no deben volver a implantarse en la madre. Además, se dispone de muchos más huevos que en otras especies de animales, con lo que se pueden realizar diversos experimentos en paralelo y se reducen considerablemente los tiempos de investigación.

Los peces tienen unos óvulos enormes y, por tanto, inyectar el gen para la hormona del crecimiento no

fue especialmente difícil. ¡La trucha del Pacífico transgénica es aproximadamente diez veces mayor que el pez normal, e incluso algunas eran 37 veces mayores! En comparación, la trucha natural parece enana (Fig. 8.28).

Además, los criadores quieren satisfacer ciertas exigencias de calidad en cuanto al sabor y la estética. Así pues, los consumidores aprecian el color rosa en el **salmón**, que originariamente se debe a que los peces salvajes comían con preferencia pequeños cangrejos. En el caso del salmón, la expansión de la piscicultura, sobre todo en Noruega, ha conducido a una sobreproducción masiva. Hoy el salmón ya no es un artículo de lujo, sino un alimento cotidiano. Los objetivos de la cría, hasta el momento, han cambiado poco con la técnica genética. Ésta brinda por primera vez la posibilidad de transmitir genes individuales correspondientes a ciertas características, y con ello alcanzar el objetivo de forma más rápida y precisa. Además, también se pueden utilizar genes de otras especies.

En diferentes laboratorios, sobre todo en Estados Unidos, Canadá, Gran Bretaña, Noruega y Japón, hasta ahora se han modificado genéticamente 35 especies de peces diferentes. Antes que las truchas y las carpas, el salmón atlántico desempeña un papel fundamental: es el producto piscícola criado en piscicultura más importante en todo el mundo.

Asimismo, ya se han modificado genéticamente peces como el bacalao, el rodaballo y el halibut, que en un futuro se producirán cada vez más en piscicultura. Hasta ahora no se ha apreciado una aplicación comercial. Se trabaja mucho con la modificación genética de la especie ***Tilapia*** (perca multicolor) (Fig. 8.25). Este pez de agua dulce, originario de África, se ha convertido en muchos países tropicales y subtropicales en uno de los peces de cría más importantes. También se exporta a Europa.

Actualmente, el objetivo de cría más interesante desde el punto de vista comercial y que persiguen los procesos genéticos, es acelerar el **crecimiento del tamaño** de los peces (Fig. 8.26). Muchos otros proyectos se encuentran todavía en una etapa inicial de desarrollo y están lejos de introducirse en el mercado de peces transgénicos. En este caso, sobre todo, se trata de encontrar nuevos genes y desarrollar procesos adecuados para integrarlos en la herencia de los peces.

En un principio se intentó aumentar de forma "sobrenatural" el crecimiento del tamaño de los peces transfiriéndoles **genes de la hormona del crecimiento** de diferentes especies animales (otros peces, ratas, toros, incluso seres humanos). Sin embargo, las experiencias demuestran que las modificaciones en los genes específicos correspondientes de la hormona del crecimiento llevan al éxito deseado mejor y de forma más fiable. Si se transfiere el gen de la hormona del crecimiento del salmón del Pacífico al salmón del Atlántico, en invierno también se libera la hormona del crecimiento: el salmón del Atlántico crece durante todo el año, no como antes sólo en primavera y verano. Está claro que un salmón modificado genéticamente de este modo alcanzará su peso en canal más rápidamente (Fig. 8.28).

En concreto, en las jaulas y cubas de las piscifactorías las enfermedades producen caídas de producción de peces que pueden extender rápidamente agentes bacterianos y virales. Por ello, las **resistencias** generadas genéticamente son un objetivo interesante para la cría de peces. Un método para lograr que los peces sean más resistentes contra los agentes causantes de enfermedades es encontrar un gen de resistencia adecuado y transferirlo a los peces. Otro método es hacer que los peces produzcan más cantidad de la enzima antibacteriana lisozima (Cap. 2).

En 1974, en la Universidad de Terranova se heló un tanque con platijas. La mayor parte de estos 200 peces planos tenía hielo incluso en el corazón. El joven profesor ayudante chino **Choy L. Hew** (Fig. 8.29) estaba desconsolado. Regaló los peces congelados a sus colegas y durante días fue muy popular. ¡Sin embargo, al seleccionar los muertos descubrió de pronto un par de supervivientes! Habían sobrevivido a la congelación.

Posteriormente, Hew descubrió la causa: una proteína ***antifreeze*** (anticongelante) que protege a determinados peces contra la congelación. Dado que se encontró también el gen que codificaba esta proteína, los científicos intentaron transmitirla a los salmones. De este modo se esperaba poder criar salmones incluso a temperaturas próximas al punto de congelación. En la actualidad, Hew produce con éxito peces transgénicos en la Universidad de Singapur.

Transfiriendo los genes de la "proteína de protección contra la congelación" parece que aumenta la tolerancia al frío de los salmones y otros peces de piscifactoría. El objetivo es producir salmón en piscicultura en las regiones marítimas donde las bajas temperaturas del agua en invierno no lo permitían hasta el momento.

Los ecologistas tienen dudas generales respecto a los **peces transgénicos**: no se puede garantizar que no se escapen de las piscifactorías y se extiendan de forma incontrolada. La perca del Nilo (*Lates nilotes*) ha causado daños devastadores a las percas



Fig. 8.24 Lao-tse, cuyo nombre popular era Li Er. La literatura lo describe como un contemporáneo de Confucio de mayor edad (551-479 a.C.)



Fig. 8.25 Los representantes de la familia *Tilapia* son percas de aguas cálidas de África y del Jordán, también llamados "pez de Pedro". Se adaptan muy bien a todas las zonas donde faltan alimentos ricos en proteínas; se alimentan prácticamente de todas las sustancias orgánicas, no tienen pretensiones, se multiplican rápidamente, son resistentes a las enfermedades y tienen una carne muy valiosa.



Fig. 8.26 *Tilapias* transgénicas (izquierda) en comparación con peces normales.



Fig. 8.27 Norman McLean, de la Universidad de Southampton, trabaja con *Tilapias* y *Medakas* transgénicas.



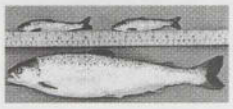


Fig. 8.28 Truchas salvajes (arriba) y comparación del tamaño de la trucha del Pacífico transgénica con las truchas salvajes (abajo).



Fig. 8.29 Choy L. Hew, de la Universidad de Singapur, trabajaba con peces anticongelantes transgénicos y ahora junto a Norman McLean con *Tilapias*.



Fig. 8.30 En los arrecifes de coral se pesca en exceso, en parte con métodos ilegales de captura, como cianuro y dinamita.



Fig. 8.31 Ratones *knock out*.

coloreadas en el lago Victoria, y la mitad de las especies del lago se han extinguido.

El gran miedo de **poner en libertad** peces transgénicos, ya sea de forma intencionada o no, es que se crucen con las poblaciones salvajes existentes. Según la situación climática, prácticamente no se puede evitar que se escapen los peces de las piscifactorías. Trabajos recientes se están ocupando de la cría de peces transgénicos que sean estériles y, por lo tanto, no puedan propagar sus genes.

Por el contrario, los bovinos y los cerdos transgénicos no vuelven a su estado salvaje con tanta facilidad en los países desarrollados densamente poblados. Simplemente se capturan y se comen. Existen excepciones: en las difícilmente accesibles islas Galápagos los cerdos domésticos convertidos en salvajes se comían las nidadas de las famosas tortugas que inspiraron a Darwin. Previamente las tortugas no habían tenido ningún enemigo que se las comiera, aparte de las gaviotas.

En Japón y en Estados Unidos, por sólo cinco dólares se puede comprar el **pez cebra transgénico** desarrollado por un investigador de Singapur, que es fluorescente bajo la luz ultravioleta. Se llama *GloFish®* y es el primer animal doméstico transgénico (Cuadro 8.2). El *GloFish®* es portador, en su material hereditario, de la proteína de fluorescencia verde (*green fluorescent protein,* GFP) de una medusa luminosa.

El *GloFish®* es un pez cebra tropical (*Danio rerio*) que lleva adicionalmente el gen fluorescente de la medusa luminosa (*Aequorea victoria*). Mientras que los peces cebra normales son negros-plateados, el *GloFish®* manipulado brilla de un color rojo intenso aun con una mínima luz incidente. En un principio, los peces luminosos se desarrollaron en la Universidad Nacional de Singapur para calcular la suciedad ambiental en el agua. Una forma anterior de los peces manipulados sólo se coloreaba de verde o rojo cuando el agua donde nadaban contenía sustancias tóxicas.

También el **"monito transgénico" ANDi**, el primer primate transgénico engendrado en el año 2000, lleva el gen de la medusa. ANDi es una inversión de la abreviatura de *inserted DNA* (DNA insertado). La GFP actúa aquí como "proteína informadora", o sea, como marcador para rastrear genes activados. Por una parte, el gen se transmitió de forma satisfactoria, pero no se activó.

Por el contrario, en el año 2003 esto sí se consiguió con los **cerdos**: 30 cochinillos brillaban en verde en el establo del biólogo reproductor de Munich **Eckhard Wolf** y del farmacólogo **Alexander Pfeifer**. Como vehículo de transporte para el gen de la medusa se utilizaron lentivirus (Cuadro 8.3). De este modo, el *Gen-Pharming* empieza a convertirse en realidad.

Sin embargo, con toda esta fascinación no se pueden dejar de lado las **dudas éticas.** Naturalmente, es más fácil utilizar vacas, ovejas o cabras transgénicas para la producción láctea que ordeñar ratones.

Ya se han producido de esta manera diversos productos farmacéuticos, ¡incluso en cantidades de 35 g/l de leche! Los productos pueden aislarse de la leche o beberse directamente con ella. Una buena vaca lechera puede suministrar al año aproximadamente 10 000 litros de leche. Con esta cantidad se podrían cubrir todas las necesidades de Estados Unidos (120 gramos) del factor VIII de la sangre (para tratar la hemofilia). Por lo demás, este método de producción no está (todavía) autorizado. Otras proteínas que se desean obtener son la insulina, la eritropoyetina (EPO, Cap. 9), el fibrinógeno, la hemoglobina, la interleuquina-2, la hormona del crecimiento y también los anticuerpos monoclonales.

Queda esperar quién será el ganador en el *Gen-Pharm*: los animales transgénicos (con una carga emotiva para los amantes de los animales) o sus homólogos mudos, las plantas transgénicas (Cuadro 7.7 del Cap. 7).

8.9 Ratones *knock out*

Las hembras de ratón tienen hasta ocho veces al año de tres a ocho ratoncitos en cada parto. Después de cuatro a seis semanas, éstos alcanzan la madurez sexual y viven unos dos años. Es decir, que una hembra de ratón puede traer al mundo hasta su muerte a 150 descendientes. Por este motivo, los ratones son animales de laboratorio ideales.

El ratón desnudo, sin pelo, que se utiliza normalmente para pruebas de tolerancia de la piel es el llamado **ratón *knock out*** (Fig. 8.31), que ha sido una pesadilla para los medios de comunicación. Sin embargo, es fácil olvidar que no se habría podido avanzar en la investigación de enfermedades humanas importantes sin los ratones SCID (inmunodeficientes), los oncorratones (cáncer) y los ratones con la presión arterial elevada. Más de 5000 enfermedades humanas se deben a defectos genéticos.

Mediante ***gene targetting*** (del inglés *target*, objetivo) se desconectan genes individuales para luego observar en el aspecto externo (fenotipo) qué papel desempeña el gen. Puesto que probablemente poseemos un 99% de contrapartidas humanas correspondientes a los genes de los ratones, esto proporciona muchísima información.

Para ello se transfiere un gen no funcional (**gen *knock out***) a células madre embrionarias (CME). Previamente se puede cortar una sección del DNA o sustituir una parte del DNA por DNA no funcional. El gen introducido se asocia físicamente con el gen correspondiente de un cromosoma de ratón. A continuación se produce un intercambio hasta ahora poco conocido (recombinación homóloga). Las células madre embrionarias manipuladas de esta forma se inyectan en un embrión prematuro con la esperanza de que se integren. El embrión se implanta en una madre de alquiler. Después, los ratones se reproducen para ver si el gen *knock out* se transfiere. Dado que en un principio existen dos copias de cada gen (uno normal, el otro inactivado), el ratón es heterozigótico para este gen especial. Si se le aparea con otro ratón heterozigótico se generan ratones homozigóticos que no producen la proteína correspondiente que se debe inhibir. Se necesitan dos generaciones de ratones procreados en consanguinidad (*crossbreeding*) para obtener animales que sean completos *knock outs* (Fig. 8.31).

Tales ratones *knock out* han hecho avanzar de forma espectacular, por ejemplo, la investigación de la **fibrosis quística** humana. La fibrosis quística (o mucoviscidosis) es la enfermedad hereditaria más extendida en Europa. Aproximadamente uno de cada 2000 recién nacidos está afectado, y uno de cada 20 es portador del gen defectuoso. Los pacientes producen en sus pulmones grandes cantidades de mucosidad. Esto provoca dificultades respiratorias y propensión a las infecciones pulmonares. Hasta el momento es incurable. Hay que darse clara cuenta de que este método experimental también podría ser adecuado para "noquear" a los genes cancerígenos.

8.10 Xenotrasplantes

Las necesidades de órganos para trasplantar están creciendo de forma muy importante. En Estados Unidos hay 45 000 personas menores de 65 años esperando un trasplante de corazón. Frente a esto, sólo hay 2000 corazones de donantes adecuados. La necesidad crece, pero la disponibilidad de donantes se estanca. Por tanto, se está intentando obtener **órganos xenólogos** de animales u obtener órganos en cultivos celulares.

Los **cerdos** son los más adecuados (Fig. 8.32) para suministrar órganos a los humanos (por tamaño, fisiología, anatomía). Sin embargo, el problema principal es la reacción de rechazo inmunitario: los anticuerpos humanos reaccionan ante los antígenos de las superficies celulares del órgano del cerdo como ante una molécula extraña que se debe combatir. Ahora, este rechazo inmunitario se desconecta genéticamente. El primer cerdo transgénico, Astrid, se engendró en 1992. Los cerdos transgénicos producen reguladores humanos del rechazo inmunitario, de modo que el órgano no se identifique inmediatamente como "extraño". En los primeros cerdos transgénicos que desarrolló la empresa escocesa PPL Therapeutics, especialmente para xenotrasplantes, se "paralizó" el gen de la α-1,3-galactosil transferasa. Este gen codifica una enzima significativa que forma azúcares en la membrana celular de los cerdos.

Estos azúcares son importantes para la respuesta inmunitaria. Su carencia aumenta las posibilidades de que el organismo receptor no rechace el tejido.

De todas maneras, los corazones de cerdos sobrevivieron de 30 a 60 días en primates antropomorfos. Por el contrario, los corazones control no transgénicos fueron atacados en cuestión de minutos por el sistema inmunitario del receptor. Para ello, los receptores tuvieron que ser tratados con inmunosupresores (con ciclosporina, Cap. 4).

Existen auténticos **riesgos** de que algunos virus de animales (por ejemplo el virus PERV, *porcine endogenous retrovirus*), que son inocuos para los cerdos, se transfieran a los seres humanos a través de los órganos trasplantados y allí resulten no ser tan inocuos.

Es de esperar que las células islote de los cerdos que producen insulina humana a partir de cerdos *knock out* (que no producen insulina porcina) se trasplanten para tratar la **diabetes** grave.

Una posibilidad que entraña un menor riesgo es la **ingeniería de tejidos** (*tissue engineering*). En ésta, por ejemplo, se cultivan células cartilaginosas de la nariz humana en una estructura de polímero en un caldo de cultivo. Debido al problema inmunitario, lo mejor es utilizar células cartilaginosas del mismo individuo. A partir de ahí es verdaderamente posible formar narices y luego trasplantarlas (Figs. 8.33 y 8.34).

8.11 Clonación –Producción masiva de gemelos

A algunas personas, el concepto de "clonación" les parece inquietante. Sin embargo, la palabra griega "clon" sólo significa vástago o rama.

Todos los jardineros clonan cuando plantan una rama o hacen un injerto en un árbol frutal. Los biólogos lo denominan reproducción asexual.

Los pulgones son los maestros de la clonación. Las abejas macho, los zánganos, salen de huevos no fecundados (Fig. 8.36).



Fig. 8.32 Los cerdos transgénicos producen órganos para xenotrasplantes.



Fig. 8.33 Una gran nariz famosa: el precursor francés de la Ilustración, el oficial de espíritu libre y amante de los duelos Cyrano de Bergerac (1619-1655), habría aprovechado bien la ingeniería de tejidos y se habría ahorrado muchas preocupaciones.



Fig. 8.34 Una visión: el autor en el taller de ingeniería de tejidos antes del trasplante de una nariz nueva.

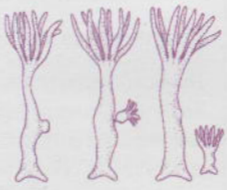


Fig. 8.35 Los pólipos pueden reproducirse mediante brotes.

Cuadro 8.3 Opinión de los expertos: la clonación en Alemania

El 23 de diciembre de 1998 vino al mundo Uschi en Munich. Uschi es la primera ternera europea que se clonó, como Dolly, a partir de células de un animal adulto.



Uschi es la primera ternera clonada europea.

¿Qué es la clonación por transferencia nuclear?

En realidad, la transferencia nuclear es una técnica fácilmente comprensible. Expresado de forma sencilla: el núcleo celular de una célula de donante se introduce en una célula que previamente se ha desnucleado. A partir de ahí se forma un nuevo embrión. Francamente, uno muy especial, ya que tanto en la oveja Dolly como en la ternera Uschi el núcleo celular procedía de células de la ubre.

Para nosotros, los biólogos reproductores, después de la transferencia nuclear ocurre algo fascinante que todavía no acabamos de entender: el núcleo celular, que hasta ahora estaba especializado total y completamente en su función en la ubre, se reprograma. Se convierte y se "rejuvenece" en un núcleo celular que puede volver a activar el programa para todas las funciones orgánicas posteriores. Además, se detiene temporalmente el programa genético y se vuelve a poner en funcionamiento mediante mecanismos complejos. El óvulo unido artificialmente y el núcleo celular funcionan entonces como una unidad –comparable a los procesos que ocurren tras fecundar un óvulo. El éxito de una transferencia nuclear depende, sobre todo, de esta interacción.

Se ha derribado un dogma de la biología

Los experimentos pioneros en el Instituto Roslin de Edimburgo demostraron, en primer lugar, que en determinadas circunstancias incluso las células de los animales adultos son adecuadas para la transferencia del núcleo. Estos experimentos, cuya culminación es la oveja Dolly generada a partir de células de la ubre, contradijeron un dogma de la biología celular, según el cual sólo las células embrionarias pueden formar un organismo completo. En consecuencia, muchos científicos famosos dudaron de estos trabajos. Entretanto se han disipado estas dudas después de haber repetido el procedimiento con éxito en diversas especies de animales. Además de otros grupos de trabajo en Japón, Estados Unidos y Nueva Zelanda, nuestro grupo de Munich consiguió en 1998 realizar una clonación por transferencia nuclear con células de un animal adulto. De 93 óvulos fusionados con éxito, 32 (el 34%) se desarrollaron a blastocito, o sea, en un embrión de pocos días de vida que se podía trasplantar a la madre de alquiler. En nuestro estudio piloto sólo se transfirieron cuatro de los embriones a dos hembras receptoras. Ambas se quedaron preñadas, pero una abortó en el quinto mes. No se identificaron modificaciones patológicas en este feto, aunque algunas particularidades de la placenta indicaban un fallo en la conexión entre madre y feto. La otra gestación discurrió sin problemas y culminó con el nacimiento de la ternera sana. Uschi, la primera ternera clonada a partir de células adultas en los países de habla alemana, se sigue desarrollando con toda normalidad hasta el día de hoy. Y ya ha dado a luz dos terneros propios.

Biotecnología de la reproducción –La clave para cumplir más rápido los objetivos de la cría

Hasta ahora, los conocimientos de la cría de animales sobre la herencia de cualidades siempre se debían derivar del fenotipo, es decir, de las características externamente reconocibles del animal. En la actualidad, los métodos de manipulación genética proporcionan un acceso directo al material hereditario. El objeto del análisis del genoma es poder entender con la máxima precisión la estructura y la función del material hereditario a fin de identificar características genéticas importantes y poderlas seleccionar para la cría.

Pero esto es sólo un aspecto: para poder aprovechar al máximo las ventajas de la identificación directa de genotipos se necesita aumentar de forma selectiva el índice de reproducción de animales genéticamente ventajosos. En la cría de bovinos, la inseminación artificial ya era habitual en los años 1950. Ésta permite una selección estricta de los toros sementales. La biotécnica de la transferencia embrionaria (TE), que abarca la estimulación hormonal del índice de ovulación de animales donantes genéticamente valiosos, la obtención de embriones y la transferencia de éstos a animales receptores, permite mejorar también la selección de las hembras. Sin embargo, este procedimiento es complicado, costoso y a menudo no es lo suficientemente eficaz. Por ello no se puede renunciar a alternativas o técnicas complementarias al procedimiento de TE convencional.

En la producción *in vitro* (PIV) de embriones bovinos se obtienen óvulos de ovarios de vacas sacrificadas, se maduran en cultivos, se fecundan y se cultivan durante un periodo de seis a ocho días hasta que alcanzan fases en que son aptos para la transferencia. La PIV de embriones bovinos tiene una importancia eminentemente práctica, ya que permite obtener descendientes de animales pertenecientes a razas genéticamente valiosas o amenazadas, los cuales se han tenido que sacrificar por la edad u otros motivos.

Cada vez más se obtienen óvulos de terneras y vacas vivas (*ovum pickup*, OPU) y se utilizan para la PIV de embriones bovinos. Esta forma de obtener óvulos es una biotécnica importante para aumentar el número de terneros de animales de cría valiosos.

Clonación: continuación de la biotécnica en la cría de animales

La clonación todavía se encuentra en su mayor parte en fase de investigación básica. Antes de que se disponga sistemáticamente de esta biotécnica para la cría de animales, como mínimo se deberán haber comprendido ampliamente los mecanismos biológicos. Sólo de este modo se podrán solucionar los problemas de las gestaciones o de los terneros procedentes de la clonación. El punto clave de la investigación radica en la sincronización de donante de núcleo y óvulo receptor para garantizar un programa genético intacto. El desarrollo de condiciones de cultivo óptimas para embriones bovinos clonados constituye otro punto clave del trabajo.

El proceso de la clonación por transferencia nuclear (Fig. 8.52) es interesante, en primer lugar, para la investigación básica, pero sin duda también ofrece perspectivas a la cría de animales. Los mecanismos de reprogramación enormemente complejos que experimentan los embriones clonados fascinan a numerosos equipos de investigadores en todo el mundo. Los clones por transferencia nuclear representan un modelo excelente para el estudio de mecanismos epigenéticos.

En biotecnología, la clonación es sobre todo interesante para una transferencia genética selectiva. Hasta ahora, para la transferencia genética en animales útiles se tenían que inyectar muchas copias de la información genética a transferir en el óvulo fecundado. Sin embargo, este procedimiento es muy poco eficaz, ya que sólo una pequeña parte de los óvulos inyectados integra verdaderamente la información en el material hereditario; se deben inyectar cientos de óvulos fecundados para obtener uno o dos terneros que sean portadores del gen deseado adicional, o modificado, beneficioso.

Si se elige la estrategia de la clonación, se puede realizar el paso real de la transferencia genética al cultivo celular. Se seleccionan entonces las células que han integrado la información deseada de forma estable y se transfieren sus núcleos a óvulos desnucleados, generándose así un embrión por transferencia nuclear. Éste puede entonces transferirse a un animal receptor y desarrollarse hasta convertirse en un ternero transgénico.

La clonación de cerdos a partir de células modificadas genéticamente de forma selectiva es sobre todo relevante para la modificación genética de cerdos como donantes de órganos para xenotrasplantes. Con este método es posible, por ejemplo, eliminar según una base genética los restos de azúcar molestos de la superficie de las células porcinas que son causa del rechazo hiperagudo de los tejidos de cerdo en los primates. Sin embargo, con esto sólo se supera la primera cascada de una reacción de rechazo compleja. Para permitir una supervivencia más larga a los receptores de xenotrasplantes se deben combinar diversas estrategias y producir cerdos multitransgénicos. Para ello hemos establecido un nuevo método muy eficaz.

Éxito de la medicina de los trasplantes

Conjuntamente con **Alexander Pfeifer,** del Departamento de Farmacia, utilizando cochinillos fluorescentes logramos integrar de forma eficaz una sustancia hereditaria extraña en el material genético de mamíferos superiores. Como vehículo para la sustancia hereditaria extraña se utilizó un virus que puede penetrar en las células de los mamíferos. Como sustancia hereditaria extraña se escogió un gen que codifica la proteína de fluorescencia verde (*Green Fluorescent Protein*, GFP) –un marcador óptimo de los tejidos. La mayoría de los cochinillos que nacieron tenían el gen activo de la GFP en todos sus tejidos e incluso se transmitió a sus descendientes. Éste es un paso más en el camino hacia la integración selectiva de genes, y de las características deseadas relacionadas con ellos, en animales de granja, y hacia la utilización de órganos animales para trasplantes en seres humanos. Mediante la transferencia selectiva de material hereditario se logró que los tejidos se adaptaran a los receptores humanos correspondientes y tuvieran más resistencia inmunitaria.

Hasta el momento sólo se había logrado introducir genes de otras especies, es decir, segmentos de la sustancia hereditaria DNA, de forma poco eficaz en las células de mamíferos superiores. En la mayoría de los casos, el material hereditario se inyectaba para su implantación, lo cual es muy complejo y tiene un índice de éxito muy bajo.

Los virus como vehículo para genes extraños son una alternativa mucho más prometedora. Poseen la capacidad de introducirse en las células extrañas y allí construyen su propio material hereditario –al igual que los genes extraños– en el DNA del organismo infectado. Sin embargo, hasta entonces, el método había fallado a menudo debido a que el material hereditario viral quedaba inhibido por las células y no se podía volver a activar.

En el Centro de Investigación Farmacéutica, el grupo de trabajo de Alexander Pfeifer consiguió solventar este problema mediante la tecnología viral más moderna. Utilizaron un lentivirus, con el cual se infectó a los embriones porcinos en una fase muy temprana, es decir, en la fase unicelular. En total nacieron 46 cochinillos. En 32 animales, que correspondían a un 70%, se pudo probar la existencia de la GFP. En 30 cerdos, es decir, el 94% de este grupo, el gen estaba además activo. En realidad no sólo se iluminaron de verde todos los tejidos y las células germinales, sino que el gen se transmitió incluso a los descendientes de los cochinillos.

En un experimento posterior probamos si era posible activar DNA ajeno sólo en ciertos tejidos del cerdo. Para ello se volvió a introducir el gen de la GFP en los embriones, pero primero se colocó un trozo de DNA humano que, entre otras cosas, es el encargado de activar un gen en ciertas células epiteliales. El gen de la GFP volvió a aparecer realmente en todos los tejidos de los cochinillos, pero sólo estaba activo en las células epiteliales. A partir de entonces se ha establecido también este proceso para los bovinos.

Clonación terapéutica y reproductiva

Los temas relativos a la "clonación terapéutica y reproductiva" suscitan discusiones muy acaloradas. En mi opinión, por ese motivo no deben separarse estrictamente, ya que todos los pasos hasta la generación de un blastocito (embrión en el séptimo día de fecundación) son iguales para ambas.

La separación no se produce hasta que se toma la decisión de qué hacer con el embrión: colocarlo en el cultivo celular para establecer a partir de ahí las células pluripotentes o implantarlo en una mujer en la fase de ciclo adecuada, después de la cual se desarrollará un niño, al menos en teoría.



Cerdos transgénicos, cuyos genes GFP se transfieren con lentivirus, que se iluminan de color verde.

La solución puede tener que regularse legalmente, pero se han preprogramado casos límite. Creo que con la clonación terapéutica también conseguiremos que la reproductiva sea posible a largo plazo. También estoy bastante seguro de que ciertos círculos de médicos reproductores pedirán en poco tiempo que se autorice la clonación reproductiva en casos especiales de clonación terapéutica –es decir, para tratar la esterilidad.

Por tanto, estoy a favor de que se prohíba la clonación terapéutica tal y como es válida *de facto* en Alemania con la Ley de Protección de los Embriones hasta que se hayan agotado todas las posibilidades de una terapia de sustitución de células.



El Dr. Eckhard Wolf es profesor titular de Cría Molecular de Animales y Biotecnología en la Universidad de Munich.

Cuadro 8.4 Historia de la biotecnología: "Clonología"

La cronología de la clonación (según Hwa A. Lim en su libro "*Sex is so good, why clone?*", también llamada "clonología") comenzó probablemente con la partenogénesis ("reproducción asexual") por parte del embriólogo alemán **Oskar Hertwig** (1848-1922), quien aplicó estricnina o cloroformo a huevos de erizo de mar e hizo desarrollar los huevos sin espermatozoides.

Jacques Loeb (1859-1927) lo repitió tres años después. En 1900, Loeb hizo desarrollar huevos de rana no fecundados pinchándolos con una aguja; en 1936, **Gregory Goodwin Pincus** (1903-1967) lo consiguió con óvulos de conejo mediante "shock" térmico. Hasta 2002 no se informó de que se hubiese realizado una partenogénesis, por parte de **Jose Cibelli,** de Advanced Cell Technology, para un primate, un macaco llamado Buttercup.



Paul Berg fue el primero en clonar genes con éxito, y posteriormente invocó una moratoria para mantener bajo control los experimentos con DNA. En 1980 recibió el premio Nobel.

La clonación de genes la realizaron en 1972 **Paul Berg, Stanley Cohen, Annie Chang** (Stanford), **Herbert Boyer** y **Robert B. Helling** (Universidad de California en San Francisco) (Cap. 3): el DNA extraño que, por ejemplo, se introdujo en bacterias, se pudo copiar millones de veces, o sea, clonarse.

En 1976, **Rudolf Jaenisch** (Salk Institute, La Jolla) inyectó DNA humano en óvulos de ratón recién fecundados para producir ratones con una parte de DNA humano. Estos ratones *fundadores* transmitieron el material a sus descendientes. ¡Habían aparecido los ratones transgénicos!

Dos años más tarde, el 25 de julio de 1978, nació **Louise Joy Brown**, el primer "bebé probeta" (*test-tube baby*) de la historia, con los médicos británicos **Bob Edwards** y **Patrick Streptoe** como fundadores de la fecundación *in vitro* (FIV).



La clonación todavía sigue siendo polémica para la opinión pública.

En 1983, **Kary Mullis** (Cap. 10) descubrió un método con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para copiar millones de trozos de DNA y RNA, es decir, clonar.

Steen Willadsen clonó en 1984 un cordero vivo a partir de células embrionarias de oveja inmaduras. Un año después fue a Grenada Genetics para clonar bovinos comercialmente. Sin embargo, los animales generados a partir de células embrionarias contienen el material genético de ambos progenitores, dado que los embriones se han generado mediante fecundación sexual. En 1995, **Ian Wilmut** y **Keith Campbell** colocaron células embrionarias de oveja en una fase de reposo antes de transferir sus núcleos a células de ovejas. En 1996 nació Dolly.

Teruhiko Wakayama desarrolló en 1998, en Hawaii, la llamada técnica Honolulu, y creó varias generaciones de ratones genéticamente idénticos. En la Universidad Kinki japonesa se clonaron ocho terneros de una vaca. En Alemania, en 1998 vino al mundo la ternera clónica Uschi (Cuadro. 8.3).

En 1999, en Corea del Sur se extrajeron células de una mujer estéril y se clonaron en un embrión hasta la fase de cuatro células. El experimento finalizó por motivos éticos y jurídicos, sin llegar a implantarse.

Al mismo tiempo, en la Universidad A&M de Texas se clonó el ternero Second Chance a partir del toro brahmán de 21 años Chance. Éste es el animal clonado de más edad que existe. En el año 2000 se engendró mediante clonación Tetra, una mona *rhesus*, mientras que en Japón y Escocia se clonaron cerdos.

En el año 2001, **Steve Stice** triplicó el índice de éxito en la clonación de bovinos. Se utilizaron células epiteliales y renales. Por primera vez se utilizaron las células de una vaca que se había sacrificado 48 horas antes.

Prometea, el primer caballo *Haflinger* clonado, se engendró en 2003 en Italia a partir de células epiteliales.





Arriba: cerdos clonados. Abajo: Second Chance, el toro brahmán cuyo donante de núcleo, Chance, tenía 21 años y ya no era apto para la reproducción debido a una operación de testículos.



Fig. 8.36 Se generan zánganos por partenogénesis (reproducción asexual) a partir de óvulos no fecundados.

Cuanto más desarrollados están los seres vivos, menores son sus posibilidades de reproducirse asexualmente. Es probable que la **reproducción sexual** fuese una ventaja decisiva en la evolución para adaptarse a las nuevas condiciones del entorno. La competencia condicionada por la elección de un compañero garantiza la selección de los individuos mejor adaptados. Por otra parte, el material hereditario se clasifica cuando se forman las células germinales. Esto ofrece infinitas variantes mediante las que se asegura que existan individuos que se puedan adaptar a condiciones medioambientales nuevas, lo cual no ocurre con la clonación.

Es evidente que los factores evolutivos decisivos de variación y selección, según **Charles Darwin** y **Alfred Wallace,** se aprovechan mejor con la reproducción sexual.

Sin embargo, con la reproducción sexual también pueden generarse individuos genéticamente idénticos: los **gemelos** univitelinos. En los seres humanos, sin embargo, esto sucede sólo con una frecuencia del 0,3%.

Según **Jens Reich**, «desde el punto de vista genético, un clon no es otra cosa que un gemelo que viene al mundo con retraso».

8.12 Clonación de salamandras y ranas

El zoólogo alemán **Hans Spemann** (1869-1941) experimentó con embriones de salamandra. En el "experimento del suministro retrasado del núcleo" inhibió parcialmente un óvulo fecundado (zigoto), es decir, el núcleo celular se desplazó a un lado por estrangulación. Sólo se fecundó esa mitad. Si un núcleo segmentado se desliza posteriormente por debajo de la ligadura en la mitad sin núcleo, éste se inhibe y empieza a segmentarse más tarde. De ahí viene la denominación "suministro retrasado del núcleo". A partir de ambas mitades se desarrollan embriones completos. Debido a estas observaciones, Spemann propuso realizar el experimento de poner en marcha un desarrollo normal en el plasma celular del huevo con núcleos de células somáticas desarrolladas. En 1935 fue el primer zoólogo en obtener el premio Nobel en fisiología o medicina (Fig. 8.37).

Hoy en día, esta propuesta de Spemann se conoce como "**transferencia nuclear** en un óvulo al que se ha extraído el núcleo". **Robert Briggs** y **Thomas King** lo lograron por primera vez en 1952 en el Instituto de Investigación contra el Cáncer de Filadelfia. Dañaron con luz ultravioleta el núcleo de un óvulo recién fecundado y lo sustituyeron por el núcleo de una célula de blastocito de la rana leopardo. Los blastocitos son esferas huecas llenas de líquido con aproximadamente cien células, las cuales se forman una semana después de la fecundación del óvulo. El huevo activado de ese modo empezó a desarrollarse como renacuajo "huérfano de padre". Sin embargo, con núcleos celulares del estado embrionario gastrular, de néurula o de células corporales maduras (células somáticas), esto no funcionó.

Más famosas se hicieron las **ranas con garras** sudafricanas (*Xenopus laevis*) (Cap. 3) del biólogo inglés **John Gurdon** a principios de los años 1960. Con un capilar de vidrio muy fino pinchó cuidadosamente al microscopio una célula de la pared intestinal de un renacuajo y aspiró el núcleo (diploide, es decir, dotado de dos juegos de cromosomas) de estas células maduras. Seguidamente, con el mismo capilar pinchó el óvulo de una rana y transfirió el núcleo de la célula intestinal. El núcleo celular haploide (con un juego de cromosomas) del óvulo no fecundado se había destruido previamente por completo mediante radiación ultravioleta (UV) o mediante su aspiración. Por consiguiente, los fragmentos de DNA no podían reorganizarse. El éxito fue modesto: sólo algunos de los cien óvulos diploides construidos de esa forma se comportaron como un óvulo fecundado, empezaron realizando divisiones celulares y acabaron convirtiéndose en renacuajos y ranas completas (Fig. 8.39). También hubo animales mal formados y enfermos. ¡Pero la idea funcionó! Esto constituyó al mismo tiempo la prueba de la **omnipotencia** del núcleo celular en una célula intestinal diferenciada.

Puesto que los críticos seguían argumentando que la célula intestinal de un renacuajo no era una célula terminal, John Gurdon repitió posteriormente el experimento con células cutáneas flotantes (que se producen entre los dedos) de ranas con garras adultas. Mediante la clonación en serie obtuvo una mayor cantidad de animales adultos. Se define la **clonación en serie** como la transferencia nuclear en un oocito exento de núcleo, su crecimiento posterior a una blástula y después la nueva transferencia a los oocitos exentos de núcleo. Este principio corresponde al acondicionamiento del núcleo celular en la oveja clonada Dolly (ver más abajo). El DNA de un núcleo "terminal" puede, obviamente, "descomprimirse" para la transcripción sólo en ciertas condiciones experimentales.

Los resultados básicos de los experimentos de transferencia nuclear fueron los siguientes: una célula somática madura contiene toda la información para formar un organismo y, en circunstancias favorables, también puede convertirla en un programa de desarrollo. Sin embargo, la utilización coordinada de esta información es muy compleja y sólo funciona en raras ocasiones.

8.13 Dolly –El descubrimiento decisivo en la clonación

Posteriormente, durante décadas se estuvo intentando clonar mamíferos. Los experimentos con ratones en los años 1970 no tuvieron éxito. El volumen de un huevo de mamífero es 4000 veces menor que el de un huevo de rana. Un huevo de ratón tiene un diámetro de sólo una décima de milímetro.

En 1986 se produjo un descubrimiento en Cambridge: el biólogo danés **Sten Willadsen** extrajo el núcleo de las células de un óvulo de oveja. Introdujo núcleos de zigotos de oveja en los óvulos sin núcleo y allí se desarrollaron embriones. Sin embargo, los experimentos con núcleos de células somáticas maduras fallaron.

A mediados de los años 1990, los investigadores del equipo de **Ian Wilmut** (Fig. 8.40) y **Keith Campbell**, en el Instituto Roslin escocés, extrajeron células del útero de la oveja *Finn Dorset* adulta Tracy y las cultivaron en solución celular.



Fig. 8.37 Hans Spemann (1869-1941).

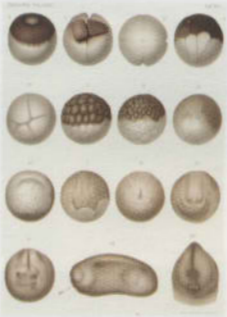


Fig. 8.38 Fases evolutivas de la rana con garras en un trabajo del embriólogo E.J. Bles publicado en 1905.





Fig. 8.39 Las ranas fueron los primeros animales que se clonaron.



Fig. 8.40 La superestrella Dolly con Ian Wilmut.

Fig. 8.41 Cómo se creó Dolly.

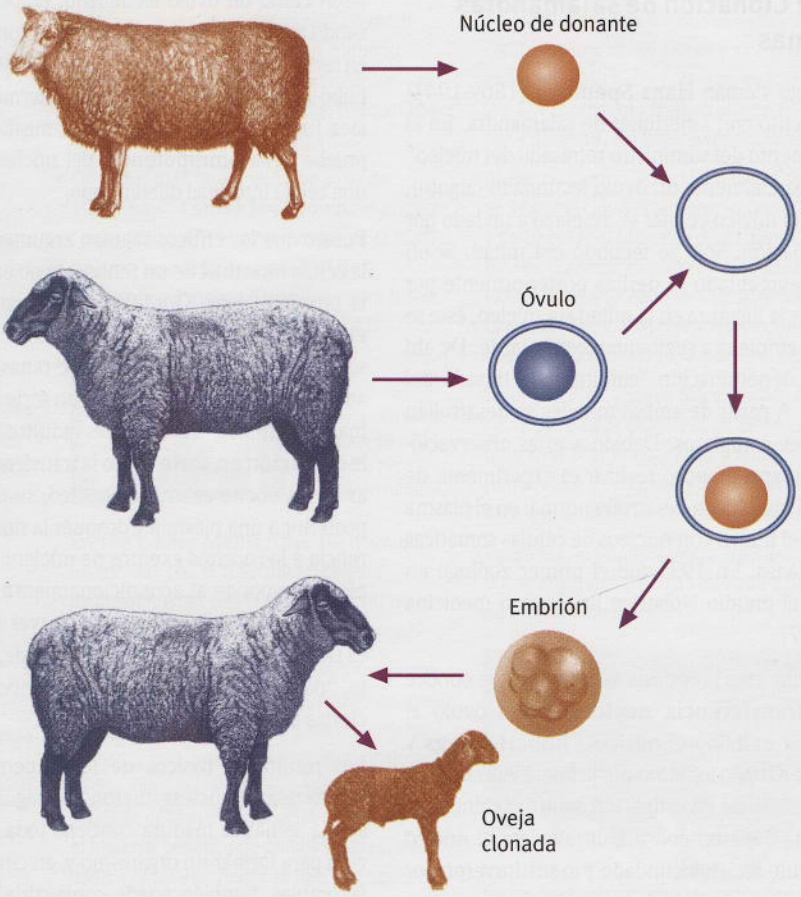










Fig. 8.42 Historia de Dolly (de arriba abajo): Megan y Morag, las primeras ovejas clonadas a partir de células embrionarias de cultivo; Dolly como superestrella huyendo de los medios de comunicación; Dolly y su primer cordero Bonnie.



Tracy ya estaba muerta cuando sus núcleos celulares se inyectaron en otra raza de oveja. El óvulo y el núcleo se estimularon en un medio de cultivo y se inició verdaderamente un desarrollo embrionario. Finalmente, la oveja clonada Dolly vio la luz del mundo el 5 de julio de 1996.

Dolly era la prueba viviente de que se pueden clonar mamíferos adultos, de que una célula somática normal puede "olvidar" todas las especificidades y puede actuar como si fuera un óvulo fecundado "totipotente". El breve escrito en *Nature* desmentía uno de los dogmas más pertinaces de toda la biología (Fig. 8.41).

Entre otras cosas, Dolly también tuvo suerte: de 277 experimentos, sólo 29 se convirtieron en embriones que podían transferirse. Las pocas hembras gestantes tuvieron abortos. La madre de alquiler de Dolly fue la única excepción feliz. A todos los que especulan en voz alta sobre la clonación humana, estas cifras deberían hacerles reflexionar. ¡Los embriones de oveja mal formados ya son lo suficientemente fértiles!

Posteriormente, la propia Dolly también fue madre por métodos "naturales": el 13 de abril de 1998, Bonnie vino sana al mundo. Por cierto, Dolly no era la única oveja clonada, sino que había tenido antecesoras: en 1995, las ovejas *Welsh Mountain* Megan y Morag se habían clonado directamente a partir de los núcleos de células embrionarias, con Taffy y Tweed, dos carneros *Black Welsh*, al mismo tiempo que Dolly a partir de **células fetales cultivadas.** Estos predecesores habían demostrado que se puede trabajar con células cultivadas. ¡El milagro de Dolly fue que se utilizaron células somáticas de la donante!

Mientras tanto, después de seis años de gloria, Dolly murió de una enfermedad pulmonar.

El único estudio sistemático antes de Dolly se había realizado con ratones clonados en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas de Tokio. Los ratones murieron prematuramente.

Los 24 terneros clonados de la empresa de clonación Advanced Cell Technology aún tienen que crecer antes de que se puedan ver los resultados. En febrero de 2003 murió en Australia la primera oveja clonada, a la edad de dos años y diez meses, con síntomas poco claros. Las enfermedades pulmonares como la que tenía Dolly son típicas de las ove-

jas viejas. Su madre donante tenía seis años cuando se le extrajeron las células. De inmediato se suscitó una discusión sobre la esperanza de vida de los animales clonados. En enero de 2002 ya se había puesto de manifiesto que Dolly tenía artritis, una enfermedad senil de las articulaciones. Al respecto, **Harry Griffin**, del Instituto Roslin, dijo: «Las ovejas pueden vivir de once a doce años. Se realizará una investigación *post mortem* y se informará de todos los descubrimientos significativos».

Entretanto se ha descubierto que algunos animales clonados poseen **telómeros** más cortos que sus congéneres de la misma edad. Los telómeros son caperuzas de cromosomas situadas en el extremo de éstos con una secuencia de repetición de DNA característica, la cual protege a los cromosomas (como los extremos de plástico de los cordones). Con cada división celular, los telómeros se hacen cada vez más cortos y, por lo tanto, pueden considerarse como medida para determinar la edad de las células (en algún momento, el cordón ya no tiene extremo de plástico).

Se está trabajando de forma intensiva en la activación de la **telomerasa** en las células humanas. Esta enzima aumenta el número posible de divisiones celulares de aproximadamente 50 a 300, aunque hasta el momento sólo en cultivos celulares. ¿Tenemos a la vista una posible fuente de juventud?

8.14 Dificultades de la clonación

Sin embargo, las dificultades de la clonación no sólo se deben a que la técnica es imperfecta, sino también obviamente a motivos biológicos.

El núcleo celular procede de una célula corporal totalmente desarrollada, en la cual ciertos segmentos de genes están bloqueados. Por ejemplo, una célula islote (para la producción de la hormona insulina) no tiene que fabricar las sustancias de una neurona. A su vez, una neurona no necesita insulina.

Con Dolly, Ian Wilmut **anuló la inhibición** dejando que los núcleos de las células somáticas extraídos pasaran hambre en un medio pobre en sustancias nutritivas. Probablemente, la empaquetadura del DNA volvió a su situación original. El DNA bloqueado se reprogramó.

Por lo general, el **núcleo celular del donante** está dañado de antemano. A menudo, la radiación UV, los radicales de oxígeno reactivo (ROS) y las sustancias tóxicas han dañado algunos puntos del genoma. En el caso de los seres humanos hay que añadir el alcohol, los medicamentos, los rayos X y los alimentos a la parrilla. Normalmente, estos daños no afectan a la célula somática puesto que no necesita esta información que se ha dañado. El daño no se hace evidente hasta que se produce la reprogramación y el nuevo desarrollo como clon. De este modo también se podría explicar el hecho de que el clon envejezca prematuramente.

Por último, la interacción entre óvulos desnucleados y núcleos celulares inoculados no funciona sin fallos. El **plasma celular del óvulo** controla la función del núcleo celular correspondiente con ciertos principios activos. Si no se ha reprogramado correctamente, se producen malentendidos. En la fecundación normal se desmetilan los cromosomas paternos poco después de penetrar en el óvulo (se eliminan los grupos CH_3). Así, en una fase posterior, el óvulo ya no los produce porque normalmente no los necesita.

La "euforia de la copia" de los medios de comunicación tampoco está justificada desde el punto de vista científico: ¡la mayoría de los clones actuales no son en absoluto copias idénticas de los donantes!

Como todos los animales clonados, Dolly recibió un núcleo celular de la madre donante, pero utilizó el plasma celular de la donante de óvulos y, de este modo, recibió su DNA mitocondrial. Las **mitocondrias,** incluso para la fecundación normal, proceden siempre de la madre (procedencia materna). ¡El DNA de las mitocondrias del óvulo es importante y también puede utilizarse para las huellas dactilares de DNA (Cap. 10)!

Por tanto, Dolly fue el producto del DNA nuclear del donante más el DNA mitocondrial del óvulo, y además con la influencia de la hormona de la hembra de alquiler. Dice Ian Wilmut al respecto, en su libro *La segunda creación de Dolly a la clonación humana*: «Por ese motivo, Dolly y la oveja madre, de la cual procede el núcleo original, tienen un DNA idéntico, pero no un citoplasma idéntico. Visto de esta forma, Dolly no es un clon "real" de la oveja madre original. Simplemente es un clon de DNA o un clon genómico».

Él formula cuidadosamente: «Aunque las células del cuerpo de Dolly proceden de una célula que, sobre todo, contenía citoplasma de *Scottish Blackface*, en esta célula también había algo de citoplasma *Finn Dorset*, que rodeaba al núcleo celular del donante. Naturalmente, el oocito que procedía de *Scottish Blackface* era mucho mayor que la célula somática cultivada que suministró el núcleo *Finn Dorset*, de modo que se podía haber afirmado que la menor contribución de *Finn Dorset* simplemente se había suprimido. En realidad, parece que esto efectivamente es así».

La parte de citoplasma y de hembra de alquiler en la apariencia externa del clon quedó clara cuando se clonaron gatos.



Fig. 8.43 Mitocondria. Con la fecundación normal, las mitocondrias también proceden siempre de la madre y contienen DNA mitocondrial.



Fig. 8.44 Potro clonado en Texas, llamado Paris-Texas por la película de Wim Wenders.



Fig. 8.45 Venado clonado.



Fig. 8.46 Los gatos tienen 19 pares de cromosomas. Sin embargo, sólo el cromosoma X femenino contiene información sobre el color. Por tanto, los machos (XY) sólo pueden transmitir en la herencia su información de color a sus descendientes hembras (XX); las células de semen con los cromosomas Y no son portadoras de ninguna información de color. Por tanto, los machos heredan su color (negro o rojo) siempre de su madre. Aquí se muestran dos fenómenos importantes: mi gata tricolor Fortuna ha capturado la cola de una lagartija, y ésta, que ha salvado la vida, se regenera.



Fig. 8.47 Mark Westhusin con "Cc" *Carbon copy.* ©Larry Wadsworth, Texas A&M College of Veterinary Medicine.







Fig. 8.48 La madre verdadera Rainbow (arriba) y la madre de alquiler de "Cc" (centro) con *Carbon copy* (abajo).



Fig. 8.49 Los colores de los gatos clonados fueron una sorpresa para los investigadores (ver texto).

8.15 Clonación de gatos –Las diferentes variantes de progenitores

En el caso del gato, es necesario aclarar la clonación. En primer lugar, existen diversas variantes de "progenitor":

1. Una gata hembra puede donar su óvulo. A éste se le extrae el núcleo celular y se introduce un núcleo en sus células somáticas. El embrión que se genera de este modo se implanta en la misma gata. Ella será donante de óvulo, de células somáticas y madre de alquiler al mismo tiempo. Es decir, un progenitor.
2. El núcleo de las células somáticas puede proceder de otro gato (macho o hembra) y el óvulo se vuelve a implantar en la donante de óvulo. Es decir, dos progenitores.
3. El óvulo y la célula somática proceden de diferentes gatos, y la hembra de alquiler es una tercera gata: tres progenitores.

El procedimiento que se realiza a continuación es igual que en el caso de Dolly. Paso a paso:

- Se extraen células somáticas de la gata, a las cuales se hace "pasar hambre" en medios de sustancias nutritivas. Seguidamente, sus núcleos celulares se extraen de forma química o mecánica.
- Mediante manipulación hormonal, una gata donante produce varios óvulos al mismo tiempo en lugar de uno (superovulación). Éstos se extraen por punción (como en la fecundación artificial) y se les extrae el núcleo. Lo único que queda es el contenido de la célula desnucleada (¡que sin embargo todavía contiene el importante DNA mitocondrial!, ver arriba).
- El núcleo donante se introduce en el óvulo desnucleado. Esto se puede realizar con micropipetas o mediante pequeños impulsos eléctricos. El óvulo tiene ahora un juego de cromosomas diploide (como si se hubieran unido normalmente el óvulo y el espermatozoide). Se excitará con impulsos eléctricos para lograr que se divida. En la fase de ocho células puede investigarse si el embrión tiene daños hereditarios.
- El embrión en crecimiento se implanta en el útero de una gata de alquiler, que parirá.

Cuando se trata de clonar una gata, en lugar de utilizar una nueva hembra de alquiler, la propia gata donante del núcleo celular puede actuar como hembra de alquiler. En teoría, la gata se clonará a sí misma. Es muy probable que, en ese caso, la gatita clonada fuera enormemente parecida a ella, un clon auténtico. Por el contrario, cuando hay que clonar un gato macho, éste no puede prescindir en absoluto de la ayuda de las hembras. Sin embargo, la gata puede ser hermana gemela, madre ovular y madre de alquiler de un clon.

La gata tricolor "Cc" o *Carbon copy* (copia con papel carbón) nació en 2001, dos días antes de Nochebuena. Los investigadores tejanos que trabajaban con **Mark Westhusin** (Fig. 8.47) explicaron que se había clonado un gato por primera vez en la historia.

¿Y por qué la **muestra de color** de Cc no es idéntica a la de la donante del núcleo celular y del óvulo *Rainbow*? En realidad, la muestra de color es muy similar a la de *Rainbow*. Naturalmente, la piel y el patrón no se parecen a la hembra de alquiler ("madre surrogada") porque genéticamente se trata de dos gatos completamente diferentes (Fig. 8.48).

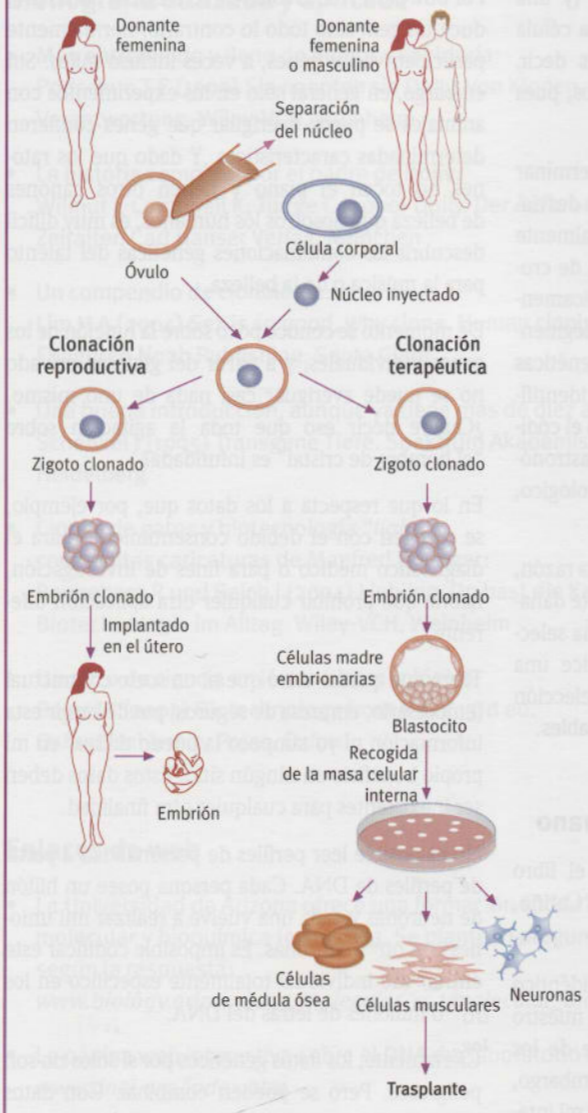
¡Sin embargo, no puede esperarse que el patrón de color del clon sea exactamente igual al de la gata donante! El motivo es que el patrón de color es el resultado de influencias genéticas e **influencias del entorno**.

Por ejemplo, tiene influencia la posición del embrión en el útero de la hembra de alquiler, cuyos folículos pilosos específicos alcanzan las células que producen los pigmentos. Otros factores del entorno también pueden contribuir a crear pequeñas diferencias entre el clon y el donante. Asimismo, la alimentación de la hembra de alquiler puede influir en el tamaño del gatito al nacer (Fig. 8.49).

¡Habría que recordar que un clon es genéticamente idéntico al donante, pero no es el mismo animal! Por consiguiente, existen diferencias de aspecto, pero ninguna es drástica.

Los tejanos utilizaron las denominadas células cúmulo para clonar a Cc. Las células cúmulo rodean al óvulo durante la maduración en la trompa uterina de la hembra. Alimentan al huevo antes y justo después de la ovulación. Los científicos tejanos creen que las células cúmulo son más adecuadas que los fibroblastos. En primer lugar se produjeron 82 embriones clonados (a partir de núcleos celulares de fibroblastos epiteliales) y se implantaron en siete hembras de alquiler. ¡No hubo suerte! Seguidamente se utilizaron las células cúmulo de *Rainbow* y se generaron embriones clonados. Estos embriones se implantaron en la hembra de alquiler y 66 días después nació Cc.

¿Hay que utilizar entonces células cúmulo para clonar gatos? No, Cc sólo es el primer gato clonado. Los otros seis animales clonados (ovejas, cabras, bovinos, cerdos, ratones y el gaur) se obtuvieron a partir de núcleos celulares de fibroblastos congelados y luego descongelados de forma natural.



Cuadro 8.5 Fecundación *in vitro* en los seres humanos

Se inicia con la obtención de óvulos mediante una punción en las trompas uterinas. La técnica está muy desarrollada, pero aún oculta algunos problemas. La mujer debe someterse a un tratamiento hormonal a fin de que maduren simultáneamente varios óvulos en los ovarios. Por tanto, pueden producirse trastornos hormonales. Mediante ultrasonidos en la pared abdominal se determina si hay suficientes vesículas ovulares (folículos) maduras. Del mismo modo, mediante control ecográfico se extraen los folículos con una inyección. Esto se realiza por lo general desde la vagina, si es necesario con anestesia local. Se pueden producir infecciones y hemorragias. Con este método es posible obtener de ocho a diez óvulos; las células de semen las proporciona el hombre mediante masturbación.

En el laboratorio se fecunda el óvulo con una muestra de semen. La fusión de ambas células en un medio de cultivo en incubadora se desarrolla, por consiguiente, fuera del cuerpo femenino. Entre el tercero y el quinto días, o sea, en la fase pluricelular, el embrión se transfiere al útero (transferencia embrionaria, TE). En caso de éxito se produce el embarazo normal. Sin embargo, el éxito no es lo más usual: sólo del 10 al 15% de las veces tiene éxito. Cuando se fecundan varios óvulos en una tanda de tratamiento y se implantan, siempre hay embarazos múltiples. Por ese motivo, en Alemania no pueden implantarse simultáneamente más de tres embriones, pero en Estados Unidos son seis.

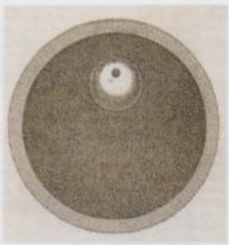


Fig. 8.50 Así veía Ernst Haeckel, en su libro *Anthropogenie oder Entwicklungsgeschichte des Menschen* (Antropogenia o historia de la evolución del hombre), un óvulo humano.



Fig. 8.51 Similitudes sorprendentes entre los embriones humanos, de oveja, de murciélago y de gato (tabla de Ernst Haeckel).







Fig. 8.52 De la ecografía (arriba, 5ª semana) hasta el bebé vivaracho recién nacido Theo Alex Kwong; no obstante, funcionó sin DPI ni FIV.

8.16 ¿Y el ser humano? Clonación, FIV y DPI

Se han clonado gatos, ratones, bovinos, ovejas y cabras. Frente a las declaraciones sensacionalistas de sectas esotéricas, la clonación humana mediante transferencia de una célula somática madura en un huevo "vacío" no es técnicamente factible. ¡Sólo hay que pensar en el elevado índice de malformaciones! Para los científicos sería catastrófico que vinieran al mundo bebés con malformaciones. En Alemania esto está prohibido por la Ley de Protección de Embriones.

El bioinformático, médico y bioeticista Jens Reich dice al respecto, en su libro *Es wird ein Mensch gemacht* (Se fabrica un ser humano): «No quiero discutir la moralidad de la clonación de animales, aunque también ahí veo problemas. Pero en los seres humanos lo encuentro obsceno por dos motivos principales: el proceso técnico de la fabricación de seres humanos y la intención que se esconde detrás de crear un ser humano a imagen y semejanza propias».

Actualmente, en Alemania, el **diagnóstico de preimplante** (DPI) se discute tan acaloradamente como la comida genética (*Gen-Food*) (Cap. 7) y la investigación con células madre (Cap. 9).

Si hay que investigar el genoma del embrión, como mínimo hay que extraer una célula del conjunto celular. Naturalmente, se producen daños en esta célula. En general se espera hasta el tercer día después de la fecundación, hasta la fase de ocho

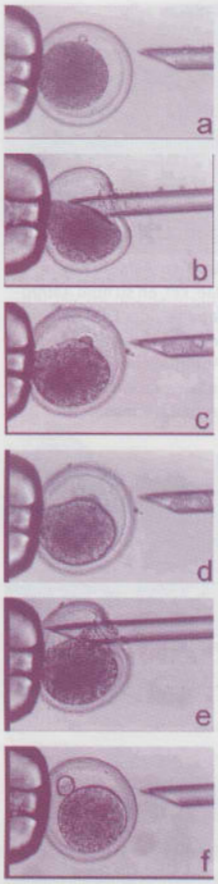


Fig. 8.53 Transferencia de núcleo en el bovino.



Fig. 8.54 Jens Reich, médico, bioinformático y bioeticista, miembro de la Comisión Ética del Gobierno Federal.

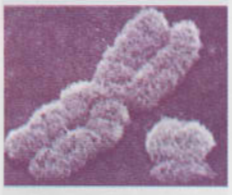


Fig. 8.55 La "pequeña diferencia": a la izquierda el cromosoma X femenino, a la derecha el cromosoma Y masculino, mucho más pequeño (con 10 000 aumentos).

células, y entonces se extrae una célula (y una segunda para asegurar el diagnóstico). Esta célula todavía contiene toda la información (es decir, es totipotente) y el embrión no sufre daños, pues todavía no es compacto.

¿Qué se puede determinar? Es fácil determinar el **sexo** (XX femenino, XY masculino) y las desviaciones del número de cromosomas (normalmente 46) (Fig. 8.52). Las secciones individuales de cromosomas se pueden representar microscópicamente, de forma que es posible averiguar si hay segmentos defectuosos. Incluso las mutaciones genéticas que provocan enfermedades ya se pueden identificar hoy en día. Hasta sería posible leer todo el código DNA, aunque los costes seguirán siendo astronómicos. En el futuro, con el progreso tecnológico, esto probablemente cambiará.

Los **escépticos del DPI** temen, y no les falta razón, que no sólo se maten embriones gravemente dañados, es decir, que no se haga solamente una selección negativa, sino que también se realice una **selección positiva.** Podría hacerse una selección según el sexo y las características más deseables.

8.17 El embrión cristalino y el proyecto del genoma humano

Jens Reich da motivos para pensar en el libro *Liebling, Du hast die Katze geklont* ("Cariño, has clonado al gato"):

«El 0,1% del genoma propio, que no es idéntico al de ningún otro ser humano, representa nuestro genoma privado y único. Una gran parte de los deseos que no pueden cumplirse es, sin embargo, leer a partir de este 0,1% cuál es mi altura y mi inteligencia, qué color de ojos tengo, cuáles son mis platos favoritos y si tengo talento para el deporte o para la música.

Por una parte, muchas de las características humanas existen desde el nacimiento, pero se desarrollan de forma diferente en función de las circunstancias de la vida. De este modo, la altura y la salud se ven influidas por la alimentación, y la inteligencia se puede fomentar de forma decisiva en los tres primeros años de vida. Por el contrario, el talento para tocar el piano puede mantenerse oculto si la persona nunca tiene la oportunidad de levantar la tapa de un piano o no está dispuesta a practicar en el piano continuamente.

La diabetes también se desarrolla, en la mayoría de los casos, en función de las condiciones de alimentación y de vida del mundo consumista moderno.

Por otra parte, todas estas características no las produce un gen, sino todo lo contrario; normalmente participan varios genes, a veces incluso miles. Sin embargo, en general sólo en los experimentos con animales se puede averiguar qué genes confieren determinadas características. Y dado que los ratones no tocan el piano y tienen otros cánones de belleza que nosotros los humanos, es muy difícil descubrir las combinaciones genéticas del talento para la música o de la belleza.

De momento se conoce poco sobre la función de los genes individuales, y a partir del genoma privado no se puede averiguar casi nada de uno mismo. ¿Quiere decir eso que toda la agitación sobre "el hombre de cristal" es infundada?

En lo que respecta a los datos que, por ejemplo, se recogen con el debido consentimiento para el diagnóstico médico o para fines de investigación, habría que prohibir cualquier otra aplicación diferente.

Tiene que quedar claro que ni un socio contractual (empresario, empresa de seguros) puede exigir esta información ni yo tampoco la puedo utilizar en mi propio beneficio en ningún sitio. Estos datos deben ser inexistentes para cualquier otra finalidad.

No es posible leer perfiles de personalidad a partir de perfiles de DNA. Cada persona posee un billón de neuronas y cada una vuelve a realizar mil uniones con otras neuronas. Es imposible codificar este entramado individual totalmente específico en los 3000 millones de letras del DNA.

Ciertamente, los datos genéticos por sí solos no son peligrosos. Pero se pueden combinar. Con datos de salud. Con las páginas de Internet que se visitan y que alguien registra. Con mis hábitos de compras. Con la lista de mis contactos telefónicos. Con los desplazamientos que quedan documentados en las liquidaciones de la tarjeta de crédito».

Los capítulos 9 y 10 presentan las posibilidades técnicas y las consecuencias éticas de la tecnología del milenio.

Bibliografía utilizada y aplicada

- Muy entretenido y lleno de humor y sabiduría:
  Podschun T E (1999) Sie nannten sie Dolly. Von Klonen, Genen und unserer Verantwortung. Wiley-VCH, Weinheim
- La historia completa por el padre de Dolly:
  Wilmut I, Campbell K, Tudge C (2000) Dolly. Der Aufbruch ins biotechnische Zeitalter. Carl Hanser Verlag, München
- Un compendio de clonología:
  Lim H A (2004) Sex is so good, why clone. Human cloning, to do or not to do? Enlighten Noah Publishing, Santa Clara
- Una buena introducción, aunque ya tiene más de diez años:
  Schenkel J (1995) Transgene Tiere. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Clones de gatos y biotecnología "*light*",
  con bonitas caricaturas de Manfred Bofinger:
  Renneberg R und Reich J (2004) Liebling, Du hast die Katze geklont! Biotechnologie im Alltag. Wiley-VCH, Weinheim
- Un pozo de ciencia en léxico biotecnológico:
  Bains W (2004) Biotechnology from A to Z. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford

Enlaces de web

- La Universidad de Arizona ofrece una formación sólida en biología molecular y bioquímica (en inglés). Se plantean preguntas y se ilustra según la respuesta:
  www.biology.arizona.edu/molecular_bio/molecular_bio.html
- La página web interactiva sobre el DNA del laboratorio Cold Spring Harbor:
  www.dnai.org/index.htm
- Página web del profesor Eckhard Wolf sobre la transferencia nuclear:
  http://aet-d.de/de/klonen.htm
- Comentarios del Consejo Nacional de Ética sobre la clonación:
  www.ethikrat.org/stellungnahmen/stellungnahmen.html
- Red de información de Deutsches Agrar sobre aspectos de la agricultura:
  www.dainet.de/
- Una página web muy buena para la biotecnología:
  Bayern Innovativ Network Life Science
  www.lifescience-bavaria.de/portal/loader.php
- El famoso Instituto Roslin:
  www.roslin.ac.uk
- El Umweltinstitut München e.V. sobre peligros:
  www.umweltinstitut.org
- Últimas noticias sobre animales y plantas transgénicos en alemán:
  www.transgen.de y *www.biosicherheit.de*

Ocho preguntas de autoevaluación

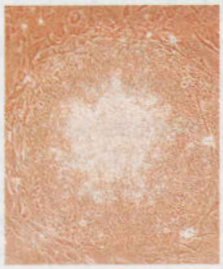
1. ¿A cuántos "sementales naturales" puede sustituir teóricamente un toro manipulado?
2. ¿Qué DNA puede tener influencia en el animal clonado, aparte del DNA cromosómico del donante?
3. ¿Cómo consiguieron los profesores Wolf y Pfeifer, en Munich, que un cochinillo se iluminara en verde?
4. ¿Es el color del pelo de los gatos clonados idéntico al del animal donante? Justificar la respuesta.
5. ¿Cómo se pueden utilizar genes de medusa en experimentos transgénicos?
6. ¿Qué posibilidades especiales ofrecen los bovinos, las cabras y los pollos transgénicos para crear productos farmacéuticos? ¿Cuál sería la ventaja?
7. ¿Cómo se puede indicar en las ranas qué células son omnipotentes?
8. ¿Cómo se pueden salvar con la transferencia embrionaria especies de animales amenazadas?

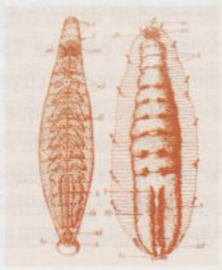
Infarto de miocardio, cáncer y células madre

La biotecnología roja como medio para salvar vidas






9.1 El infarto de miocardio y los anticoagulantes 228

9.2 La fibrinólisis después del infarto de miocardio: disolución enzimática de los coágulos 228

9.3 La embolia: una enzima de vampiro sirve de ayuda 229

9.4 Factor genético VIII –Una ayuda segura para la hemofilia 232

9.5 EPO para enfermos de riñón y deportistas 234

9.6 El interferón contra los virus y el cáncer 234

9.7 La interleuquina 238

9.8 Cáncer: crecimiento celular anormal incontrolado 238

9.9 Nuevas terapias contra el cáncer 239

9.10 El paclitaxel contra el cáncer 242

9.11 La hormona del crecimiento humana 243

9.12 La hormona del crecimiento epidérmico –Desaparecen las arrugas y se curan los pies diabéticos 243

9.13 Las células madre: ¿la fuente de juventud decisiva? 244

9.14 Terapia génica 248

9.15 ¿Diamantes en la basura? El RNAi, el RNA que interfiere 249

Capítulo 9

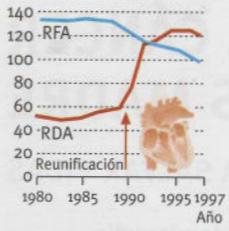


Fig. 9.1 Muertes por infarto de miocardio en ambas partes de Alemania antes y después de la reunificación (por cada 100 000 habitantes).





Fig. 9.2 ¡Infarto de miocardio! La ayuda rápida es decisiva. Helicóptero y ambulancia en una acción coordinada de salvamento. Cuando se ha detectado claramente un infarto de miocardio existen dos posibilidades: la lisis enzimática (ver texto principal) y, cada vez más, la angioplastia transluminal percutánea coronaria (ATPC), un proceso para ensanchar las arterias coronarias con un catéter balón.

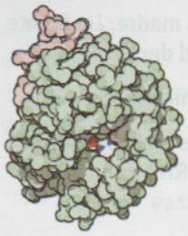


Fig. 9.3 La trombina (representada arriba) es una serina proteasa como la enzima de la digestión tripsina (ver Cap. 3), pero funciona de forma mucho más específica. Sólo rompe el fibrinógeno, no las otras proteínas de la sangre.

9.1 El infarto de miocardio y los anticoagulantes

El infarto de miocardio (Fig. 9.1) y la embolia se encuentran entre las causas más habituales de muerte en los países desarrollados (detallado en Cap. 10). La enzima **trombina** es crítica para la coagulación de la sangre (Fig. 9.3). Ésta se inicia con moléculas que indican que algo "funciona mal". Cuando hay lesiones de vasos que producen daños en el endotelio (el revestimiento fino de una capa de células lisas que se halla en el interior de los vasos sanguíneos), las células del endotelio liberan el **factor tisular** que se encuentra debajo. Además, se inicia una cascada de activaciones enzimáticas, empezando con unas pocas moléculas del factor tisular y reforzándose en forma de pirámide (Fig. 9.4).

En primer lugar, el factor tisular activa unas pocas moléculas de factor VII inactivo a factor VIIa activo; éstas activan, formando complejos con el factor tisular, una gran cantidad de factor X a Xa de forma proteolítica. El factor tisular en sí no es una proteasa sino una glicoproteína transmembrana; forma un complejo con el factor VIIa circulante, el cual, por su parte, finalmente activa el factor X de forma enzimática.

A su vez, el factor Xa activa, por otra parte, el paso del precursor de la trombina, la protrombina (factor II), a trombina (factor IIa). La proteasa trombina separa entonces una parte del **fibrinógeno**: se genera la fibrina y se forma la **red de fibrina**. Las células sanguíneas se quedan encerradas en el proceso. De este modo se forma el coágulo rojo oscuro sobre una herida.

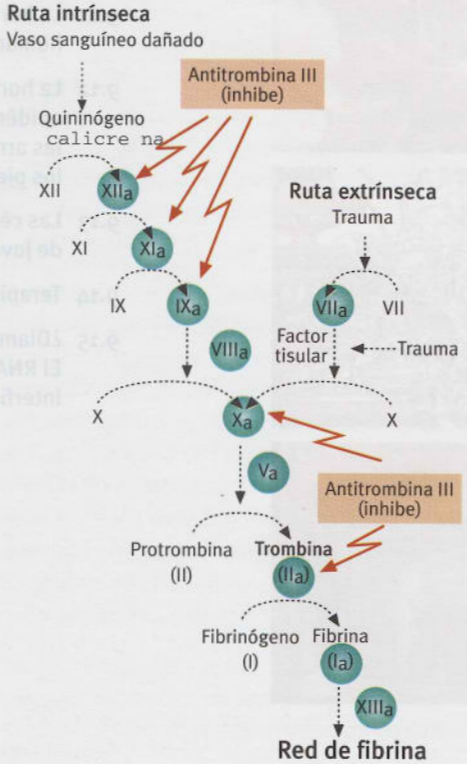


Fig. 9.4 Cascada de la coagulación de la sangre.

Los **anticoagulantes** evitan la coagulación de la sangre y la formación de coágulos sanguíneos (trombos). Son conocidos por sus efectos anticoagulantes la **heparina** (Fig. 9.7) y los derivados de la **cumarina**. La cumarina procede de la aspérula olorosa (*Asperula odorata*), que le confiere su olor característico. Se utiliza en forma de warfarina también como raticida, pues hace que las ratas se desangren internamente. La cumarina funciona como competidor (antagonista) de la vitamina K.

Una sustancia antigua y sin rival que inhibe la coagulación de la sangre es el **ácido acetilsalicílico** (AAS). Es un derivado del ácido salicílico que se aisló originariamente a partir de la corteza de sauce (en latín *salix*, sauce) (Fig. 9.18). El AAS "diluye" la sangre y está recomendado para los pacientes con riesgo de sufrir infartos de miocardio. Cuando empieza a producirse un infarto de miocardio, se aconseja llamar de inmediato al médico de urgencias. Éste puede administrar una tableta de aspirina que se mastica y se traga rápidamente. Las nuevas pruebas inmunológicas ayudan a realizar diagnósticos rápidos y claros (Cap. 10).

También es interesante la **hirudina**, procedente de las sanguijuelas medicinales (*Hirundo medicinalis*, Fig. 9.5 y Fig. 9.6). Si bien la hirudina es el único anticoagulante, hasta el momento, producido por ingeniería genética (con el nombre comercial de *Lepirudina*), la sanguijuela sigue siendo uno de los pocos animales utilizados por nosotros en medicina.

9.2 La fibrinólisis después del infarto de miocardio: disolución enzimática de los coágulos

Los **trombolíticos** (o **fibrinolíticos**) disuelven los coágulos que ya se han formado. Son proteasas (enzimas que fragmentan las proteínas, ver Cap. 2). En la fibrinólisis se destruyen los coágulos de fibrina después de que un grupo de proteínas haya cerrado los vasos. El componente principal de los coágulos en las trombosis y embolias es la proteína fibrina. Los activadores del plasminógeno convierten primero el plasminógeno en la enzima plasmina, que fragmenta la fibrina activa. La plasmina es una serina proteasa (Cap. 2). Un activador del plasminógeno endógeno es el **t-PA** (*tissue Plasminogen Activator*), en castellano: activador del plasminógeno tisular.

Si, por ejemplo, se obstruye un vaso coronario, se interrumpe el suministro de oxígeno a la zona

del músculo cardiaco –con consecuencias fatales: ¡el infarto de miocardio! Por ello, en la búsqueda de un tratamiento de las causas, los investigadores se concentran en disolver los coágulos en las primeras horas –es decir, antes de la muerte definitiva de los tejidos– de forma eficaz y con los mínimos riesgos.

Hasta ahora, lo que más se ha utilizado para la trombólisis ha sido la **estreptoquinasa**, un activador del plasminógeno exógeno y ajeno al cuerpo. A pesar de la terminación "asa" no se trata de una enzima sino de una proteína no enzimática formada por los estreptococos y que activa indirectamente el sistema de la coagulación.

En cuanto se inyecta estreptoquinasa, con el plasminógeno se forma un complejo activador que activa otras moléculas de plasminógeno. La estreptoquinasa se obtiene de los estreptococos y es muy eficaz, pero debido a su origen bacteriano puede causar reacciones alérgicas del sistema inmunitario en el paciente.

Por el contrario, la enzima **uroquinasa** se obtiene a partir de la orina humana, de cultivos de células renales humanas o más recientemente también por manipulación genética con bacterias *Coli*. Si se inyecta uroquinasa o estreptoquinasa en cantidades lo suficientemente grandes, el plasminógeno se activará a plasmina activa y, de este modo, eliminará los coágulos de sangre.

Sin embargo, ambas proteínas funcionan en todo el torrente sanguíneo, es decir, el efecto no se limita únicamente al "lugar dañado". De este modo se ve muy influenciado el sistema de coagulación en su conjunto. En comparación con los fibrinolíticos modernos, existe cierta tendencia a un riesgo más elevado de hemorragias internas (por ejemplo cuando el paciente padece úlcera gástrica).

Con las sustancias modernas sólo se activa el plasminógeno unido a la fibrina. El efecto se limita principalmente al lugar dañado. El **t-PA** es el activador de plasminógeno natural típico de los tejidos. El t-PA sólo tiene efecto donde se necesita: en el trombo. Por tanto, no reduce la capacidad de coagulación de la sangre en todo el cuerpo. No obstante, en caso de infarto de miocardio, normalmente se exige demasiado al t-PA propio, y éste tiene que recibir el apoyo adicional de moléculas de t-PA recombinante (t-PAr). El t-PAr es el patrón dorado en la terapia fibrinolítica del **infarto de miocardio**. Si un enfermo se puede tratar a tiempo, tiene una posibilidad real no sólo de salvar su vida sino también de recuperar la funcionalidad completa de su tejido muscular cardiaco amenazado.

Las investigaciones han demostrado que durante la primera hora se pueden salvar adicionalmente de 60 a 80 vidas por cada mil pacientes tratados. Un tratamiento que se inicia al cabo de tres o cuatro horas después del infarto puede eliminar el dolor (al volver a abrir los vasos), pero muy probablemente será demasiado tarde para conservar el tejido del músculo cardiaco. Los fibrinolíticos pueden inyectarse ya en la ambulancia.

El **t-PA humano** se clonó en 1982, y en Alemania está autorizado desde 1987. Puesto que la molécula contiene azúcar, además de proteínas, no se puede sintetizar "fácilmente" con la ayuda de bacterias; se produce en cultivo de células de mamífero (células ováricas del hámster chino, llamadas CHO por *Chinese Hamster Ovary*) de forma mucho más costosa, y también a partir de la leche de ovejas y cabras transgénicas (Cap. 8).

Con el t-PAr, la táctica de los biotecnólogos también consiste básicamente en combatir las enfermedades humanas con sustancias fabricadas mediante biotecnología por el hombre. Modificando la molécula de forma selectiva se ha logrado aumentar la efectividad y la duración del efecto del t-PA. Así aparecieron el t-PAr o reteplasa (*Rapilysin*® de la compañía Hoffman-La Roche), que se produce en células de *Coli*, y el TNK-t-PA o tenecteplasa (de Boehringer Ingelheim), que se fabrica en las células CHO. El TNK-t-PA es un ejemplo extraordinario de diseño de una proteína.

9.3 La embolia: una enzima de vampiro sirve de ayuda

En los países industrializados, la embolia es la tercera causa de muerte más frecuente después de las enfermedades coronarias y el cáncer, y al mismo tiempo una de las causas más frecuentes de minusvalías graves de larga duración. En los países industrializados, de cada 100 000 personas, entre 300 y 500 sufren una embolia. En Alemania hay 200 000 víctimas, en Estados Unidos 700 000.

Un 20% de las víctimas de una embolia muere en las cuatro primeras semanas. Sólo aproximadamente un tercio de los supervivientes puede volver a realizar una actividad laboral normal. Otro tercio dependerá de la ayuda de terceras personas durante el resto de su vida. La carga económica para la salud pública a causa de las estancias hospitalarias debidas a las embolias y a los programas de asistencia a largo plazo a los pacientes es enorme; sólo en Estados Unidos ascendió en 2004 a aproximadamente 54 000 millones de dólares. Al mismo tiempo, pocos pacientes que han sufrido embolias reciben un tratamiento directo y etiológico.

Se produce una embolia cuando uno de los vasos sanguíneos del cerebro se obstruye a causa de un



Fig. 9.5 La hirudina (aquí en azul) de las sanguijuelas se une perfectamente con la trombina y bloquea el centro activo (a la derecha representada sin hirudina).

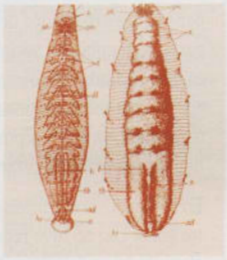


Fig. 9.6 Antiguamente, a menudo se utilizaban sanguijuelas (*Hirundo medicinalis*) como ventosas vivas para disminuir la presión sanguínea. Las sanguijuelas cortan la piel con sus cientos de dientecitos afilados e inyectan hirudina para que la sangre de los mamíferos no se coagule y se pueda succionar mejor. La sanguijuela aumenta su tamaño con la ingesta de alimento hasta diez veces. No obstante, después puede ayunar hasta 18 meses.



Fig. 9.7 Una inyección de heparina antes de un viaje largo en avión ayuda a evitar la trombosis.



Fig. 9.8 Los vampiros poseen t-PA, que sirvió de ejemplo para el t-PA de la ingeniería genética.

Cuadro 9.1 Opinión de los expertos: Perspectivas de la biotecnología roja en Alemania

La biotecnología roja, es decir, para el desarrollo de medicamentos y diagnósticos, abre innumerables posibilidades en el campo farmacéutico. Por una parte, el de los medicamentos es un mercado atractivo en crecimiento, cuya importancia también aumentará en vista del desarrollo demográfico en los países industrializados occidentales; por otra parte, la aceptación social de los biofármacos es muy elevada. No obstante, no se pueden aprovechar todas las posibilidades de la biotecnología, ya que los puntos de vista éticos tienen una gran importancia.

En el pasado, la discusión motivada por asuntos éticos casi no tuvo repercusiones sobre el crecimiento del sector. En Alemania, los volúmenes de ventas de la biotecnología roja aumentaron desde 1998 a 2003 aproximadamente una quinta parte cada año, hasta alcanzar los 915 millones de euros. Aún mayor fue el aumento total en Europa, mientras que en Estados Unidos se registró un aumento de las ventas claramente inferior. Sin embargo, hay que tener en cuenta que, en este caso, el volumen de ventas (de unos 31 000 millones de euros) ya es de por sí considerablemente superior que el de Europa (más o menos 11 000 millones de euros). A pesar de este gran crecimiento de las ventas, en la actualidad la proporción de biotecnología roja en el mercado farmacéutico en Alemania sólo es de aproximadamente un 4%.

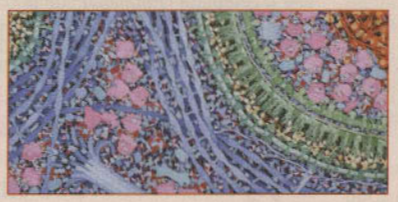
La terapia génica y la investigación con células madre despiertan las esperanzas

La descodificación del genoma humano en el año 2000 representó un hito a la hora de poder obtener un mejor diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. Gracias a ello, en un futuro se lograrán descubrimientos en el desarrollo de nuevos medicamentos y elevados índices de crecimiento de los volúmenes de ventas de las compañías de biotecnología. Sin embargo, con la euforia no se ha tenido en cuenta que el desarrollo de nuevos medicamentos tarda por término medio doce años, que sólo unos pocos superan las pruebas que duran años y finalmente obtienen la autorización para lanzarse al mercado.

Un campo de actuación importante de la biotecnología roja es la lucha contra el cáncer –uno de los mercados más lucrativos de los nuevos medicamentos. En los países industrializados esta enfermedad es una de las causas más frecuentes de muerte. Puesto que cuanto más aumenta la edad mayores son las posibilidades de enfermar de cáncer, con el creciente envejecimiento de la sociedad también crece notablemente el número de pacientes.
Los preparados biotecnológicos esperados pueden detener o ralentizar la proliferación de las células enfermas sin causar efectos secundarios graves como la quimioterapia. En el tratamiento del cáncer es de esperar que se produzca un salto cualitativo, que parece que conseguirá tratar enfermedades tumorales de forma selectiva. Por lo demás, los investigadores han abandonado la esperanza de poder combatir todos los tipos de cáncer con un único medio.



Un macrófago (célula devoradora, izquierda) absorbiendo una bacteria (derecha).



El citoplasma se representa en azul, los ribosomas en color púrpura y el DNA en rojo y naranja.



Las membranas se representan en verde. Éstas, del *Center for Integrative Medicine* del *Scripp Institute* en La Jolla, son algunas de las ilustraciones de David Goodsell del interior de las células.

Con la ayuda de las células madre parece que en el futuro se podrán curar enfermedades causadas por defectos en los tejidos. Entre éstas se encuentran las lesiones de la médula ósea, la diabetes, las consecuencias de un infarto de miocardio y diversas enfermedades del sistema que forma la sangre.

El trámite del desarrollo se está realizando mejor últimamente

En el año 2003, las compañías biotecnológicas alemanas tenían unos 200 principios activos en vías de desarrollo, es decir, un 14% más que en el año 2002 y más del doble que en 1999. De estos 202 principios activos, 69 se encontraban en desarrollo clínico (en 1999 eran 26). No obstante, sólo cinco se encontraban en la última fase, en la cual se verifica la eficacia del medicamento en varios miles de pacientes, frente a 300 en Estados Unidos y 70 en Europa.

De la biotecnología roja se espera el descubrimiento de una medicina individualizada, es decir, el desarrollo de medicamentos hechos a medida destinados a determinados grupos de pacientes. La investigación del genoma humano ofrece la posibilidad de elaborar un perfil genético exacto del paciente. Ésta es una condición previa decisiva para una terapia selectiva individual. Gracias al genoma, los biochips determinarán si los medicamentos tienen un efecto óptimo en un paciente y con qué composición.

Aspectos legales

En Alemania, la Ley de Protección de los Embriones (EschG) prohíbe desde 1991 la investigación con embriones. Debido a ello se produjo un estancamiento de las actividades de investigación en este campo y se produjo una fuga de capital humano al extranjero. La introducción y la utilización de células madre embrionarias para fines de investigación se regula en la Ley de las Células Madre (StZG), la cual entró en vigor en 2002. Posteriormente se prohibió la importación y la utilización de células madre embrionarias. Sin embargo, existen excepciones en ciertas condiciones.

Los descubrimientos en el campo de la biotecnología roja requieren inversiones elevadas, largos periodos de desarrollo y procesos de autorización complejos. Las empresas farmacéuticas y de biotecnología sólo realizan estas inversiones y corren con los riesgos asociados si sus resultados de investigación están protegidos mediante patente y existe una seguridad legal para ellos. Por consiguiente, una protección eficaz por patente tiene un significado decisivo. Ya en 1998 se aprobó la directiva de la UE para la protección de los descubrimientos biotecnológicos (directiva de biopatentes), la cual no se traspuso al derecho alemán hasta finales de 2004. Según ésta, no se pueden conceder patentes para clonar seres humanos ni para utilizar embriones humanos con fines industriales o comerciales. Tampoco puede patentarse el cuerpo humano en su formación y desarrollo. Muchas pequeñas empresas biotecnológicas alemanas tienen la impresión de que se les exige demasiado

para poder solucionar todo el proceso desde la investigación, a través del desarrollo y hasta la comercialización de los medicamentos. Casi la mitad de las empresas consultadas por Ernst & Young sólo intenta, por consiguiente, obtener un desarrollo propio hasta la fase clínica II (primera prueba en el paciente).

Sobre todo las grandes compañías farmacéuticas necesitan en la actualidad la fuerza innovadora de la biotecnología roja. Serán decisivas las patentes a emitir para medicamentos con elevadas ventas en los siguientes dos a cuatro años, así como los huecos en las carteras de proyectos en desarrollo de estas empresas. Diversas empresas biotecnológicas ya se han posicionado en la actualidad como empresas de prestación de servicios para grandes compañías farmacéuticas establecidas. Las empresas biotecnológicas y las grandes firmas farmacéuticas pueden complementarse de forma excelente. Mientras que el punto fuerte de las empresas farmacéuticas es la fase clínica tardía, la producción, la autorización, el marketing y las ventas, las empresas biotecnológicas están especializadas, sobre todo, en el desarrollo de los principios activos y en la investigación por encargo.

De la biotecnología roja alemana esperamos que para el final de la década el volumen de ventas continúe creciendo rápidamente. Los 915 millones de euros actuales deberían haber aumentado en el año 2010 a 2000 millones de euros. Para ello será determinante que la cartera de proyectos en desarrollo de las empresas esté bien repleta. Sin embargo, el índice anual de expansión, de un 12%, está claramente por debajo del crecimiento de los últimos años. Los motivos de esto son principalmente, además de una base más elevada, las mayores exigencias de muchas empresas biotecnológicas para completar todo el proceso y la financiación insuficiente. A pesar de todo, un crecimiento de prácticamente una décima parte supera claramente el esperado en las empresas farmacéuticas tradicionales, para las que sólo pronosticamos un aumento anual de aproximadamente un 3% en el periodo de tiempo correspondiente.

Esperamos un desarrollo similar para la biotecnología roja europea, en la cual las cifras de ventas actuales, de casi 11 000 millones de euros, deberían aumentar a 21 000 millones. Frente a esto, el desarrollo en Estados Unidos parece que debe discurrir por caminos algo más tranquilos, ya que allí el volumen de ventas de 31 000 millones de euros ya es muy elevado en relación con Europa.

En general, el sector médico y el farmacéutico se benefician del envejecimiento de la población. A partir del año 2010, en Alemania, la generación del "baby-boom" (los años comprendidos entre 1946 y 1964, cuando se produjeron muchos nacimientos) alcanzará la edad de la jubilación. A ello hay que añadir el aumento medio de la esperanza de vida. La proporción de personas de la tercera edad en la población global aumentará en todos los países industrializados. Este grupo de población es especialmente dependiente de la asistencia médica. Según datos del Instituto Federal de Estadística, en el año 2050 habrá en Alemania aproximadamente ocho millones de ancianos más que en 2001. Al mismo tiempo, la población podría descender, de aproximadamente 82 millones, a 75 millones. Entonces vivirán en Alemania unos 28 millones de personas mayores de 60 años. El porcentaje de población de edad superior a 60 años sería entonces de aproximadamente un 37%, frente al 24% de 2001.

Resumen

La biotecnología roja sigue siendo un mercado en crecimiento muy dinámico. Esto se demuestra mediante las múltiples posibilidades de combatir o curar enfermedades incurables hasta el momento, así como mediante la cooperación estrecha con la industria farmacéutica nacional. De este modo, en la biotecnología se pueden aprovechar todas las etapas de la cadena de la creación de valor añadido, es decir, desde el desarrollo hasta la comercialización de los medicamentos.

No obstante, las empresas del sector no pueden agotar todas las posibilidades de investigación, ya que la legislación alemana es muy restrictiva; deben tomar en consideración –más que en otros ámbitos– los puntos de vista éticos. Los resultados de la investigación sobre el genoma y las células deberían traducirse en productos líderes en ventas a medio o largo plazo. Sin embargo, en la actualidad ya hay que considerar los puntos débiles.

Las empresas alemanas continuarán intentando recuperar el tiempo perdido respecto a las estadounidenses, aunque la distancia siga aumentando en los próximos años.



El Dr. Uwe Perlitz es economista *senior* de investigación del Deutsche Bank, en Frankfurt/Main.

¿Inmortalidad gracias a la biotecnología?

El bioeticista, médico y biólogo molecular Jens Reich escribe, en su libro *Es wird ein Mensch gemacht* (Se fabrica un ser humano), Rowohlt, Berlín:

«Por cierto, sería interesante discutir, aunque no tenga ya nada que ver con la genética, de qué forma se organizaría la humanidad si la esperanza de vida media fuera, por ejemplo, de 200 años. Si antiguamente en los baños de células madre en las fuentes de la eterna juventud se hubiese podido regenerar una y otra vez el material gastado, entonces pronto habrían coexistido casi diez generaciones. Sólo podrían nacer niños si existiese una autorización expresa a fin de evitar el abarrotamiento. Sólo morirían voluntariamente las personas cuya existencia infinita se les hiciera tediosa. Para todos los demás, el vaso de cicuta llegaría al alcanzar el límite de edad. Es imposible saber de qué forma mantendrían el calor humano las familias si coexistiesen bisabuelos, tatarabuelos, retatarabuelos y todos los demás parientes hasta el grado "x", cuando ya hoy en día la devoción afectuosa entre generaciones prácticamente se limita a dos generaciones (Caperucita Roja y su abuela). Asimismo, es imposible saber de dónde sacarían la creatividad las personas de 150 años cuando ya las de 90 sólo la tienen con mucho esfuerzo aunque estén sanas.

Se puede decir que el hombre podría vivir muchos años, pero es difícil comprender cómo renovaría la vitalidad cuando no se renueva como persona. La filosofía asiática puede pensar en el regreso eterno también sólo como renacimiento eterno, perdiendo el individuo los recuerdos de su vida anterior. Y los desarrollos más profundos de la filosofía occidental han conducido al conocimiento de que todo lo bonito, todo lo fabuloso, toda satisfacción, toda la suerte, sólo puede existir porque es efímero.»

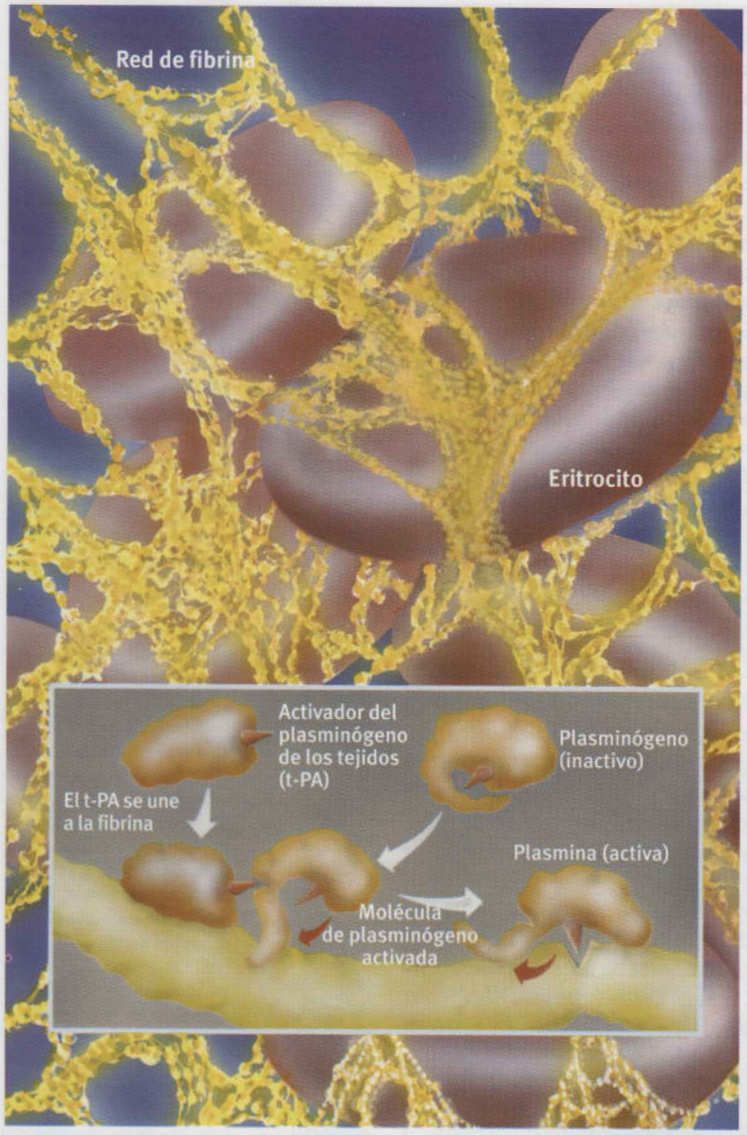


Fig. 9.9 Cómo disuelve los trombos el t-PA: mediante la fibrina, la proenzima se convierte en una serina proteasa activa que, por su parte, activa el plasminógeno en un coágulo sanguíneo. De este modo se garantiza básicamente una fibronólisis local y selectiva.



Fig. 9.10 La familia real rusa; el pequeño Alexei está a la izquierda de la foto.

coágulo (embolia isquémica) o se rompe (embolia hemorrágica). En ambos casos, la parte afectada del cerebro no recibe el suministro suficiente de oxígeno y sustancias nutritivas. Entonces mueren las células nerviosas en la región del cerebro afectada. El tipo de tratamiento necesario dependerá de si la embolia ha sido por obstrucción de un vaso (el 88% de todas las embolias) o por hemorragia cerebral (el 12% de los casos). La denominada **embolia isquémica** (obstrucción de los vasos) se trata eliminando el coágulo causante y restableciendo el suministro de sangre.

El único medicamento autorizado hasta el momento para tratar la causa de la embolia isquémica aguda es el **trombolítico t-PAr** (ver arriba), cuya acción se basa en la disolución del coágulo de sangre. Sin embargo, el t-PAr sólo puede utilizarse de forma limitada, ya que únicamente se puede administrar durante las tres primeras horas después de aparecer los síntomas de la embolia. Debido a que este intervalo de tiempo es tan limitado, sólo una pequeña parte de todas las embolias isquémicas se trata con t-PAr.

La **desmoteplasa**, un activador del plasminógeno altamente selectivo, es un nuevo principio activo de la empresa de Aquisgrán Paion AG. Esta proteína sintetizada genéticamente por copia se localizó en un principio en la saliva del murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*) (Fig. 9.8), cuya fuente de alimentación es la sangre de los mamíferos.

La desmoteplasa también actúa activando de forma selectiva el plasminógeno unido a la fibrina. Después de la activación, el plasminógeno se convierte en la enzima plasmina, la cual disuelve los coágulos desintegrando la matriz de fibrina. Se restablece el suministro de sangre a los tejidos afectados y se minimiza el daño isquémico que, de lo contrario, progresaría.

Una ventaja es que la desmoteplasa no presenta neurotoxicidad. Los datos clínicos positivos de un estudio de fase II concluida indican que la desmoteplasa puede ser efectiva en un intervalo de tiempo de hasta nueve horas después de que aparezcan los síntomas de la embolia.

9.4 Factor genético VIII –Una ayuda segura para la hemofilia

«A los reyes se les protege cuidadosamente de las realidades incómodas. La hemofilia del zarevich (Alexei de Rusia, tataranieto de la reina Victoria) era en realidad sólo un síntoma del abismo entre la realeza y la realidad» escribió el biólogo inglés J.S.B. Haldane.

La hemofilia A (Fig. 9.10) afecta exclusivamente a los varones, pero las madres pueden transmitirla a sus hijos. El gen para el factor de coagulación VIII debe, por tanto, hallarse en un cromosoma X.

El caso de la reina Victoria de Inglaterra (1819-1901), con sus múltiples descendientes de la realeza europea, está documentado históricamente de forma exacta (como el "labio de Habsburgo" transmitido genéticamente). El hecho de que algunos de sus descendientes masculinos alcanzaran la edad para engendrar hijos lo deben agradecer únicamente al hecho de haber protegido tanto sus vidas, como sólo podían permitirse ellos, "bajo una campana de cristal".

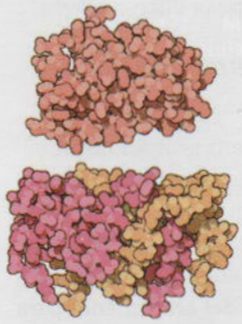
Sin embargo, en comparación con los infartos de miocardio, el grupo de los hemofílicos es pequeño (afecta a uno de cada 10 000 hombres), y se trata cada vez más por medios biotecnológicos. A los hemofílicos les falta una parte importante del sistema de coagulación

Cuadro 9.2 ¿Qué son los interferones?

Los interferones son proteínas endógenas que pueden suponer un mecanismo de defensa rápido y no específico contra los virus. Mientras el virus está creciendo en la célula, un subproducto de la multiplicación de los virus induce la producción de interferón en la célula. Éste se libera y se desplaza a otras células del cuerpo. Se une a **receptores de interferón** específicos en la superficie celular y emite una señal especial (Fig. 9.11). Esta señal hace que la célula fabrique diversas proteínas nuevas. Por sí solas, estas proteínas todavía no alteran el mecanismo celular. Son pasivas hasta que una célula es infectada por un virus. Entonces se activan las proteínas e inhiben el crecimiento del virus.

Hasta el momento se han encontrado diversos tipos de interferón; los tres más importantes son el α, el β y el γ.

El **interferón α** lo forman principalmente los glóbulos blancos (leucocitos) después de un ataque viral. Se mueve libremente en el suero sanguíneo por el cuerpo, de célula a célula. Hasta ahora se conocen como mínimo 16 subtipos de interferón α, que se diferencian sólo por pequeñas modificaciones en su estructura química –en su secuencia de aminoácidos.



Interferón α (arriba) e interferón γ (abajo).

El interferón α es el único medicamento que actúa contra un tipo raro de leucemia, la de células pilosas. También es eficaz contra el melanoma –un tipo de cáncer que proviene de las células de pigmentación de la piel, el llamado cáncer de piel negro–, contra el mieloma (cáncer de la médula ósea) y contra las hepatitis B y C.

El **interferón β** está constituido por una serie de tipos celulares, inclusive los fibroblastos (células del tejido conjuntivo) que se encargan de la formación del tejido conjuntivo. El interferón β se utiliza principalmente contra la esclerosis múltiple (EM, una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central).

El **interferón γ** lo forman los corpúsculos sanguíneos del bazo durante una reacción inmunitaria (respuesta del organismo a los cuerpos extraños). Se generan simultáneamente anticuerpos o células específicas para aniquilar a las células atacadas por virus o para rechazar tejidos extraños.

El interferón γ es conocido por sus características antivirales. Es un modulador más fuerte del sistema inmunitario que los otros dos tipos de interferón, y su uso ya está autorizado para el tratamiento de la granulomatosis. La granulomatosis es un defecto congénito del metabolismo oxidativo de los granulocitos, un subgrupo de los glóbulos blancos. Los granulocitos de las personas enfermas no forman radicales de oxígeno agresivos y, por tanto, no pueden matar patógenos. Por ello hay que tratar a los pacientes permanentemente con antibióticos. Además, el interferón γ parece ser eficaz contra la artritis (inflamación de las articulaciones) y el asma.

de su sangre: **el factor VIII**. El 80% de los hemofílicos tiene hemofilia A, es decir, una carencia del factor VIII; el resto tiene una carencia del factor IX (hemofilia B). En Alemania hay aproximadamente 8000 **hemofílicos**.

Las molestias son iguales en los dos tipos de hemofilia, y cuanto mayor es la carencia del factor de coagulación, más dramáticas son las consecuencias. En sus formas más graves, con lesiones mínimas ya se producen hemorragias externas irrestañables en el tejido o en las articulaciones, que amenazan la vida. En sus formas más leves habrá que vigilar las hemorragias, sobre todo en caso de intervenciones quirúrgicas. El tratamiento consiste en la administración intravenosa del factor de coagulación, dependiendo la dosis del riesgo de hemorragia, es decir, sobre todo para los niños y antes de las operaciones deberá ser elevada, según corresponda.

¡Menos de 500 gramos del factor VIII deberían cubrir las necesidades anuales mundiales, pero este medio kilo escaso costaba hasta ahora, sin biotecnología, 170 millones de dólares!

La proteína del factor VIII consta de 2332 restos de aminoácidos. Es una de las mayores proteínas, cuya estructura ya se ha podido clarificar. Cada persona tiene un miligramo de factor VIII en sus aproximadamente seis litros de sangre.

A un hemofílico se le debe inyectar un miligramo del factor dos veces por semana para que pueda llevar una vida normal. Por tanto, desde el punto de vista puramente de cálculo, ¡se necesitan semanalmente 24 donantes de sangre (donando medio litro cada uno) para un solo hemofílico! La obtención y la difusión de la sangre de los donantes no sólo es cara sino que también implica riesgos considerables. Anteriormente, el peligro principal era el de infección con el virus de la hepatitis B (causante de la ictericia); en la actualidad, el riesgo es la infección con el virus del sida y el de la hepatitis C (ver Cap.5).

Se estima que, trágicamente, el 60% de los hemofílicos se ha infectado con la sangre de los donantes (en parte, como en Francia, de forma criminal). En Estados Unidos, la mitad de la población hemofílica, más de 8000 personas, tiene el VIH.

Por el contrario, el factor VIII producido genéticamente está exento de virus y es seguro. Puesto que el factor VIII es una glicoproteína, se produce en líneas celulares CHO y se aplica para el tratamiento y la profilaxis de hemorragias en pacientes con hemofilia A.



Fig. 9.11 El interferón γ (en rojo) se une a receptores (en amarillo) de la superficie celular. La señal se transmite a la célula. La primera molécula del interferón fuera de la célula une a cuatro receptores juntos. En el interior se unen diferentes proteínas quinasas (en naranja), que se fosforilan y activan. Añaden a las proteínas STAT (en rosa) un grupo fosfato. Las proteínas forman entonces dímeros que se adhieren en el núcleo celular a genes de destino y de ese modo inician las síntesis.

Tipos de cáncer

En el ser humano se conocen más de 200 tipos de cáncer. Éstos son los más importantes:

- El cáncer de pulmón está a la cabeza en ambos sexos (a menudo producido por el tabaco, el medio ambiente y los asbestos).
- El cáncer de mama (carcinoma mamario) es el segundo cáncer más mortal en las mujeres (depende de la edad, y a veces es hereditario).
- El cáncer de próstata es el segundo cáncer más frecuente en los hombres (depende de la edad).
- El cáncer colorrectal (del intestino grueso) es el tercer cáncer más peligroso en ambos sexos (favorecido por la alimentación con mucha grasa y poca fibra, puede ser hereditario).
- El cáncer de piel provocado por los rayos UV, mutágenos químicos.
- El cáncer de ovarios (mujeres mayores de 40 años, estrógenos elevados, alimentación).
- Leucemia, crecimiento incontrolado de los glóbulos blancos.
- Cáncer de cuello del útero (carcinoma de cérvix) en mujeres mayores de 30 años (riesgo más elevado por el tabaco, por tener compañeros sexuales a edad temprana y por promiscuidad; se está discutiendo acerca de algunas enfermedades de transmisión sexual, como el herpes).
- El cáncer de testículo es el más común en los hombres jóvenes.



Fig. 9.12 Adenovirus, también utilizable como vehículo genético (ver texto).

Recientemente también se ha podido sintetizar el factor VIII en cerdos mediante *Gene-Pharming* (Cap. 8). Se ha unido el DNAc humano completo con el promotor de la β-lactoglobulina (en inglés *whey acid protein*) a partir de las glándulas mamarias de los cerdos y, de este modo, se excreta factor VIII con la leche.

9.5 EPO para enfermos de riñón y deportistas

Otros productos de ingeniería genética han seguido al factor VIII, por ejemplo la hormona **eritropoyetina (EPO)**, que se forma en los riñones y estimula la producción de eritrocitos propia del cuerpo (eritropoyesis) en la médula ósea. La glucoproteína EPO constituye un **factor del crecimiento para los glóbulos rojos.** En la médula ósea induce la formación de hemoglobina.

La EPO tiene una importancia vital para 40 000 pacientes en diálisis que hay en Alemania, los cuales sufren una anemia "artificial".

Antes se enviaba a los deportistas a realizar entrenamientos en las alturas: el "aire puro" requería la formación de glóbulos rojos y un suministro óptimo de oxígeno en las competiciones siguientes. Ahora esto se puede conseguir de una forma más económica. La EPO (al igual que el factor VIII) se produce en las células CHO. Las cadenas de azúcares de la EPO son importantes, ya que la protegen de una degradación rápida en el hígado. Sin azúcar, la EPO es inactiva.

En el Tour de Francia de 1998, equipos enteros abandonaron la carrera cuando iban a ser examinados por la policía y por expertos en dopaje independientes, en vez de por los propios organismos de control deportivos como es costumbre. Presumiblemente, los deportistas se habían dopado con EPO.

Unos 100 000 alemanes utilizan otro factor de crecimiento que salva vidas: el **factor estimulador de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)** estimula tanto la formación de granulocitos eosinófilos y neutrófilos como la de fagocitos (macrófagos).

Ambos productos de ingeniería genética cuentan, respectivamente, con un mercado mundial de aproximadamente 2000 millones de dólares americanos anuales.

9.6 El interferón contra los virus y el cáncer

¿Por qué los animales y las personas atacados por un virus (por ejemplo el de la gripe) casi nunca se ven afectados al mismo tiempo por una segunda enfermedad viral (Fig. 9.12)?

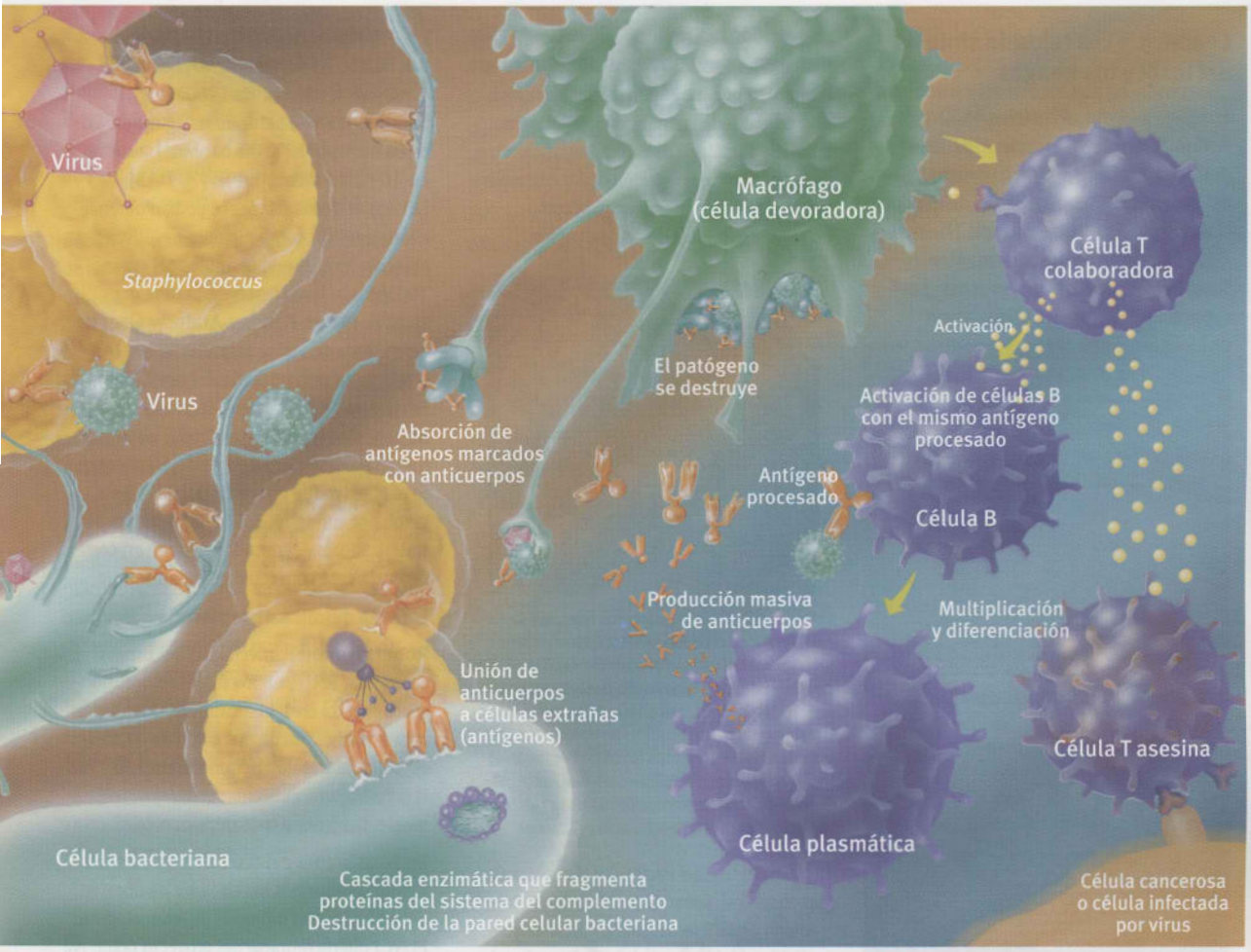
En el caso de las infecciones bacterianas, a menudo una especie bacteriana allana el camino a la siguiente debido a que las defensas del cuerpo están debilitadas. ¿Por qué debería ser diferente con las enfermedades virales?

El inglés **Alick Isaacs** y el suizo **Jean Lindenmann** se plantearon esta pregunta en 1956 cuando trabajaban en el *National Institute for Medical Research* de Londres. En 1957 encontraron un principio activo que lo explicaba. La proteína se libera por las células afectadas por el virus y hace a otras células resistentes frente a otras infecciones por este virus, pero también frente a otros tipos de virus. Isaacs y Lindenmann denominaron **interferón** a este principio activo porque, obviamente, evitaba la reproducción del virus o interfería considerablemente en ella (Cuadro 9.2).

El hecho de que el interferón prometía mucho como agente antiviral ya quedó claro desde el momento en que se descubrió, puesto que no se dirige contra un virus concreto sino que más bien protege a las células frente a una gran cantidad de virus. Sin embargo, el interferón aún puede hacer más cosas: influye sobre las diferentes actividades celulares, de forma que tiene otras posibilidades terapéuticas. Además, el interferón es una sustancia muy eficaz: una pequeña cantidad es suficiente para una protección de larga duración. Y por último, el interferón, en la dosis correcta, probablemente sería más fiable como producto celular natural que la mayoría de las nuevas sustancias químicas que se prueban como medicamentos. Sin embargo, el interferón se desprende de las células que lo producen en cantidades tan pequeñas que muchos investigadores incluso dudaban de su existencia.

La situación empezó a cambiar cuando **Kari Cantell**, de la Cruz Roja finlandesa, desarrolló en los años 1970 una técnica de producción mediante la cual se podía obtener interferón a partir de sangre humana. Cantell recogió la suficiente sangre de donantes de los bancos de sangre finlandeses como para poder obtener el interferón necesario para realizar experimentos clínicos. Pero este proceso fue complicado y costoso: se infectaron los leucocitos de los donantes de sangre con un virus para luego recogerlos y purificar el interferón liberado. ¡Con esta técnica se obtuvo en total medio gramo de interferón parcialmente purificado, a partir de más de 50 000 litros de plasma sanguíneo!

Aunque los médicos demostraron un gran interés por el interferón, las investigaciones sólo se pudieron realizar a pequeña escala debido a que la cantidad disponible eran pequeñísima. La sangre de



100 000 donantes sólo había producido un gramo de interferón, que en el mejor de los casos contenía un 1% del principio activo puro. ¡Alguien calculó que por ese gramo de interferón puro –que nunca se había obtenido en tanta cantidad– habría que pagar el soberbio precio de mil millones de dólares!

A pesar de las dificultades, empezaron a proliferar las opiniones de que el interferón podía ser efectivo para combatir enfermedades virales y tal vez algunos tipos de cáncer. En enero de 1980, noticias procedentes de Suiza dispararon el "boom del interferón", que supuso un avance decisivo para el ulterior desarrollo de la biotecnología. En el laboratorio del biólogo molecular de Zurich **Charles Weissmann**, justo en Nochebuena, la cepa de laboratorio HiF-2h de bacterias *Coli* empezó a producir una proteína que, por sus propiedades biológicas, era completamente igual al interferón procedente de los leucocitos humanos: la primera síntesis bacteriana del principio activo de los antivirales humanos, el interferón, había tenido éxito. Para Weissmann y su equipo de trabajo, al contrario que en otros experimentos relativos a la síntesis bacteriana de insulina, el interferón de los leucocitos humanos era una sustancia cuya estructura exacta aún no se conocía detalladamente. Por tanto, la noticia de las bacterias que producían interferón en Zurich llegó inesperadamente pronto, aunque como posibilidad se conocía desde hacía tiempo.

Una vez sintetizada con éxito esta proteína en *E. coli,* también se conocieron sus propiedades. En lugar de 50 000 litros de sangre bastaban sólo diez litros de medio de cultivo bacteriano para obtener medio gramo de interferón sin purificar. Sin embargo, también quedó claro que tras la palabra "interferón" se escondía una familia entera de sustancias (Cuadro 9.2).

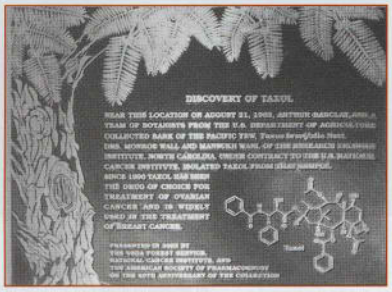
En la actualidad, todas las principales empresas farmacéuticas del mundo se ocupan de la investigación del interferón α. El tamaño del mercado mundial para el interferón α asciende a 500 millones de dólares americanos. Los tres fabricantes de interferón β, Serono, Schering y Biogen, tuvieron en 2001 un volumen de ventas de 2000 millones de dólares americanos sólo con esta sustancia. El inter-

Fig. 9.13 Cómo se defiende el sistema inmunitario de las infecciones (de forma muy simplificada, ver Cap. 5). Una infección moviliza a las células inmunitarias. En primer lugar, el antígeno debe ser absorbido por una célula presentadora de antígeno (macrófago), la cual lo procesa. Aparece en la superficie de la célula y se presenta a una célula T colaboradora. Ésta forma con el estímulo interleuquina 2 (aquí en amarillo) y activa así células B que antes también habían estado en contacto con el antígeno. Estas células B se multiplican profusamente y se diferencian: las células del plasma forman anticuerpos que marcan el antígeno para la destrucción. Además, también actúan el sistema del complemento (abajo a la izquierda) y las células T asesinas (abajo a la derecha), las cuales examinan constantemente la superficie de todas las células y matan aquellas que tienen señales ajenas al cuerpo.

Cuadro 9.3 Los tejos, la síntesis del taxol y los hongos

En agosto de 1962, el botánico de 32 años **Arthur S. Barclay** peló cortezas del **tejo del Pacífico** (*Taxus brevifolia*) por encargo del Departamento de Agricultura de Estados Unidos. Esto sucedió en el Parque Nacional Gifford Pinchot, cerca del famoso Monte Santa Helena. Envió las muestras para analizar su actividad biológica al laboratorio de Maryland. Entre otras cosas, se probó si se inhibía un cultivo de células cancerosas "9KB" en crecimiento. En septiembre de 1964 quedó claro que el extracto de tejo inhibe el crecimiento de las células cancerosas.

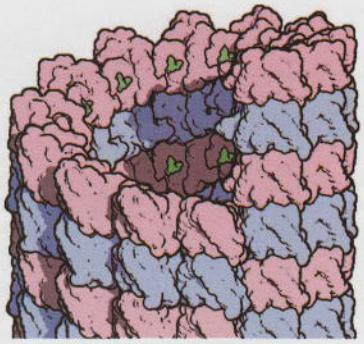
En la actualidad, una placa conmemorativa adorna el lugar por su 40 aniversario. En 1967, **Monroe Wall**, que había obtenido el extracto, comunicó al mundo que el paclitaxel poseía un espectro excepcionalmente amplio de actividades antitumorales. Se tardó tres años más hasta obtener la disparatada estructura del producto: ¡dos moléculas en una!



Placa en el lugar donde se descubrió el principio activo del tejo. Cita de la placa: «*Near this location on August 21, 1962, Arthur Barclay and a team of botanists from the U.S. Department of Agriculture collected bark of the Pacific yew, Taxus brevifolia Nutt. Drs. Monroe Wall and Mansukh Wani, of the Research Triangle Institute in North Carolina, under contract to the U.S. National Cancer Institute, isolated taxol from that sample. Since 1990 taxol has been the drug of choice for treatment of ovarian cancer and is widely used in the treatment of breast cancer. Presented in 2002 by the USDA Forest Service, National Cancer Institute and The American Society of Pharmacognosy on the 40th anniversary of the collection.*»

En 1971 empezó la carrera mundial para sintetizarlo. Al mismo tiempo, el *National Cancer Institute* (NCI) pedía cada vez cantidades mayores de corteza de tejo. En julio de 1977 se alcanzó el máximo: 3500 kilos de corteza de 1500 tejos talados.

Susan B. Horwitz (Universidad de Yeshiva, Nueva York) aclaró la forma de actuar del paclitaxel sobre las células cancerosas en la revista especializada *Nature*, en 1979: no se estimulaba una inhibición directa de la división celular, sino la estabilidad de los microtúbulos. Se alteraba la dinámica imprescindible de formación y degradación de los microtúbulos, que de lo contrario es rápida como un rayo, y se inhibía la división celular.



Los microtúbulos son polímeros huecos y de forma cilíndrica del citoesqueleto, desempeñan un papel decisivo en la determinación de la forma celular y tienen un significado importante en la separación de los cromosomas hijos durante la división celular. Un microtúbulo típico tiene una vida de sólo diez minutos antes de degradarse; los componentes se utilizan para nuevos microtúbulos. Por lo tanto, los microtúbulos son excelentes dianas para la quimioterapia del cáncer.

El taxol del tejo del Pacífico, y el paclitaxel y el docetaxel, dañan la proliferación celular y actúan preferiblemente sobre células que se dividen rápido, como las células tumorales. Estabilizan los microtúbulos y bloquean su necesaria interconversión. Por el contrario, los alcaloides de la *Vinca* como la vinblastina y la vincristina se unen a los extremos de los microtúbulos e inhiben la incorporación de los dímeros. En la figura, el paclitaxel se indica en verde. Se une a la tubulina y bloquea la dinámica normal de degradación y formación: la célula activa su suicidio programado –la apoptosis– y muere.

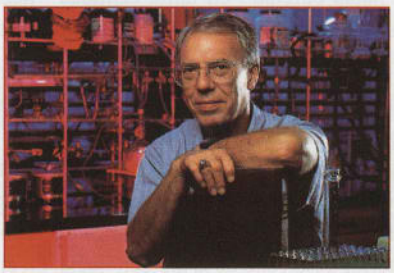
El 6 de abril de 1984, la *Food and Drug Administration* (FDA) autorizó la realización de estudios de fase I con taxol. ¡Habían pasado 22 años! Los resultados de los experimentos de fase II para la forma más agresiva de cáncer de ovarios se publicaron en 1984: los tumores se redujeron en tres de cada diez pacientes. Sin embargo, se habrían tenido que talar 360 000 árboles para poder prestar asistencia a todas las pacientes de cáncer de ovarios en Estados Unidos durante un año. ¡El cultivo de árboles quedaba descartado, puesto que los tejos necesitan cien años para poder producir buenos rendimientos de taxol!

Los ecologistas de la Costa del Pacífico llevaban tiempo en pie de guerra. ¡Había que conseguir la síntesis! En 1980, un grupo francés obtuvo, a partir de las agujas de los **tejos europeos** (*Taxus baccata*), la sustancia 10-desacetilbacatina III (10-DAB). Las agujas de los árboles se podían obtener a toneladas sin consecuencias negativas para el medio ambiente. Los anillos del taxano 10-DAB son la sustancia de partida para el taxol. **Pierre Potier** y **Andrew Greene** necesitaron seis años para unir la 10-DAB con la parte más pequeña del taxol, una estructura de 34 átomos con el aspecto de un copo de nieve. Los resultados obtenidos fueron escasos, pero a partir de ese momento el objetivo fue convertir la 10-DAB en taxol, por supuesto. Los mejores químicos sintetizadores del mundo entraron en competencia para conseguir una semisíntesis.

Llega la química de la síntesis

Robert Holton (Universidad del Estado de Florida, FSU) publicó su primer trabajo sobre el taxol en 1982. Con una subvención para investigación de un millón de dólares, el "adicto al trabajo" Holton sintetizó en 1988 la taxusina, una molécula similar que, naturalmente, también se encuentra en el tejo.

En 1988 la crisis del taxol alcanzó su punto álgido: las enormes necesidades de taxol se enfrentaban a las protestas de los ecologistas. El NCI quería retirarse del proyecto taxol: ¡ya había devorado 25 millones de dólares! Otros candidatos con esperanzas se descartaron a causa de esta sustancia. Holton recibió una llamada histórica del NCI: «*Invent finally a damn semisynthesis!*».



Robert Holton.

A finales de 1989 Holton desarrolló un proceso doblemente productivo que el de los franceses, lo patentó y empezó a escribir a grandes empresas farmacéuticas. El Congreso ya había aprobado en 1986 la *Federal Technology Act*: la utilización comercial de los resultados de investigación estatales por empresas privadas. Rhone-Poulenc,

poseedora de la patente francesa, compitió con Bristol-Myers (antes de la fusión con Squibb) y otros dos gigantes por el taxol. Bristol-Myers consiguió el negocio. El 1 de abril de 1990, la Universidad del Estado de Florida firmó el contrato de su vida: ¡dinero a espuertas para investigar!

Bristol-Myers también asumió los costes de patente para todos los posibles derivados del taxol. Algunos resultaron ser más eficaces que la propia sustancia madre. En 1992, la empresa patentó una nueva semisíntesis, el proceso del alcóxido metálico. La producción se inició en Irlanda. "De la corteza al negocio" se tardó 31 años y costó 32 millones de dólares.

A finales de 1993, un gramo de taxol costaba 5846 dólares. Finalizó el contrato de suministro de corteza de tejo. Para los ecologistas significó un triunfo: según su punto de vista, hay que proteger los recursos naturales independientemente de que en un momento dado prometan ventajas para alguien. Sin embargo, algunas subespecies del tejo que crecen en alturas de 1700 a 3400 metros se han extinguido en la zona del Himalaya, desde la India a Afganistán, por la búsqueda del taxol.

Ya en 1995 con el taxol se logró alargar la vida de innumerables mujeres enfermas de cáncer. En 1995 el taxol era el medicamento anticáncer con el mayor aumento de ventas del mundo. No obstante, el taxol también tenía efectos secundarios tóxicos, sobre todo por el aceite de ricino que se utilizaba para solubilizarlo. Bristol-Myers registró un crecimiento anual del 38% en las ventas, alcanzándose un máximo de 1600 millones en el año 2000. Sin embargo, el taxol se vendió a un precio 20 veces superior al del producto en bruto. Bristol justificó esto con unos costes de desarrollo de mil millones.

El 9 de diciembre de 1993, Bob Holton celebró su triunfo sobre casi otros cien grupos de síntesis de todo el mundo: la síntesis total del taxol –40 etapas de síntesis con un rendimiento del 2%. Además, Holton había encontrado cientos de productos análogos al taxol, que la Universidad Estatal de Florida protegió febrilmente con 35 patentes, ¡una mina de oro en potencia! Cuando expiró el contrato de cinco años con Bristol, Holton culpó a la empresa de no probar verdaderamente los análogos para no hacer la competencia a su propio producto estrella, el taxol. Se llegó al acuerdo de que la Universidad aprovechara su propio proceso del metalóxido para los productos análogos al taxol, pero que pagase un 50% de tasas en concepto de concesión de la licencia correspondiente.

Hasta el año 2000, la Universidad ya había ingresado aproximadamente 200 millones de dólares por la investigación del taxol, un caso único en su historia. Bob Holton también se enriqueció. Creó su propia empresa con su propio dinero, la Taxolog, Inc.

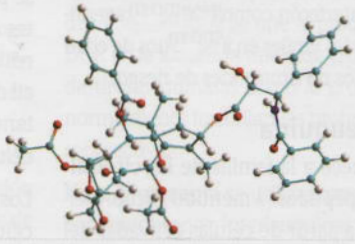
El análogo al taxol TL-139 parece ser un gran descubrimiento. Es mil veces mejor que lo que era el taxol en la misma etapa de desarrollo, según Taxolog, Inc.

El lema de Holton es: «*If you have the opportunity to do something that could save someone's life, you have to do it*!».

¡Y ahora la biotecnología!

¿Qué decía Pasteur? «La suerte favorece al espíritu preparado».

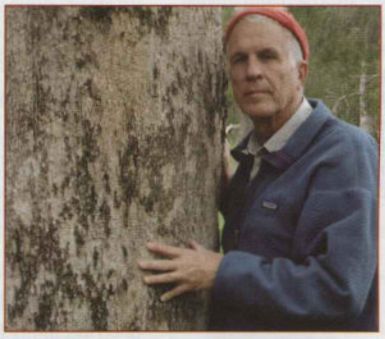
El microbiólogo **Gary Strobel** vive en Montana, en la zona de los tejos. Es un senderista entusiasta y a menudo va a las montañas y bosques de la región. La pasión de Strobel es la investigación de microorganismos que se acomodan en las plantas y se convierten en huéspedes de éstas, por lo que se describen como endofitos.



Estructura del paclitaxel.

En sus excursiones con sus colegas **Andrea** y **Don Stierle,** del Instituto de Tecnología de Montana, recogió muestras de diversas plantas para realizar pruebas. En 1993 descubrieron un hongo en la corteza del tejo del Pacífico, en la parte noroccidental de Montana. Strobel se obsesionó con la idea de que los microbios producen en las plantas las mismas sustancias que sus huéspedes. Por tanto, se aisló el hongo y se denominó *Taxomyces andreanae* en honor de su huésped el tejo (*Taxus*) y, según la costumbre de un caballero, en honor de la dama del equipo, Andrea. Después de cultivar el hongo y analizar su producto, Strobel no se lo podía creer –estudió la estructura descubierta una y otra vez. Pero era como él creía: ¡en efecto, el pequeño hongo había producido taxol por sí mismo!

En 1997, la Oficina de Patentes de Estados Unidos adjudicó unos amplios derechos de patente a los hongos que producen taxol. Otras muestras demostraron, mediante búsqueda selectiva, que *Taxomyces andreanae* tenía muchos amigos y que otras especies de la familia podían producir esta obra de arte. Una especie similar de tejo asiático suministró de entrada mil veces más taxol.



Gary Strobel.

Actualmente la fabricación se va optimizando y el taxol se produce de forma microbiana. Es muy importante que en el futuro se pueda producir por fin taxol a un precio razonable y en cantidad suficiente para tratar los tumores. El taxol es el medicamento antitumoral más prometedor de las últimas tres décadas. El mercado mundial ascendía a 1200 millones de dólares americanos en el año 2000. La mala noticia es que, aunque el taxol ha alargado extraordinariamente el tiempo de vida de los pacientes, no constituye un medio para curar el cáncer. Muchos pacientes desarrollan resistencia al taxol y muchos tumores no reaccionan a éste. Todavía se están buscando modificaciones.

Pero Strobel descubrió algo básicamente genial: ¡los parásitos microbianos suelen imitar la química del huésped! ¡Forman la misma molécula química que la planta huésped! Cuando se aíslan y se cultivan, se puede obtener lo mismo que con la penicilina. ¡Y hay miles de hongos!

Mientras recorría este camino de éxitos, Gary Strobel hizo otro descubrimiento en los aborígenes de Australia. Descubrió un microorganismo en una planta, la *Snakevine*, que utilizaban los nativos para curar las heridas. Strobel es un investigador de mente abierta: al nuevo antibiótico lo denominó munumbicina, en honor del nativo señor Munumba que le había enseñado la planta.

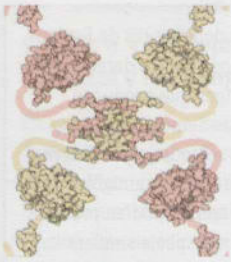


Fig. 9.14 La proteína supresora de tumores p53 es una molécula flexible que consta de cuatro subunidades idénticas. Probablemente las mutaciones de la p53 son la causa de la mitad de los casos de cáncer en los seres humanos. El desencadenante puede ser un único aminoácido incorrecto en p53.

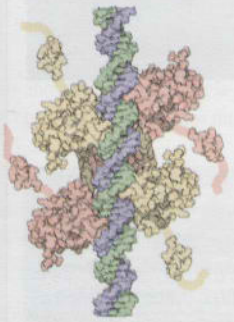




Fig. 9.15 La p53 se une con los cuatro "brazos" (arriba) y activa las proteínas vecinas que están implicadas en la lectura del DNA. La proteína supresora de tumores p53 (en rojo) en acción. Activa la transcripción. En amarillo se representa el DNA, en azul claro dos RNA polimerasas que han empezado a sintetizar RNAm.

ferón γ tiene un volumen de mercado de 200 millones de dólares.

Los interferones sirvieron de modelo para desarrollar y producir una serie de mediadores, como la interleuquina 2, la cual provoca la división de las células inmunitarias del cuerpo y ayuda en el tratamiento de la inmunodeficiencia por sida. Sin embargo, también son muy prometedoras las experiencias con los interferones en numerosas enfermedades virales y de otros tipos. Hasta ahora se ha demostrado su eficacia contra las hepatitis B y C, y también en diversas formas de herpes (enfermedad viral de la piel y las mucosas). El principal campo de aplicación del interferón lo constituyen hoy indicaciones en las que aún no está del todo claro a qué se debe la eficacia de esta sustancia –enfermedades que no tienen mucha relación con las infecciones virales, como diversos tipos de cáncer (vejiga, mieloma, melanoma y linfoma).

En estos momentos, el interferón es incluso el único medicamento disponible para tratar la relativamente poco frecuente **leucemia de células pilosas**, un tipo de cáncer de la sangre. En este caso, para tratar a un paciente bastan tres miligramos de interferón. Incluso los enfermos de esclerosis múltiple, artritis reumatoide y granulomatosis crónica pueden albergar nuevas esperanzas gracias a los interferones. Es interesante la aplicación del interferón como medida preventiva contra enfermedades virales en individuos de edad avanzada o debilitados en situaciones de riesgo.

9.7 La interleuquina

El interferón pertenece a la familia de las **citoquinas**. Se trata de polipéptidos (a menudo glicoproteínas) que se forman a partir de células activadas del sistema inmunitario, el sistema sanguíneo y el sistema nervioso. Entre las citoquinas se encuentran las interleuquinas, los interferones, los factores estimuladores de colonias, las quimioquinas, las citoquinas inflamatorias y los factores antiinflamatorios. Las citoquinas siempre son de origen celular, éste es el mínimo denominador común de la variedad. Siempre se vuelven a formar de nuevo cuando se necesitan, nunca se almacenan.

La citoquina más significativa que se forma a partir de los linfocitos (**linfoquina**) es, hasta ahora, la **interleuquina-2 (IL-2)**, descubierta en 1976 en el *National Institute of Health* (NIH) americano. La IL-2 fomenta la actividad y el crecimiento de las células T (un subgrupo de linfocitos) y otras células inmunitarias. Puesto que las células T colaboradoras del sistema inmunitario que son importantes para la vida son destruidas por el virus del sida, la interleuquina-2 es enormemente interesante para la terapia contra esta enfermedad. Actúa como molécula mensajera que utilizan los leucocitos, además de otros mediadores, para regular la respuesta inmunitaria. La IL-2 es la primera de más de 20 interleuquinas, la "hormona del sistema inmunitario", que se ha autorizado para tratar el cáncer de células renales como *Proleukin®* de la compañía Chiron. El asma, el sida, el cáncer de pulmón y las inflamaciones son aplicaciones clínicas futuras de las interleuquinas.

9.8 Cáncer: crecimiento celular anormal incontrolado

El cáncer es la denominación general de aquellas enfermedades producidas por una división celular anormal e incontrolada (proliferación) (texto en el margen de la página 234). Aquí sólo podemos hacer una introducción muy simplificada a este campo tan complejo.

Las nuevas células que no tienen una función útil en el cuerpo y forman un tumor se denominan "células neoplásicas". Los tipos de tumores **benignos** contienen células que se parecen a las normales. Puesto que están ubicadas en una cápsula de material fibroso extracelular, permanecen localizadas en un lugar y no forman metástasis. Los tumores **malignos** contienen, por el contrario, células anormales que se pueden desprender, se desplazan hasta otras partes del cuerpo, extienden el tumor y forman tumores secundarios (**metástasis**). La metástasis es difícil de controlar, y por ello hay que diagnosticar y tratar el cáncer en cuanto sea posible, antes de que las células tumorales se hayan extendido por el cuerpo.

Los **carcinomas** son tumores que crecen a partir de células epiteliales de las superficies internas y externas del cuerpo: la piel, la mucosa del estómago, los conductos de las glándulas mamarias y los pulmones. Los **sarcomas** se producen a partir de células en estructuras de soporte, como los huesos, los músculos y los cartílagos. Las neoplasias del sistema inmunitario y hematopoyético se desarrollan a partir de las células sanguíneas o sus predecesores; son las leucemias, los linfomas y los mielomas.

Pocas veces se produce un cáncer por transmisión hereditaria o por infecciones. Se transmiten de forma hereditaria, por ejemplo, la poliposis familiar adenomatosa y el cáncer de mama familiar. Mediante virus se favorece el cáncer del cuello de útero (virus del papiloma humano), determinadas formas de leucemia (retrovirus HTLV-I) y el cáncer de hígado (hepatitis). El cáncer es una enfermedad genética porque siempre se inicia con un cambio del DNA. Se "fabrica" a partir de células somáticas durante la vida de cada uno y no se transmite a la siguiente generación, aunque cierta predisposición familiar

puede actuar de forma favorecedora. No obstante, no basta con una única mutación del gen para que se produzca un cáncer en los seres humanos, ya que complejas redes reguladoras actúan contra él. El cáncer es una **enfermedad con varias etapas**: las células neoplásicas individuales se convierten progresivamente en células anormales y agresivas.

Hay dos clases importantes de genes relacionados directamente con la pérdida del control del crecimiento: los **protooncogenes** codifican proteína que fomentan el crecimiento celular y la proliferación. En condiciones normales, estas proteínas sólo se expresan en células de división rápida y deben activarse mediante señales externas. Cuando se sobrexpresan tales genes mediante mutaciones o sus productos proteicos se vuelven sobreactivos, se puede producir una proliferación incontrolada. Las versiones mutadas de los protooncogenes que aumentan el riesgo de cáncer se llaman **oncogenes**.

Por contra, los **genes supresores de tumores** suprimen el crecimiento y la proliferación celular en el cuerpo. Estos genes pueden actuar como freno en la división celular o pueden fomentar la diferenciación celular o también la **muerte celular programada** (apoptosis). Cuando una de estas funciones falla, habrá un exceso de células en proliferación.

La transformación de protooncogenes en oncogenes que activan el cáncer puede producirse de diferentes formas; está relacionada con una "ganancia de función" (***gain-of-function mutation***). Por el contrario, los genes supresores de tumores provocan el cáncer mediante la pérdida de la función (***loss-of-function mutation***). En muchos tipos de cáncer se les silencia de forma epigenética, es decir, mediante la metilación del DNA y la modificación de la estructura de cromatina.

En la Fig. 9.14 se representa la **proteína supresora de tumores p53**. Normalmente se halla presente a bajas concentraciones. Sin embargo, cuando se producen daños en el DNA, el nivel de la p53 empieza a crecer e inicia mecanismos de defensa. Se une a muchos ámbitos reguladores del DNA y provoca la producción de proteínas protectoras. Si el daño al DNA es muy grave, la p53 inicia la muerte celular programada, la apoptosis. Si la p53 muta, estos mecanismos de control se pierden y con ellos la protección contra la división celular incontrolada.

Las **células tumorales** tienen una serie de características comunes que se utilizan para combatirlas de forma selectiva:

- Tienen una apariencia morfológica diferente a la de las células normales.
- Han perdido su función original (desdiferenciación).
- En cultivo celular son prácticamente "inmortales".
- Interactúan con las células vecinas de forma diferente.
- No se adhieren a las superficies.
- Poseen membranas celulares químicamente modificadas.
- Pueden incluir modificaciones cromosómicas.
- Secretan proteínas de otros tipos.

Un diagnóstico precoz (Cap. 10) es la clave para que la terapia contra el cáncer dé resultado.

9.9 Nuevas terapias contra el cáncer

El 30% de los tipos de cáncer es operable, especialmente en una fase temprana. Las otras formas nuevas de tratamiento se benefician de la ingeniería genética y de la investigación del genoma. En la **radioinmunoterapia** (RIT) se utilizan anticuerpos marcados con isótopos (Cap. 5) para localizar tumores. El ^{90}itrio y el ^{131}yodo también pueden matar directamente células cancerosas. Los anticuerpos concentran de forma selectiva estos isótopos en el tumor.

En la **quimioterapia** se utilizan "pequeñas moléculas". El primer medicamento hecho a medida fue ***Glivec***® (*Gleevec*®), de Novartis, en Basilea (Cuadro 9.4). *Glivec*® se une al producto de fusión ABL-BCR en la leucemia mieloide crónica (LMC). Se trata de tirosinaquinasas como la proteína Src, las cuales normalmente fosforilan las proteínas con el ATP y las sobreactivan.

En la **bioterapia** se utilizan proteínas contra el cáncer: interferones, interleuquinas y anticuerpos monoclonales. Los interferones y las interleuquinas estimulan el sistema inmunitario. La interleuquina-2 (IL-2) estimula, por ejemplo, la producción de células asesinas activadas con linfoquina, las cuales penetran en los tumores y liberan toxinas. En la bioterapia adoptiva, los linfocitos T del paciente se mantienen en cultivo celular, se activan mediante IL-2 y luego se vuelven a transferir al paciente. Los anticuerpos monoclonales identifican antígenos del tumor y ponen en marcha la cascada del complemento y otros efectores citotóxicos. El **rituximab** es un ejemplo excelente de esto (detalles en el Cap. 5).

Las **inmunotoxinas** son anticuerpos (Cap. 5) que transportan una pequeña molécula (como el ricino en las formas de leucemia y linfomas resistentes a la quimioterapia o la enterotoxina bacteriana de *Pseudomonas*) al lugar de destino (Figs. 9.16 y 9.17). Sobre todo son efectivas en los diferentes tipos de leucemia porque son más fácilmente accesibles que los tumores sólidos. Una molécula individual



Fig. 9. 16 El ricino (*Ricinus communis*) y las semillas de ricino son los proveedores del ricino.

En 1978 se perpetró un atentado mortal con ricino al exiliado búlgaro Georgi Markov, en Londres.

Estaba esperando el autobús en el puente de Waterloo y por detrás alguien le clavó un paraguas en la pantorrilla. La misma noche empezó a tener fiebre y su presión sanguínea bajó. Cuatro días después murió a consecuencia de un paro cardiaco. En la autopsia se encontró una bola de platino e iridio de 1,52 milímetros de diámetro con dos agujeros que se habían llenado de ricino. Este método de asesinato se utilizó como ataque al menos en otros seis casos a finales de los años 1970 y principios de los 1980.

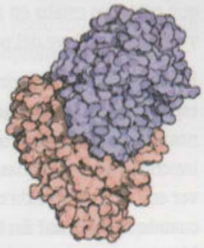


Fig. 9. 17 El ricino es una fitotoxina fuerte que protege a las semillas del *Ricinus* frente a los mamíferos. Las dos cadenas tienen diferentes misiones: la cadena B (representada en rosa) se une fuertemente a los azúcares de la superficie celular y dirige a la cadena A (en azul) hacia el interior de la célula, donde ataca enzimáticamente a los ribosomas.

Cuadro 9.4 *Glivec*® –El primer medicamento contra el cáncer hecho a medida

Louis Pasteur y Marie Curie eran sus héroes cuando tenía 12 años, y para él era indispensable, al igual que para ellos, conseguir algo en el mundo, por ejemplo descubrir un nuevo medicamento. El científico oriundo de Basilea **Alex Matter** (nacido en 1940), después de estudiar medicina en Basilea y Ginebra, y patología e inmunología en Estados Unidos y Europa, se consagró a una batalla perdida: el cáncer. Matter opinaba que había que aprender de la naturaleza cómo matar las células no deseadas. «¡El cáncer debería poder curarse como si fuese una enfermedad infecciosa!»

En su laboratorio de Francia trabajó en 1980 con el interferón (Cuadro 9.2), elogiado en aquel momento como el medicamento milagroso contra el cáncer. Estas expectativas eran bastante ingenuas. Lo peor fue que, para decepción de Matter, en aquel momento nadie se entusiasmó con la investigación contra el cáncer. El "gigante farmacéutico" Ciba-Geigy, de Basilea, había cerrado el departamento de investigación contra el cáncer en 1980.

Sin embargo, en 1983 llamaron a Matter a Basilea para dirigir el departamento que se había vuelto a abrir. A pesar de ello, apenas se esperaba obtener rápidamente algo útil de la investigación contra el cáncer. Se advirtió a Matter de que ése sería el fin de su carrera científica. Formó un equipo para luego darse cuenta de que el proyecto estaba "al final de la lista" –¡algo que suele suceder en la industria! Pero Matter se dedicó entonces en cuerpo y alma a la biología molecular que entonces estaba en auge. ¡Ésta podía y debía ser la clave del problema del cáncer!

Había una clase de enzimas que le fascinó especialmente: las **quinasas** (Cap. 3). Algunos médicos chinos y colegas suyos de Basilea creían que las quinasas tenían algo que ver con la proliferación celular. ¿Qué pasaba cuando se inhibían? En la biblioteca, Alex Matter encontró un trabajo japonés: la sustancia natural estaurosporina procedente de los hongos inhibe una serie de quinasas.

A sus colegas, la idea de combatir el cáncer de esa manera les pareció bastante absurda e incluso demasiado simple. Después de dos años en Basilea, en 1985 contrató a **Nick Lydon,** de Boston, para investigar la quinasa, y se centraron en la **tirosina quinasa** (Fig. página 241).

Hoy se sabe que las tirosina quinasas en sí son imprescindibles en una vida celular sana. Estas enzimas son importantes para la **transducción de señal**. Una cadena de comunicación en el interior de la célula se pone en movimiento con un mensaje externo adecuado: se captan las señales que llegan del exterior a la célula y se conducen hasta alcanzar el núcleo celular y los genes.



Alex Matter

Las tirosina quinasas se encuentran entre los primeros y también más importantes transmisores intracelulares de mensajes. Transmiten un grupo fosfato del ATP a restos de tirosina de las proteínas.

En Boston, Matter trabajó conjuntamente con el médico oncólogo y "postdoc" **Brian Druker**, quien probó los inhibidores. En el equipo todavía faltaba el químico **Jürg Zimmermann**, que investigaba en Basilea, y una bióloga que siempre estaba analizando, **Elisabeth Buchdunger**.

Brian Druker sabía que el cáncer con más expectativas era la **leucemia mieloide crónica** (LMC), el único de más de cien tipos de cáncer cuyo origen genético se conoce. Druker predijo en 1988 que esta leucemia podía convertirse en la primera enfermedad contra la que actuara un inhibidor de la proteina quinasa. En la leucemia mieloide crónica, los glóbulos blancos (leucocitos) proliferan de forma incontrolada. La causa aparente de este crecimiento desmedido es un defecto genético identificable al microscopio: los glóbulos blancos degenerados se reconocen por un cromosoma modificado, el **cromosoma Filadelfia**. Aparece cuando a una de las células madre de la médula ósea, a partir de las cuales se forman los glóbulos blancos, le ocurre un accidente: mientras la célula se divide, el cromosoma 9 recibe por equivocación un fragmento del cromosoma 22, y éste un fragmento del cromosoma 9. Esta permutación de material genético –denominada **translocación**– es característica de la mayoría de los casos de leucemia mieloide crónica.

El cromosoma Filadelfia es tan típico de la enfermedad que los médicos lo utilizan desde hace mucho tiempo como cromosoma marcador para el diagnóstico.

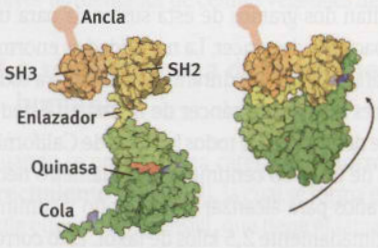
Debido a la fusión de los fragmentos de cromosomas se encuentran dos genes que normalmente no tienen ninguna relación entre sí: el gen *abl* del cromosoma 9 y el *bcr* del cromosoma 22. Ambos se convierten en vecinos muy próximos –con consecuencias fatales: juntos forman lo que se denomina **oncogén, un gen que produce cáncer**: el *bcr-abl*.

Druker dudaba de que se pudiera crear una sustancia inhibidora que bloquease de forma selectiva la producción de la tirosina quinasa causante del cáncer sin afectar a otras 150 tirosina quinasas de la célula. Leyó en *Science* que un grupo tenía el receptor para el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*, Cap. 9) y lo podían inhibir de forma específica. Druker creía entonces que si un **inhibidor de la tirosina quinasa** podía detener el oncogén *bcr-abl*, esto sería una prueba de que se puede combatir el cáncer con biología molecular.

¡A pesar de todo, en 1990 ya había cien investigadores trabajando en el laboratorio de Alex Matter en Ciba-Geigy, en comparación con la media docena de 1983! Y esto a pesar de la resistencia, directa o indirecta, de la dirección de la empresa. Dadas las cifras tan bajas de pacientes con leucemia mieloide crónica, era seguro que no se podía esperar un "producto estrella" farmacéutico. Sin embargo, para Alex Matter se trataba del principio en sí: si la sustancia inhibidora funcionaba con este tipo de cáncer, también se podían tratar con biología molecular otros tipos. Matter y Lydon tenían cientos de sustancias que querían probar. Pero todas ellas sólo eran inhibidores débiles.

Jürg Zimmermann llegó en 1990 al departamento de Matter. Sus moléculas tenían que caber en el "bolsillo" de la enzima Bcr-Abl. Este centro activo está ocupado por ATP. Por otra parte, las moléculas no debían inhibir la producción de las tirosina quinasas "buenas" e importantes. Cada semana Zimmermann sintetizaba unas diez moléculas que luego analizaban los biólogos en las siguientes dos semanas. Los primeros resultados fueron descorazonadores: una buena inhibición, pero de **todas** las quinasas. ¡Esas sustancias eran tóxicas!

Posteriormente Zimmermann se interesó por una clase de sustancias que ya estaban en el mercado, las fenilaminopirimidinas. Su "intuición de químico" le decía que de ahí se podía obtener alguna cosa.



La proteína Src, una tirosina quinasa, tiene muchas partes móviles. En su forma inactiva (derecha) tiene forma de bola. La forma activa (izquierda) está doblada para poder fosforilar proteínas. Se une al ATP (rojo), que suministra el grupo fosfato. En la primera reacción se fosforila la tirosina (azul). Cuando este lugar está fosforilado, la enzima estará completamente activa. Pérdida de control en las tirosina quinasas: cuando se cubre la cola, la enzima ya no puede doblarse a su forma inactiva (derecha) y la Src está entonces permanentemente activa; de este modo se pierde el control del crecimiento celular y puede producirse el cáncer.

Cuando Zimmermann llegó al laboratorio el 26 de agosto de 1992 el éxito flotaba en el aire: ¡había una serie de sustancias que eran activas contra el oncogén *bcr-abl* e incluso mostraban actividad *in vivo*, en animales de laboratorio!

Mediante la permutación cromosómica (translocación) se destruye un gen que codifica una tirosina quinasa (ver figura, arriba). La tirosina quinasa se desregula y se mantiene "permanentemente conectada". La **enzima "hiperactiva"** fosforila todas las proteínas en la cascada de reacciones que ordenan a la célula que se divida. La fosforilación incontrolada es, de este modo, el origen de una catástrofe que produce cáncer. Por consiguiente, la fosforilación por parte de las quinasas se debe mantener bajo control para combatir la leucemia mieloide crónica.

El experimento de Elisabeth Buchdunger sólo duró un par de horas. Se incubaron los cultivos celulares con la sustancia descubierta, el **imatinib mesilato**. Se midió el grado de fosforilación cuando la sustancia actuaba sobre el oncogén *bcr-abl*. ¡Se había inhibido la fosforilación! Los investigadores aún no sabían que habían escrito una página de la historia de la medicina. En primavera de 1993 la sustancia se clasificó como *drug candidate*, como posible medicamento. Mantuvo su nombre codificado STI571.

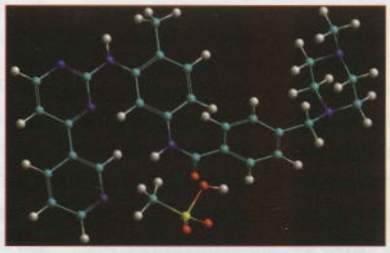
El medicamento tenía un **inconveniente**: pocos pacientes, es decir, pocos beneficios en caso de éxito. En 1993 Brian Druker probó en Estados Unidos cuatro moléculas similares, entre ellas la STI57; en febrero de 1994 se obtuvieron los primeros resultados al inhibir un 90% de las células de leucemia en cultivo celular. En 1995 comenzaron a realizarse experimentos con animales, todos ellos satisfactorios. En marzo de 1996 Ciba-Geigy se fusionó con Sandoz, y Daniel Vasella fue nombrado *Chief Executive Officer* (CEO) y en 1999 presidente de Novartis.

Alex Matter dobló su capacidad de investigación con sus colegas de oncología de Sandoz. Se mantuvo el escepticismo contra su idea –la presión sobre él creció hasta el infinito. La dirección de marketing insistía en que el mercado era demasiado pequeño.

Alex Matter no creía que no pudiera funcionar. ¡Debía funcionar! Él decía: «Igual que un perro mordedor, no puedes soltar nunca más el hueso».

El presidente de Novartis, Daniel Vasella, médico de profesión, relata toda la historia desde su punto de vista en el libro de Robert Slater *Magic cancer bullet. How a tiny orange pill is rewriting medical history.*

Fluyeron cientos de millones de dólares. El concepto del *Glivec* ya existía en 1983, la molécula de imatinib mesilato se acabó de sintetizar en 1993 y, entre unas cosas y otras, se probó en el primer paciente en 1998; entonces, la *Food and Drug Administration* (FDA) lo autorizó en 2001 en un tiempo récord porque los pacientes de cáncer también se habían organizado de forma excelente.



Estructura del *Glivec*® (imatinib mesilato).

El STI o *Glivec*® es uno de los primeros medicamentos **hechos a medida por biología molecular** y representa un tipo de fármacos contra el cáncer totalmente nuevo, los "inhibidores de la transducción de señal". A diferencia de los medicamentos convencionales contra el cáncer, que sólo pueden distinguir entre células sanas y enfermas de forma condicionada y, por tanto, suelen tener efectos secundarios graves, los nuevos principios activos intentan establecer de forma precisa **rutas moleculares de información** que son típicas de las células tumorales.

En la actualidad, los investigadores saben que la enfermedad aparentemente no unitaria del cáncer es una enfermedad de las células, los genes y las moléculas. Los médicos conocen unos doscientos tipos de tumores.

Las vías de comunicación dañadas en el interior de la célula no son sólo significativas para la leucemia mieloide crónica. El principio activo STI571 interfiere con la tirosina quinasa hiperactiva, la cual se forma equivocadamente debido al cromosoma Filadelfia. La comunicación dañada por estos errores genéticos se bloquea así en una de las primeras y más importantes etapas de transmisión molecular en la célula; gracias al medicamento, el mensaje del crecimiento ya no llega al núcleo celular con los genes. Se interrumpe la proliferación incontrolada de las células.

Los primeros estudios clínicos de fase I (verificación de la tolerabilidad en experimentos en personas sanas) con el nuevo medicamento contra el cáncer, STI571, dieron comienzo en 1998 en Estados Unidos. Entre agosto de 1999 y junio de 2000, en 32 centros de seis países, entre ellos en Mannheim, se reclutaron pacientes para un estudio de fase II. Los resultados fueron tan prometedores que las autoridades sanitarias americanas autorizaron en mayo de 2001 el nuevo medicamento contra el cáncer para tratar pacientes con leucemia mieloide crónica.

Actualmente se están realizando nuevos estudios clínicos para comprobar si *Glivec*® también es adecuado para tratar tumores sólidos. El medicamento influye sobre otras tirosina quinasas, por ejemplo la c-kit. Esta quinasa parece estimular el crecimiento de tumores del estroma gastrointestinal. Hasta el momento no existe tratamiento médico para estos tipos de cáncer del aparato digestivo.

Excepcionalmente, al autor de este libro se le concedió un pronóstico (en agosto del año 2005): ¡el trabajo de Alex Matter merece el Premio Nobel!

Bibliografía utilizada: Eberhard-Metzger C (2001) *Die neuen Medikamente gegen Krebs.* Spektrum der Wissenschaft 12,46 ff.



Fig. 9.18 La *Aspirina*® es el medicamento que más se toma en la actualidad. ¡Cada año se ingieren 80 000 millones de pastillas!
En 1828 se aisló el ácido salicílico de la corteza de sauce (*Salix alba*) como masa amarilla y cristalina, y se denominó salicilina. En 1889, Felix Hoffmann (1868-1946) patentó el ácido acetilsalicílico (AAS) y ofreció la idea a la compañía Bayer. La "a" de acetil se combinó con el "spir" de *Spirea ulmaria*, la reina de los prados (que al igual que la corteza de sauce contiene ácido salicílico), y la terminación "ina" de las medicinas.
La *Aspirina*® inhibe la producción de prostaglandinas en el cuerpo, mediadores que envían señales de dolor locales y las refuerzan. Todas las prostaglandinas proceden de un predecesor, el ácido araquidónico. La enzima ciclooxigenasa (COX) forma dos moléculas de oxígeno en el ácido araquidónico y, a continuación, en el cuerpo se forma la prostaglandina. Si entonces se inhibe esta enzima, ya no aparece señal de dolor como reacción a la inflamación. La coagulación de la sangre también se retrasa. La *Aspirina*® inhibe precisamente esta enzima y, por tanto, bloquea la formación de prostaglandina. Aparentemente, los antiinflamatorios no esteroideos como la *Aspirina*® también constituyen un factor de protección contra algunas formas de cáncer. Incluso como remedio milagroso contra el infarto de miocardio, la *Aspirina*® sólo puede prevenir el primer infarto; no lo puede evitar, sino sólo reducir el peligro. Desde el punto de vista puramente económico, la *Aspirina*® es probablemente el método preventivo más económico contra algunas enfermedades de tratamiento intensivo y costosas.

de ricino puede matar una célula completa "saltando" de una molécula a otra (al contrario que los venenos como el cianuro, que actúan 1:1).

Los anticuerpos recombinantes también pueden ser portadores de citoquinas como la IL-2 o se construirán como abzimas (Cap. 5).

Los **medicamentos anticancerosos** se desarrollan rápido con la ayuda de la ingeniería genética. Sorprendentemente, las plantas poseen un gran potencial de principios activos anticancerosos. El **ácido acetilsalicílico,** por ejemplo, no tiene únicamente un efecto antiinflamatorio, analgésico y anticoagulante, y por ello no sólo previene contra un infarto de miocardio, sino que también actúa contra el cáncer: ataca la primera etapa de la síntesis de sustancias mensajeras significativas, como la prostaglandina. El ácido graso araquidónico se convierte en prostaglandina mediante la enzima de membrana ciclooxigenasa.

Algunos medicamentos, como el **paclitaxel** (del tejo), la **vinblastina** y la **vincristina** (de la siempreviva de Madagascar, Cap. 7), se sintetizan en ínfimas cantidades en las plantas. Tienen estructuras enormemente complicadas. El nombre químico de la sustancia paclitaxel es, por ejemplo:

> 4,10 diacetato, 2-benzoato, 13-éster de 5 β, 20-epoxi-1,2α, 4,7-β, 10β, 13-α-hexahidroxitax-11-eno-9-ona, con (2R, 3S)- N-benzoil-3-fenilisoserina.

Se intenta reprogramar las plantas mediante ingeniería metabólica. Los principios activos del tejo (*Taxus*) fueron los primeros medicamentos anticancerosos.

9.10 El paclitaxel contra el cáncer

Los tejos son coníferas de hoja perenne que en otoño dan frutos rojos. Todas las partes de esta conífera son enormemente venenosas –con una única excepción: la envoltura carnosa roja de las semillas es comestible, pero el hueso es venenoso. Los árboles ocultan en su corteza nudosa una sustancia que puede salvar vidas. Los tejos (Cuadro 9.3) almacenan continuamente, durante toda su vida, un alcaloide en la corteza, el **paclitaxel**, también denominado ***Taxol***®.

En medicina, el paclitaxel se ha convertido en un citostático del que ya no se puede prescindir. La célula reacciona a la inhibición de la división celular con la muerte celular programada –la llamada apoptosis. Tras investigaciones intensivas por parte del *National Cancer Institute* (NCI) de Estados Unidos, el paclitaxel se viene aplicando con mucho éxito en seres humanos desde los años 1990 en el **cáncer de mama** y **de ovarios**. Sin embargo, este medicamento tiene una desventaja: es escaso y, por tanto, muy caro.

El **tejo del Pacífico** (*Taxus brevifolia*) suministra el codiciado paclitaxel. Se encuentra en uno de los bosques vírgenes que todavía quedan en la costa del norte de California. La fatalidad es que sobre todo, son árboles especialmente viejos los que acumulan alcaloides en concentraciones elevadas.

Se necesitan dos gramos de esta sustancia para tratar a un paciente de cáncer. La necesidad es enorme, ya que para poder tratar durante sólo un año a todas las mujeres que sufren cáncer de mama en Estados Unidos se deberían talar todos los tejos de California. Un árbol de unos 60 centímetros de diámetro necesita 200 años para alcanzar este tamaño y suministra aproximadamente 2,5 kilos de taxol. Esto corresponde a un rendimiento de sólo un 0,004%.

La resistencia de los ecologistas contra la tala empezó a cobrar intensidad: ¡la protección de los tejos y de los bosques contra los intereses económicos de las compañías! En enero de 1993, tres meses después de que la FDA autorizase el principio activo, se informó de que ya no se talarían más tejos en el Parque Nacional.

Tal y como se ha mencionado, mientras tanto, el principio activo fabricado de forma semisintética a partir de las hojas del tejo se aplicó primero en mujeres para tratar los tumores malignos de ovario y mama. Desde hace unos años, el medicamento basado en el paclitaxel, *Taxol*® o *Taxotere*®, también ha significado un paso pequeño, pero importante, en el tratamiento del **broncocarcinoma** que provoca rápidamente la muerte. La Organización Mundial de la Salud (OMS) dice que el **cáncer de pulmón** es la enfermedad maligna más frecuente en el mundo. Cada año enferman un millón de hombres y 333 000 mujeres de esta dolencia que, según la opinión de los expertos, en aproximadamente el 80% de los casos se debe al tabaco. En Alemania se registran anualmente unos 45 000 nuevos enfermos.

En los años 1980 y principios de los 1990, más de cien de los químicos más eminentes compitieron para sintetizar el paclitaxel en su totalidad en el laboratorio. El ganador fue finalmente el equipo de **Robert A. Holton** (Cuadro 9.3), de la Universidad del Estado de Florida. En 1994, los científicos informaron de que la síntesis total era complicada: ¡un rendimiento de sólo el 2%!

Aquello que la célula vegetal crea a temperatura y presión normales y en agua, el químico lo debe "cocinar" en 40 pequeñas etapas. Lo único que ambos procesos tienen en común al final es el **bajo rendimiento** del material tan codiciado. Puesto que los tejos californianos no pueden talarse todos por motivos de protección de la especie, era necesario encontrar fuentes alternativas.

El microbiólogo **Gary Strobel** localizó nuevas fuentes de paclitaxel en hongos simbióticos (Cuadro 9.3), los cuales viven en los tejidos de tamiz internos del árbol. También se realiza una etapa previa del *Taxol*® en cultivos de células de tejo en fermentadores, por ejemplo en Hamburgo, en el mayor fermentador de células vegetales del mundo.

9.11 La hormona del crecimiento humana

Cuando se produce una carencia de **hormona del crecimiento** (Fig. 9.19), la cual se forma en la glándula pituitaria (hipófisis), que tiene el tamaño de un guisante, en caso extremo produce enanismo o esterilidad. Hasta finales de los años 1950, el enanismo no se podía eliminar con tratamiento médico. No fue hasta 1958 cuando se administró hormona del crecimiento humano (*human Growth Hormone,* hGH) cada vez a más niños. Al contrario que la insulina, que para tratar la diabetes puede proceder también de los cerdos o los bovinos, la hormona del crecimiento humano es específica de especie; para la terapia sólo puede utilizarse, pues, **hormona del crecimiento humana**. Por este motivo, hasta hace poco se tenía que extraer del cerebro de cadáveres humanos. El tratamiento de un niño, que antes duraba dos años, precisaba 50 a 100 glándulas pituitarias. Hoy se cree que el tratamiento con hormona del crecimiento debe continuar hasta después de cumplir los 18 años para que tenga éxito.

Debido a que se produjeron **muertes** en pacientes, a principios de 1985 se prohibió la venta y la aplicación de la hGH natural. Parece que al aislar la hormona penetraban en el medicamento partículas infecciosas procedentes del cadáver, lo que pudo haber provocado la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (encefalopatía espongiforme bovina).

Por suerte, ahora existe la hGH producida genéticamente. La empresa sueca Kabi Vitrum, hasta el momento el mayor fabricante del mundo de hormona del crecimiento humana "natural", produce, por ejemplo, en un biorreactor de 450 litros con bacterias y mediante ingeniería genética, ¡la misma cantidad que antes se obtenía a partir de 60 000 pituitarias! Antes se disponía de tan poca cantidad de hormona que sólo se podía tratar a niños con enanismo muy acusado.

Los nuevos descubrimientos hacen que el mercado, todavía reducido, de la hormona del crecimiento esté aumentando claramente. En las vacas, las hormonas del crecimiento estimulan la producción de leche (Cap. 8); naturalmente, esto sólo es interesante para nosotros en términos económicos. ¡Sin embargo, en el engorde se pone de manifiesto un "efecto anabólico"! Esta palabra clave vuelve a electrizar a culturistas y deportistas. La hormona del crecimiento multiplica las proteínas (músculo) y reduce la formación de grasa.

El especialista en dopaje Werner W. Franke constató lo siguiente en los Campeonatos Mundiales de Atletismo de París del año 2003: «Este campeonato del mundo fue un festival de gente con aparatos de ortodoncia. Incluso Marion Jones, ahora de nuevo en activo, llevaba aparatos de ortodoncia. Esto es un signo seguro de que se toma hormona del crecimiento humana: crece la mandíbula, crecen los maxilares, y esto hace que los dientes sobresalgan, como sucede en los niños que tienen defectos en la formación. Los aparatos de ortodoncia indican claramente un mal uso de las hormonas».

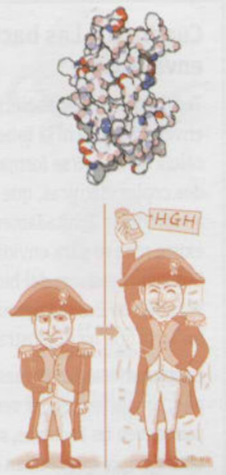


Fig. 9.19 Hormona del crecimiento humana (arriba). ¿Se hubiera hecho tan famoso Napoleón si hubiera sido un gigante?

9.12 La hormona del crecimiento epidérmico –Desaparecen las arrugas y se curan los pies diabéticos

En todo el mundo se gastan cantidades enormes de dinero para hacer desaparecer las arrugas y las líneas de expresión de la cara. El mundo femenino se deja incluso inyectar toxina del botulismo (*botox*). ¡En principio se trata de una arma del tipo B! La toxina está formada por bacterias que son tristemente famosas por provocar intoxicaciones alimentarias. La inyección subcutánea paraliza la musculatura durante un tiempo. Las arrugas desaparecen mientras dura la paralización muscular.

La industria cosmética utiliza otras cremas antiarrugas igualmente caras a base de grasas y vitaminas. Como modelos publicitarias se suele utilizar muchachas jóvenes con un cutis impecable (Fig. 9.20). Por lo demás, el **factor de crecimiento epidérmico** (*Epidermal Growth Factor,* EGF) es un péptido que excita las células epiteliales para su nueva formación.

Wan Keung Wong, de la Universidad de Ciencias y Tecnología de Hong Kong (HKUST), ha conseguido producir EGF humano por manipulación genética mediante bacterias *Coli.* La costosa crema con su EGF correspondiente (un tarrito cuesta 450 dólares HK, es decir, unos 50 euros) se aplica cada día, y después de cuatro a seis semanas las arruguitas se rellenan con células epiteliales nuevas.

También se produjo un avance médico espectacular con el EGF: los pacientes con diabetes grave sufren con frecuencia las llamadas úlceras del pie diabético (*diabetic feet ulcer*), heridas abiertas que ya no se curan. En Estados Unidos hay 600 000 pacientes afectados. En un estudio en Hong Kong con EGF, después de ocho semanas de tratamiento a diabéticos casi sin



Fig. 9.20 Arriba: en China, incluso en las barras de labios se utiliza EGF. Centro: producción de EGF por *E. coli* en un biorreactor (a la derecha WK Wong). Abajo: después de un tratamiento caro, de varias semanas de duración, desaparecen las arrugas, que vuelven a aparecer cuando se deja de utilizar la crema. Se pueden activar las células del cáncer de piel.

Cuadro 9.5 Las bacterias también envejecen

Teóricamente, las bacterias no conocen el envejecimiento ni la muerte. A partir de una célula de *E. coli* se forman en 20 minutos dos copias idénticas, que se pueden volver a reproducir ilimitadamente. Ahora ya no existe motivo para envidiar a las bacterias. Los investigadores del biocentro de la Universidad de Basilea descubrieron la primera bacteria que ha demostrado envejecer.

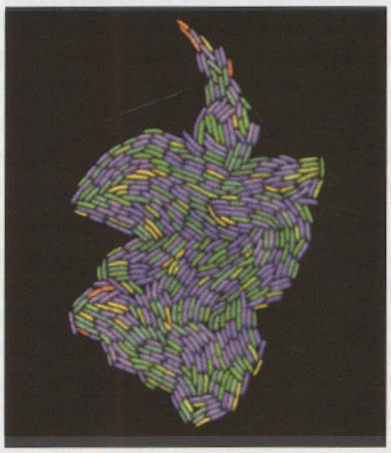
Las procariotas, las formas de vida más simples, sin núcleo celular verdadero, a las cuales pertenecen las bacterias, se consideran inmortales siempre que reciban el alimento suficiente y no estén expuestas a influencias medioambientales dañinas. Por el contrario, todas las otras células superiores (eucariotas) parecen tener fecha de caducidad, por decirlo de alguna manera. Cumplen su función y se dividen algunas veces antes de empezar a envejecer y morir finalmente. Sus telómeros, extremos especiales de los cromosomas, se hacen más cortos con cada división.

El requisito para el envejecimiento de las bacterias es la llamada división celular asimétrica, es decir, las dos células que se forman no pueden ser completamente idénticas. Esto se puede comprobar en la bacteria *Caulobacter crescentus*, que se encuentra en riachuelos pobres en sustancias nutritivas. Existen dos versiones de este microorganismo: el que nada libremente y no se puede reproducir, la célula móvil *swarmer* y la célula fija "célula de tallo", la cual es capaz de realizar la división celular. Cada célula móvil se puede convertir en algún momento en célula de tallo, se adhiere en un lugar adecuado y vuelve a empezar a formar células móviles. En los experimentos se demostró que la capacidad de reproducción de las células de tallo descendió mucho en aproximadamente dos semanas. El número de descendientes que se había producido ascendía a 130 y no se distribuyó uniformemente en esas dos semanas. Al final del experimento, algunas de las células de tallo habían dejado por completo de formar células móviles, y otras sólo se dividían de forma esporádica. Se sospechó que el *Caulobacter* investigado no representaba una curiosidad en el mundo de las bacterias. ¿Pero qué pasa entonces con los divisores celulares simétricos?

La bacteria intestinal *Escherichia coli* ya era conocida precisamente por sus divisiones completamente simétricas. ¿Una vida eterna por una división constante? Al igual que la mayoría de las bacterias, se estrangula por el centro de modo que se generan dos mitades de célula del mismo tamaño. Entonces, la otra mitad respectiva se sintetiza de nuevo. Es decir, que cada célula está formada por un polo celular antiguo que ha heredado de su célula predecesora, y por uno nuevo.

Eric Stewart y sus colegas del Instituto de Investigación Médica INSERM de París persiguieron el destino de las células bacterianas que se dividían en función de la edad de sus polos celulares. Para ello marcaron las células individuales de *E. coli* con sustancias colorantes fluorescentes y observaron el crecimiento de las colonias con un microscopio automático rápido. El análisis posterior de más de 35 000 células demostró que las bacterias con los polos celulares más antiguos (indicadas en rojo en la fotografía) tenían un índice menor de crecimiento y división, así como un riesgo mayor de morir que las mitades celulares recién sintetizadas.

En opinión de los investigadores, los signos de la edad aparecen en todos los organismos. Por consiguiente, ni las bacterias serían inmortales.



La prueba experimental de que las bacterias envejecen.



Fig. 9.21 "La fuente de la juventud" de Lucas Cranach. ¿Será posible con la biotecnología?

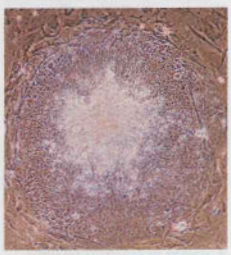


Fig. 9.22 Células madre humanas.

esperanza se observó una clara curación. ¡La única alternativa que tenían era la amputación del pie! En las quemaduras, el EGF también ayuda a la piel a generar nuevas células. Igualmente se utiliza con éxito en heridas oculares y para curar úlceras estomacales.

9.13 Las células madre: ¿la fuente de juventud decisiva?

Las células madre (Fig. 9.22) renuevan constantemente nuestras células somáticas. Sólo existen problemas a la hora de renovar los tejidos musculares y nerviosos. Por este motivo, hasta ahora se creía que la zona del cerebro afectada por una embolia y el músculo cardiaco después de un infarto de miocardio no se podían regenerar. Sin embargo, ahora parece que también hay células madre para ello.

¿Cómo son capaces las células madre de realizar esta renovación? Pueden dividirse con mucha más facilidad y no sólo se mantienen vivas a sí mismas, sino que forman nuevas células somáticas. En la médula ósea, las células madre del sistema sanguíneo se dividen según señales corporales (por ejemplo eritropoyetina, EPO, como consecuencia de la pérdida de sangre, Cap. 4) y forman células madre hijas y células sanguíneas nuevas.

Las células madre de tejidos son, por tanto, "células originales" que hacen que se formen continuamente nuevas células especializadas allí donde se necesiten. Las células madre también se encuentran en el embrión temprano, entre cinco y diez días después de la fecundación. Estas **células madre embrionarias** (**CME**) provocaron a partir del año 2000 una acalorada discusión en los medios de comunicación y en los parlamentos: a partir de ellas pueden formarse todos los tipos de células, son **pluripotentes.**

¿Cómo se forman las células madre embrionarias? El óvulo fecundado (**zigoto**) forma, después de una división celular rápida, en un periodo de tres a cinco días una bola compacta de doce células, la **mórula**

(germen de mora). Después de cinco a siete días se forma un embrión en forma de **blastocito** de cien células. El blastocito sólo mide aproximadamente una séptima parte de milímetro. Sus células externas se llaman **trofoblastos**. El pequeño montón de células del interior es la masa celular interna y la fuente de las células madre embrionarias. Estas CME tienen la capacidad de diferenciarse en aproximadamente 200 tipos de células, o sea, son pluripotentes.

James Thomson, de la Universidad de Wisconsin en Madison, fue el primero en aislar y cultivar CME humanas. El mismo año lo consiguieron **John Gearhart** y su equipo de la Universidad John Hopkins con células reproductoras primarias (espermatozoides y óvulos), los cuales también se diferenciaron después.

Las CME humanas tienen dos características principales:

- Pueden autorrenovarse indefinidamente y formar otras células madre.
- En determinadas condiciones, pueden diferenciarse en una gran cantidad de células especializadas maduras.

Las CME humanas no envejecen porque expresan en alto grado la **telomerasa**. Diversos grupos de trabajo han mantenido con vida líneas celulares durante más de tres años y más de 600 ciclos de división sin problemas. Las células madre también pueden mantenerse congeladas durante mucho tiempo sin perder por ello sus características. Cuando se estimulan con factores de crecimiento pueden diferenciarse en diversos tipos de células: epiteliales, cerebrales (neuronas y células gliales), tejidos cartilaginosos (condrocitos), osteoblastos (células que forman los huesos), hepatocitos (células hepáticas), células musculares, inclusive las de los músculos lisos que recubren las paredes de los vasos sanguíneos, las células de la musculatura esquelética y las células de los músculos cardiacos (miocitos).

Cuando se trasplantan células madre de forma selectiva a un organismo enfermo, éstas pueden formar *in situ* el tejido de sustitución necesario. En caso de ratas y ratones, con células madre embrionarias se logró regenerar las células muertas del músculo cardíaco a causa de un **infarto de miocardio** experimental (Fig. 9.23). Esto también se ha conseguido en pacientes humanos tratados de infarto de miocardio en Alemania. Por consiguiente, no es de extrañar que todo el mundo se interese por las células "todopoderosas".

Con células madre embrionarias y tisulares ya se pueden cultivar tipos especiales de células en un medio nutriente. Por ejemplo, se intenta generar los islotes de Langerhans del páncreas a partir de células madre embrionarias. En lugar de inyectarse insulina, los diabéticos podrían alimentarse a partir de depósitos subcutáneos de células madre nuevas que sintetizan insulina.

Las células madre de tejidos (**células madre adultas**) tienen un potencial de desarrollo menor que las células madre embrionarias. Su capacidad de multiplicación y su vida están limitadas. Sin embargo, se ha conseguido aislar células madre adultas del cerebro y obtener neuronas en cultivos celulares. En las lesiones de la médula ósea en ratas y ratones se logró mejorar la función nerviosa inyectando neuronas obtenidas a partir de células madre.

Las células madre embrionarias también tienen desventajas: su obtención es problemática por motivos éticos, porque para ello hay que utilizar un embrión. Además, el receptor puede sufrir reacciones de rechazo y tumores malignos.

Todo esto no representa un problema con las células madre adultas, las células madre tisulares. Se pueden extraer del paciente y luego volvérselas a transferir sin peligro y sin temer una reacción de rechazo, pero son portadoras de los defectos congénitos o adquiridos del paciente. No obstante, son éticamente inofensivas y pueden extraerse por punción de la médula.

La sangre de la placenta y del cordón umbilical también es rica en células madre. Existen empresas que hoy ya las ofrecen. La sangre del cordón umbilical se puede congelar de forma fiable durante mucho tiempo para utilizarla en caso de que el donante la necesite. "Sus" células madre sólo pueden volverse a inyectar en él mismo. Por el contrario, las células madre embrionarias son universales.

Existen tres posibilidades para obtener células madre embrionarias:

- A partir de embriones "sobrantes" de la fecundación artificial. En todo el mundo se realizan cientos de miles de fecundaciones artificiales.
- A partir de embriones y fetos abortados o perdidos espontáneamente; éstas son las células madre fetales.
- Mediante la **"clonación terapéutica"**, la transferencia del núcleo celular a un óvulo desnucleado, como se engendró la oveja clonada Dolly.

En Alemania está prohibida la clonación de embriones humanos y la obtención de células madre a partir de éstos. Sin embargo, en casos excepcionales la ley permite importar células madre que se hayan obtenido antes del 1 de enero de 2002 por fecundación artificial y se hayan guardado en cultivos de laboratorio.

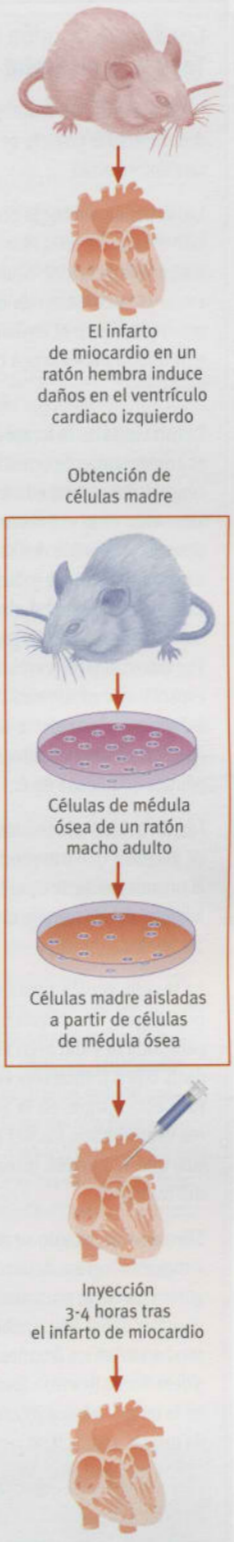


Fig. 9.23 Terapia con células madre en el infarto de miocardio (de ratón).

Cuadro 9.6 Opinión de los expertos: Terapia génica fetal

Normalmente, las familias están totalmente desprevenidas cuando se ven afectadas por una enfermedad

Las pruebas genéticas prenatales han permitido a estas familias identificar fetos enfermos antes de nacer. Muchas han decidido evitar el nacimiento de un niño enfermo interrumpiendo el embarazo, y bastantes han tenido bebés sanos tras un nuevo embarazo.

La estrategia de la terapia génica somática es engañosamente sencilla: puesto que la causa de las enfermedades se basa en una alteración de la expresión genética normal, debería ser posible realizar un tratamiento causal ejerciendo la influencia del DNA o, de forma más general, de los ácidos nucleicos sobre la expresión genética dañada. Por tanto, el DNA con una información específica se administra como "medicamento" y produce su efecto sobre la producción, en el organismo tratado, de la proteína terapéutica codificada en él.

La efectividad y la seguridad de los sistemas de vectores que transportan DNA extraño al organismo de destino han sido y son los factores decisivos para el progreso de la terapia génica.

La terapia génica para enfermedades de origen genético requiere una corrección para toda la vida, bien sea repitiendo la dosis o por transferencia génica estable. Para esta última, en la actualidad los mejores vectores son los del grupo de retrovirus, que se pueden integrar en el genoma del huésped.

Sin embargo, pronto se vio claramente que aunque se lograra desarrollar una terapia génica efectiva, normalmente ya no podría eliminar daños irreversibles que se hubieran producido en los órganos. Éstas y otras consideraciones llevaron finalmente al concepto de la terapia génica *in utero* (también llamada terapia génica fetal o prenatal).

Con ella se podía evitar la aparición de daños en órganos, permitir un mejor acceso a los órganos y al sistema celular (entre otras, las poblaciones de células madre en gran expansión) y reducir la aparición de reacciones inmunitarias. En el caso ideal, debería permitir corregir las células madre que producen la enfermedad en cuestión para poder curarla definitivamente.

Para un número cada vez mayor de enfermedades genéticas se pueden diagnosticar *in utero* fetos afectados genéticamente con pruebas prenatales. En la mayor parte de los casos se realiza un diagnóstico de este tipo en familias donde ya hay algún niño enfermo, pero para enfermedades más frecuentes que se producen en poblaciones concretas, como por ejemplo las hemoglobinopatías, la enfermedad de Tay-Sachs y la fibrosis quística (mucoviscidosis), en algunos países también se realiza un *screening* prenatal durante el embarazo. La consecuencia, hasta el momento, del diagnóstico de un feto genéticamente afectado es la difícil decisión de la familia entre interrumpir el embarazo y aceptar un bebé enfermo. La posibilidad de una terapia génica les ofrecería una tercera opción.

La fetoscopia o la intervención mediante ultrasonidos *in utero* (ver figura) es una base excelente para la aplicación selectiva de vectores prenatales.

Naturalmente, la terapia génica fetal no está concebida como terapia génica posnatal, sino como una ampliación que permite una intervención preventiva.

En los últimos diez años se ha demostrado con diferentes modelos animales y diversos vectores de transferencia génica que, *in utero*, es posible alcanzar prácticamente todos los órganos relevantes con la terapia génica para enfermedades genéticas. Anteriormente el adenovirus había encontrado el camino hasta los ensayos clínicos en la terapia génica para la hemofilia (Fig. 9.12). Este virus sólo es un poco inmunógeno y también permanece más tiempo en las células infectadas. Hoy, los vectores del grupo de retrovirus que se forman (se integran) en el DNA del organismo huésped son los candidatos con mejores perspectivas.

Con el objetivo de alcanzar una aplicación próxima a la clínica en la transferencia génica *in utero*, nuestro equipo interdisciplinario de investigación aplicó por primera vez en 1999 inyecciones mínimamente invasivas por ultrasonidos en la vena del cordón umbilical para la transferencia génica en fetos de ovejas.

La gestación de la oveja dura aproximadamente 145 días, con muchos nacimientos prematuros. Presenta una buena tolerancia a las manipulaciones *in utero* y su anatomía permite realizar intervenciones que se pueden aplicar a los fetos humanos.

Basándose en el modelo de la oveja, los especialistas en medicina fetal de nuestro equipo han desarrollado otros métodos nuevos *in utero* para diferentes momentos del embarazo, los cuales hasta el momento no se han probado en el feto humano. En todos estos procedimientos, la mortalidad materna fue extremadamente baja y la mortalidad fetal, normalmente a causa de infecciones intraoperatorias, fue de aproximadamente un 15%.



Ecografía de Theo Alex Kwong (por cortesía de mi alumno, el Dr. Alex Kwong).

La primera transferencia génica fetal realizada con éxito la llevó a cabo Seppen en 2003 (en Holanda) en fetos de rata Gunn. La rata Gunn constituye un modelo natural de la poco frecuente enfermedad de Crigler-Najar tipo I (CN1) del ser humano, que se produce por mutaciones en el cromosoma humano 2. Las mutaciones producen una cantidad tóxica de bilirrubina en sangre y, debido a su acumulación en el bulbo raquídeo, daños graves en el cerebro. Inyectando directamente un vector viral (el cual controla la producción de la bilirrubina humana, la UDP-glucuronil transferasa) en el hígado de fetos de ratas Gunn, en un año se logró reducir la bilirrubina tóxica aproximadamente un 45%.

Nuestro grupo logró corregir de modo permanente las alteraciones de la coagulación de la sangre en un modelo de ratón con hemofilia B (Cap. 9) con una inyección única en la placenta de un vector viral (que controla la producción del factor de coagulación de la sangre humana IX). Estos ratones no tienen proteína de factor IX operativa. En los animales tratados se podía seguir durante toda la vida la expresión del factor IX terapéutico transgénico en la sangre. Es especialmente importante el hecho de no haber encontrado anticuerpos contra la proteína IX humana en los animales tratados *in utero*.

¿A qué distancia se encuentran estas confirmaciones experimentales con animales de una aplicación clínica en el feto humano?

Creemos que, a pesar de los grandes progresos logrados en los últimos diez años, todavía queda un largo camino por recorrer: en primer lugar hay que tener en cuenta las grandes diferencias entre las especies. Además, se debe aclarar una serie de requisitos de seguridad generales y específicos, y cuestiones éticas relacionadas.

La terapia génica fetal comporta, naturalmente, una serie de riesgos debidos al procedimiento, que como es obvio se diferencian de la terapia génica postnatal. Al igual que en la mayoría de las intervenciones para ayudar al nacimiento, éstas afectan tanto a la madre como al feto, teniendo evidentemente prioridad la vida y el bienestar de la madre. Estos riesgos son infecciones, desencadenamiento de dolores prematuros y abortos. Otros riesgos discutidos se refieren con frecuencia a las posibilidades de transmisión involuntaria de la línea germinal, alteraciones del desarrollo y oncogénesis (aparición de cáncer).

Entre los temores más frecuentes que se expresan sobre la terapia génica prenatal se encuentra la modificación de la línea germinal, la cual a menudo se relaciona con la intención de crear los llamados "bebés de diseño" (*designer babys*). El objetivo actual de la terapia prenatal y postnatal es exclusivamente tratar enfermedades graves para las que no existe una terapia efectiva. Todavía estamos en los albores de la puesta en funcionamiento de este objetivo, y si un día se demuestra que existe la suficiente seguridad y efectividad, probablemente no habrá nada en contra de una aplicación para enfermedades menos graves e incluso para una utilización cosmética postnatal, siempre y cuando esto fuera justificable desde el punto de vista ético y de costes.

El objetivo de la terapia génica prenatal es evitar una dolencia grave debida a la genética, causada por mutaciones de un gen individual y exactamente definido. ¡La suposición de que se podría utilizar esta técnica para crear de forma selectiva un ser humano en un tablero de dibujo con las características físicas e intelectuales "deseadas" es mera ilusión!

No podemos prever las características del óvulo fecundado que dependen del funcionamiento conjunto de muchos genes diferentes, ni tampoco podríamos saber qué genes manipular y cómo, aparte de los riesgos de seguridad y preceptos éticos que estarían en contra de estos objetivos. Aún es más absurdo suponer que tales modificaciones por manipulación de las células germinales podrían transferirse a generaciones futuras para crear una "super-raza". En la actualidad, la terapia génica de la línea germinal humana no es necesaria desde el punto de vista médico ni realizable técnicamente de modo fiable y, por lo tanto, no es aceptable éticamente ni está permitida por la ley.

Hoy en día, la manipulación genética directa de células germinales no fecundadas no es práctica desde el punto de vista puramente de la técnica y, en el mejor de los casos, podría alcanzarse una integración casual de la secuencia génica terapéutica en el genoma de la célula germinal, sin que sean previsibles las consecuencias de la expresión genética de la proteína terapéutica. Además, sólo podría demostrarse que se ha producido una integración satisfactoria mediante análisis que requerirían la destrucción de la célula germinal o su aplicación para crear un nuevo organismo.

Naturalmente, en el futuro también podría producirse tanto la necesidad médica como la posibilidad técnica de modificar la trayectoria germinal de forma selectiva, cuando se conozcan mejor la función del genoma humano, la realización técnica de las posibilidades y la seguridad de la manipulación genética. Corresponderá entonces a las generaciones futuras crear las condiciones éticas del entorno y las disposiciones legales necesarias para ello.

Otro método para aumentar la seguridad de la terapia génica *in utero* podría basarse en la utilización de células madre fetales autólogas modificadas genéticamente, como por ejemplo las que se pueden obtener mediante biopsia de las células hepáticas a partir de la tercera semana de embarazo. Este método terapéutico *ex vivo* permitiría utilizar una dosis menor de vectores y evitar la expansión del vector en el organismo fetal o materno. En un futuro se podría pensar incluso en una monitorización *ex vivo* y en la selección de células con variedades integradas impensables que no impliquen riesgos, y su expansión antes de reinfundirlas para poder descartar variedades integradas oncógenas.

Antes de poder considerar una aplicación clínica tienen que seguir investigándose exhaustivamente todos estos factores de riesgo, excluyendo cuidadosamente los abortos y realizando estudios postnatales de larga duración en animales tratados *in utero*.

¿Qué aspectos psicológicos podrían hacer que unos futuros padres que se enfrentan al diagnóstico de una enfermedad genética grave en el feto se decidiesen por una terapia génica *in utero* en lugar de interrumpir el embarazo o aceptar un niño enfermo?

Aunque suponemos que existe una necesidad de encontrar una solución terapéutica/preventiva al problema, también vemos con claridad que probablemente pocas familias afectadas estarán dispuestas a elegir ésta como la primera opción, aunque en experimentos con animales se demuestre su seguridad y efectividad. Se exige a la terapia génica que evite la enfermedad de forma muy segura y no provoque daños colaterales. Por estos motivos, está sujeta a criterios de indicación y a estándares de seguridad médicos todavía más estrictos que la mayoría de las aplicaciones postnatales de la terapia génica.

La introducción clínica de la terapia génica fetal requerirá una amplia aceptación. En el mejor de los casos, nuestros conocimientos sobre las perspectivas en la población o en los pacientes afectados y sus familias se basan actualmente en referencias. Por consiguiente, sería imprescindible que los estudios clínicos contuviesen peticiones de pacientes/familias, empleados de las autoridades sanitarias y de la población general, de aclarar detalladamente los objetivos, posibilidades y límites de este nuevo tipo de proceso preventivo de terapia génica. Esto debería contribuir a transmitir la información necesaria, a conocer los miedos y las dudas, y a crear la base científica para evaluaciones racionales de riesgos/beneficios.



Charles Coutelle es profesor en el *Imperial College* de Londres.

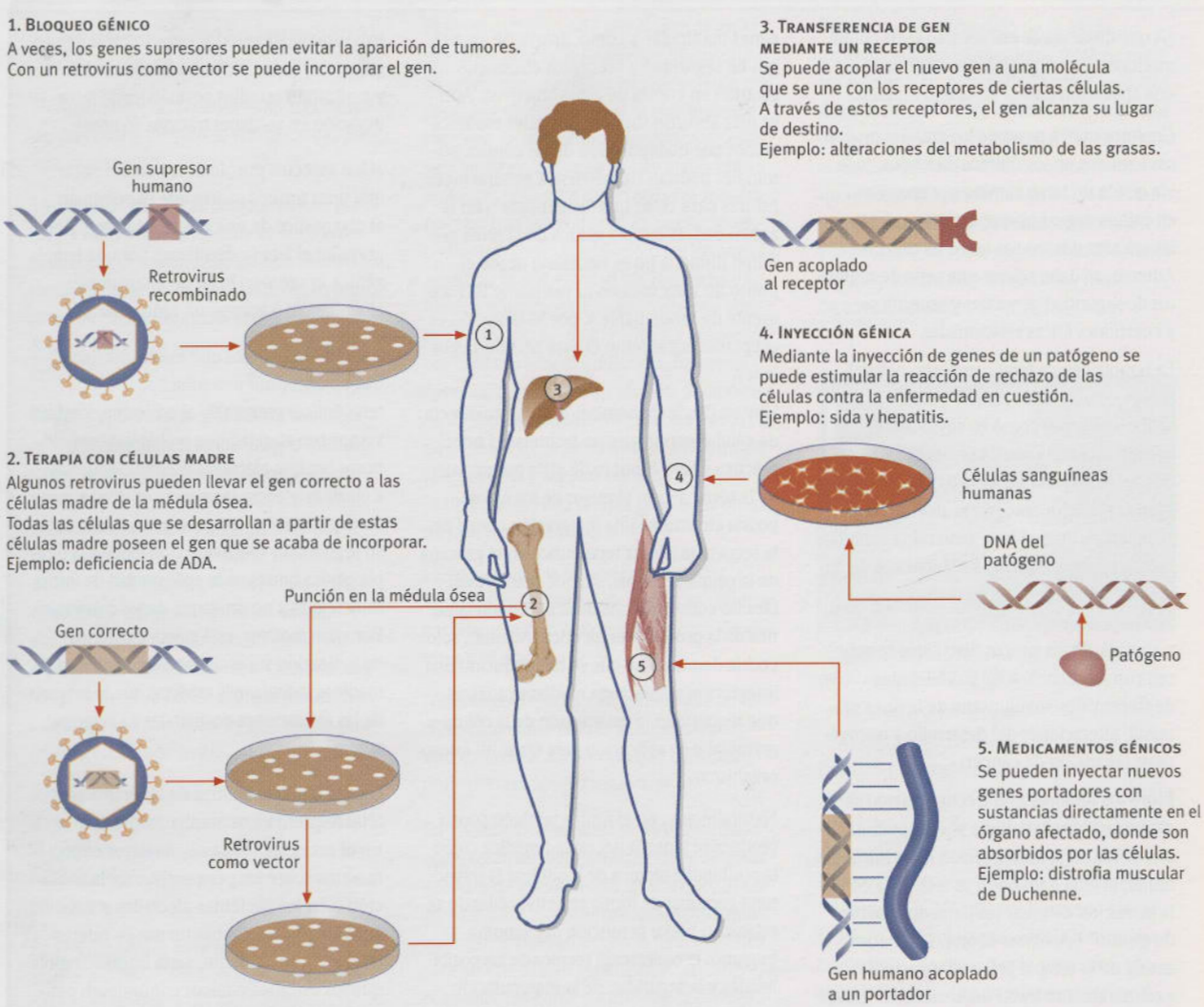


Fig. 9.24 Cinco posibilidades de terapia génica.

Entretanto, hay nueve equipos de investigadores alemanes autorizados a trabajar con estas células. En Gran Bretaña y Corea del Sur está expresamente autorizada la clonación terapéutica, y también en Estados Unidos, donde sin embargo la clonación de embriones no se promueve con subvenciones estatales.

9.14 Terapia génica

Una prueba viviente de que hoy todavía pueden suceder milagros, dijo el presidente de la Comisión Científica de la Cámara de Representantes estadounidense, George Brown, es la historia de la pequeña Ashanti de Silva. En septiembre de 1995 se presentó frente a la Comisión con gran resonancia mediática. Cuando tenía dos años, el 14 de septiembre de 1990, recibió la primera terapia génica de la historia. Padecía una inmunodeficiencia extrema y tenía que crecer en las habitaciones estériles de un hospital; era lo que se conoce como *Bubble Baby* (bebé burbuja). Una simple gripe la habría matado. Le faltaba un único gen, era portadora del **síndrome ADA** (adenosina-desaminasa). Los glóbulos blancos necesitan la proteína ADA para crecer y dividirse. Sin este producto genético, al paciente le falta una gran parte de su sistema inmunitario. Sin embargo, la enfermedad se puede tratar administrando ADA. En todo el mundo sólo existen unos cien pacientes. El tratamiento es extremadamente caro, asciende a unos 40 000 dólares americanos al mes.

En un experimento *ex vivo* (fuera del cuerpo), a Ashanti se le transfundieron linfocitos T propios, a los cuales previamente se había transferido el gen ADA intacto (Fig. 9.25).

El resultado fue espectacular: poco después, la paciente salió del hospital y pudo asistir con normalidad a la escuela. Aproximadamente la mitad de sus corpúsculos sanguíneos contenía el nuevo gen ADA. Esto fue un arranque estupendo para la terapia génica.

Sin embargo, aún estamos a años luz de una terapia estándar para esta enfermedad tan poco frecuente. El del ADA fue un caso relativamente fácil: sólo se trataba de sustituir un gen defectuoso por su variante natural. En otros tipos de enfermedades, como el cáncer, hay que sustituir muchos genes que faltan o que han mutado. El cáncer se produce como un proceso de varias etapas con varios genes mutados. En última instancia, todos los genes afectados se han modificado y fallan. Esto ocurre a raíz de una acumulación de "casualidades" desafortunadas o "accidentes de DNA".

No obstante, también hay predisposiciones familiares, es decir, genéticas, para contraer cáncer. Napoleón murió, al igual que su padre, su abuelo y sus tres hermanos, de cáncer de estómago. El cáncer de mama también se produce ocasionalmente en casos múltiples en familias. Los causantes de ello son los genes *brca1* y *brca2*. Aun cuando sólo falle uno de los genes, el gen *brca1*, aumenta el riesgo de contraer cáncer.

Todavía no existen terapias génicas contra el cáncer debido a la gran cantidad de etapas de aparición de la enfermedad. Aún no se puede influir sobre tantos genes al mismo tiempo. La máxima aproximación al objetivo alcanzada consiste en reforzar el sistema inmunitario y las enzimas reparadoras.

El *quid* de la cuestión es el desarrollo de procesos efectivos para introducir los genes en las células. Hasta ahora se habían utilizado retrovirus inofensivos (virus con una sola hebra de RNA) como **vehículos genéticos** (Fig. 9.12). Los retrovirus integran su propio material hereditario en la célula infectada. La idea de un vehículo genético es seductora; sin embargo, aún no se puede controlar bien.

Se prueban vehículos genéticos nuevos, y obviamente se ha superado el punto débil de los primeros disparos rápidos. Los **vectores genéticos** deben poder inyectarse directamente en el paciente, deberían introducirse en un lugar seguro del cromosoma o sustituir directamente al gen defectuoso.

Finalmente, el nuevo gen debe reaccionar a cambios fisiológicos, es decir, para un diabético tiene que reaccionar ante valores de glucosa elevados o bajos, como si se tratara de un gen natural. De modo que la terapia génica moderna (Fig. 9.25 y Cuadro 9.6) no es más que una forma de aplicación moderna de un medicamento. Con el RNA de interferencia, RNAi, aparece una terapia génica alternativa.

9.15 ¿Diamantes en la basura? El RNAi, el RNA que interfiere

Además de la genómica funcional o el estudio del proteoma (Cap. 10), en las biociencias una nueva tecnología está conquistando el mercado actual: el **RNA de interferencia (RNAi)**. Por primera vez se pueden desconectar genes individuales de forma muy efectiva y más rápidamente que con cualquier otro procedimiento. Además, la formación de proteínas de los genes vecinos no se ve entorpecida. Por primera vez es posible determinar a gran escala las funciones de los genes silenciándolos (*silencing*) y, de este modo, obtener ventajas de los proyectos genómicos (Cap. 10) a partir de las secuencias extraídas de DNA.

Según estimaciones de los expertos, las tecnologías de RNAi son aproximadamente un 80% más baratas que crear **ratones *knock out*** (Cap. 8), los cuales se habían utilizado hasta ahora para determinar la función genética. Cada gen puede investigarse con la ayuda de la tecnología RNAi; el RNAi abre perspectivas completamente nuevas a la investigación postgenómica. Sin embargo, también presenta todas las características clave que se podrían esperar de un fármaco para secuencias específicas.

Con la tecnología RNAi se explora el material hereditario de organismos modelo y del ser humano para encontrar nuevas dianas para los medicamentos, que se venderán validados a la industria farmacéutica.

No se podrá contar con la autorización de los primeros principios activos antes del año 2008. Las bases correspondientes las sentaron hace unos años **Andrew Fire** y **Craig Mello** con los trabajos de investigación en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Por primera vez describieron una nueva tecnología que permite, con la ayuda de unas pocas moléculas de RNA de dos hebras (**RNAds**), evitar la formación selectiva de ciertas proteínas en las células vivas.

Para ello, una hebra del RNAds solamente debía tener la misma secuencia de bases que el gen codificador de la proteína que debe silenciarse. No obstante, los RNAds no impiden la lectura del gen, sino que conectan un mecanismo propio de las células, el cual daña el RNAm leído por el gen e impide así la formación de la correspondiente proteína (*Post-Transcriptional Gene Silencing*, PTGS).

Se desencadena la degradación selectiva del RNAm mediante moléculas de RNA de doble hebra (***RNAsi***, *small inferfering RNA*), que son homólogas a las del RNAm, y cuya traducción a proteína debe evitarse: una de las hebras de RNAsi –la llamada hebra *antisense*– se une con el complejo proteínico celu-



Fig. 9.25 Cómo se realiza la terapia génica para una deficiencia de ADA.



Fig. 9.26 Thomas Tuschl, pionero del RNAi.

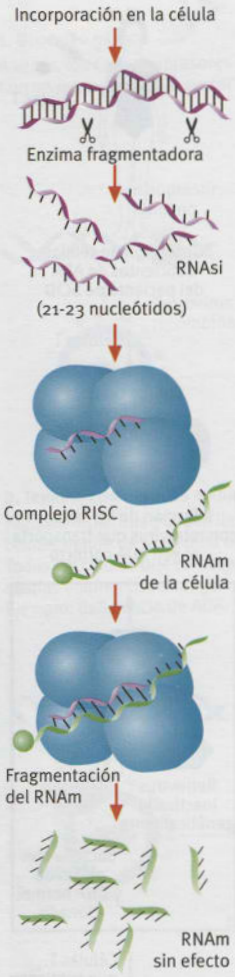


Fig. 9.27 Proceso hipotético de la interferencia del RNA. No está claro si los fragmentos cortos de RNA son de una o de dos hebras.

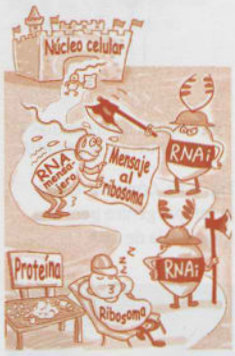


Fig. 9.28 Los detalles del RNA de interferencia todavía no están claros. Sin embargo, lo que sí está claro es que los biólogos moleculares han subestimado por completo el papel de los fragmentos cortos de RNA en la célula. ¡Parecen tener un gran potencial!

lar propio, el "RISC" y con el RNAm destino. En éste, una nucleasa se ocupa de la degradación específica secuencial del RNAm y de proseguir con la expresión de la proteína (Fig. 9.27).

Los experimentos para silenciar genes de mamíferos interesantes para el desarrollo de medicamentos con RNAds más largos (más de 50 componentes de RNA) fracasaron hasta hace pocos años debido a la respuesta del interferón –la reacción inmunitaria contra las infecciones virales, para la cual las células de los mamíferos detienen la formación de proteínas y degradan el RNAm de forma no específica (ver más arriba en este Capítulo).

Posteriormente, en el año 2001, el científico alemán **Thomas Tuschl** (*Fig.* 9.26) hizo el descubrimiento: Tuschl, que en aquel entonces trabajaba en el Instituto Max Planck de química biofísica, encontró el secreto.

En las moléculas de RNA cortas, de sólo 21 a 23 componentes, Tuschl hizo un descubrimiento. Precisamente en aquel 98,5% del material hereditario descubrió "diamantes" que se consideraban como "junk" (basura). Después de extraer aquellos pedacitos logró inhibir RNAm en el núcleo celular de forma efectiva. Tuschl reconoció de inmediato el potencial de su descubrimiento. Con la ayuda del RNAsi, por primera vez se pudieron desconectar genes a voluntad en las células de los mamíferos –aunque en un principio sólo en cultivos celulares.

Con los RNAsi sintetizados artificialmente y compuestos de 21 a 23 nucleótidos, su equipo silenció por primera vez genes de mamíferos sin desencadenar la **respuesta al interferón** que interfería en el proceso. Desde entonces, los investigadores anuncian un éxito tras otro –por ejemplo, en la inhibición selectiva de diversos genes del VIH y para combatir los virus de la gripe y de la hepatitis C.

Si bien los investigadores ya sabían, por lo menos desde 1998, que los genes se podían inhibir con la ayuda de moléculas de RNA, no estaba claro cómo funcionaba este mecanismo, al que se denominó **RNA de interferencia (RNAi).**

Dos años más tarde, el RNAsi ya se utilizaba en laboratorios de todo el mundo. Entretanto, con hebras de RNA artificiales y hechas a medida se está probando la función de los genes de modo secuencial –en un plazo de semanas, ya no de años. Además, no se investigan genes aislados como antes, sino cientos de ellos al mismo tiempo.

El método de Tuschl no sólo amplía el repertorio de los investigadores básicos, quienes por este método pueden desentrañar la función de aproximadamente 30 000 genes del material hereditario humano. También las grandes empresas farmacéuticas tienen interés en esta técnica. Los genes son un punto de partida importante para los fármacos. Hay aproximadamente 5000 genes humanos que son interesantes para los medicamentos, y se espera encontrarlos con la ayuda de las hebras "cortas" de RNA.

Sin embargo, el RNAsi también se puede utilizar como medicamento. Si se identifica un gen descarriado mediante el RNAsi, se tratará de suprimirlo terapéuticamente con el correspondiente RNAm. Exactamente esto era lo que pretendían los científicos desde hace 30 años con la llamada **técnica *antisense*** (Cap. 7 en el tomate "antifofo"). No obstante, los científicos lo habían intentado con fragmentos de RNA demasiado largos. Ante éstos, los núcleos celulares reaccionaban de forma alérgica porque tal vez se podía tratar también de material hereditario destructivo de los virus. Por consiguiente, el aparato celular cogía al intruso y lo aniquilaba. Sólo hay una posibilidad de anular este "sistema inmunitario del núcleo celular": el RNA debe ser diminuto, no debe tener más de 21 a 23 componentes, dado que con esta longitud puede nadar hacia el núcleo celular y de modo natural controla, entre otras cosas, si se ha leído un gen y con qué frecuencia. Las pequeñas moléculas de Tuschl inhibían la producción de proteínas de forma mil veces más eficaz que la vieja técnica *antisense*.

La lista de posibles **campos de aplicación** incluye el reuma, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el cáncer, las enfermedades metabólicas y autoinmunitarias, así como las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el camino hacia la utilización en laboratorios clínicos es largo. La mayor dificultad de la terapia RNAsi es la siguiente: ¿cómo se introducen las moléculas frágiles en los núcleos celulares, en los que deben actuar? En la circulación sanguínea, la sustancia es sensible a ataques y se degrada rápidamente mediante las enzimas. Algunos investigadores la envuelven en liposomas, otros transportan las moléculas con virus a los núcleos celulares o lo intentan con RNAsi puro que se ha estabilizado químicamente.

Tal vez se solucione también el siguiente acertijo: tenemos ocho veces más genes que la bacteria *Escherichia coli*, pero seguro que genéticamente somos mil veces más complejos. ¿Son los pequeños RNA y todos los genes que no se pueden transformar directamente en proteínas los auténticos dueños del núcleo celular y los encargados del motor de la evolución? Este control tan inteligente podría explicar la gran flexibilidad del metabolismo de los organismos superiores.

Bibliografía utilizada y aplicada

- Una visión general de la biotecnología farmacéutica:
  Kayser O, Müller RH (2004) Pharmaceutical Biotechnology. Wiley-VCH, Weinheim
- El estado actual de los conocimientos, pero difícil para principiantes:
  Primrose S B, Twyman R M (2004) Genomics. Applications in Human Biology. Blackwell Publishing, Malden
- Información completa:
  Dingermann T (1999) Gentechnik, Biotechnik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Buenas bases detalladas, pero un poco complicado para principiantes:
  Wink M (2004) Molekulare Biotechnologie, Konzepte und Methoden. Wiley-VCH, Weinheim
- Del jefe del DFG, antiguo pero fácilmente legible:
  Winnacker E-L (1999) Das Genom. Eichborn, Frankfurt/M.
- Introducción centrada en la biotecnología médica, con consejos para la carrera:
  Thiemann WJ, Palladino MA (2004) Introduction to Biotechnology. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco
- El clásico alemán de biotecnología:
  Dellweg H (1987) Biotechnologie. VCH, Weinheim
- La "biblia de bolsillo" de la biotecnología:
  Schmid R D (2002) Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik. Wiley-VCH, Weinheim
- Antiguo pero bueno, una introducción adecuada:
  Gruss P, Herrmann R, Klein A, Schaller H (Hrsg.) (1987) Industrielle Mikrobiologie. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg

Enlaces de web

- Enzima de vampiro contra la embolia, de la empresa PAION AG:
  www.paion.de
- Página web de medicina en alemán: *www.m-ww.de*
- El taxol y su síntesis:
  www.bris.ac.uk/Depts/Chemistry/MOTM/taxol/taxol.htm
- Biorreactores de células vegetales en Hamburgo para el taxol:
  www.phytonbiotech.com/technology.html
- Información del Secretariado de Información sobre Biotecnología alemán:
  www.i-s-b.org
- Buscador de biotecnología en Internet: *www.biotechfind.com*
- En relación con la investigación con células madre, del periódico *Die Zeit*, vale la pena leerlo:
  www.zeit.de/wissen/stammzellen/index
- Página web crítica sobre las células madre:
  http://cloning.ch/cloning/stammzellen.html
- La historia de Tom Tuschl, de Harro Albrecht, en el periódico *Die Zeit*:
  www.zeit.de/2004/48/M-Small_RNA

Ocho preguntas de autoevaluación

1. ¿Qué hace el médico de urgencia en caso de infarto de miocardio agudo y qué marcador bioquímico penetra más rápidamente en la sangre, el FABP o la troponina?
2. ¿Cómo podría ayudar el conde Drácula (en teoría) si se produce una embolia?
3. ¿Se eliminan realmente las arrugas con el EGF? ¿Existen aplicaciones más adecuadas?
4. ¿Debería limitarse la investigación con células madre? ¿Se pueden utilizar de forma inadecuada?
5. ¿Cómo aprovechan algunos deportistas los descubrimientos de la biotecnología para aumentar su rendimiento?
6. ¿Cómo se puede suministrar un medicamento absolutamente seguro a un hemofílico?
7. ¿De qué forma salvan a los enfermos de cáncer los tejos del Pacífico?
8. ¿Qué es el RNA de interferencia y cómo puede utilizarse para silenciar genes?

BIOTECNOLOGÍA ANALÍTICA Y GENOMA HUMANO

10.1 Pruebas enzimáticas para millones de diabéticos 254

10.2 Biosensores 254

10.3 Sensores microbianos: las levaduras miden la carga de los vertidos en cinco minutos 256

10.4 Prueba inmunológica del embarazo 257

10.5 Pruebas del sida 258

10.6 Pruebas para el infarto de miocardio 259

10.7 Pruebas *Point-of-Care* (POC) 260

10.8 Cómo se analiza el DNA: la electroforesis en gel separa los fragmentos de DNA según su tamaño 260

10.9 Vida y muerte: huellas dactilares genéticas para aclarar la paternidad y el asesinato 261

10.10 Marcadores de DNA: breves repeticiones en tándem y SNP 263

10.11 La reacción en cadena de la polimerasa: el copiador de DNA 264

10.12 ¿Se despertará a los saurios y al mamut a una nueva vida? 265

10.13 Cómo se secuencian los genes 268

10.14 *Southern Blotting* 268

10.15 Secuenciación automática de DNA 269

10.16 FISH: localización en cromosomas y cantidad de copias genéticas 270

10.17 La coronación de la biotecnología: el proyecto del genoma humano 273

10.18 Mapas genómicos genéticos 274

10.19 Mapas genómicos físicos 274

10.20 La lucha de los métodos: Contig contra escopeta 275

10.21 ¿Cómo se continúa con el genoma humano? 276

10.22 ¿Cómo se puede entender la secuencia genómica? 278

10.23 La farmacogenómica 279

10.24 Chips de DNA 280

10.25 Descubrir las causas de las enfermedades: perfiles de expresión genética 281

10.26 La proteómica 281

10.27 MALDI: Un gas de iones de proteínas 282

10.28 Aptámeros y chips de proteína 282

10.29 ¿Finalmente el control a través del genoma humano? 283

10.30 *¿Quo vadis* biotecnología? 283



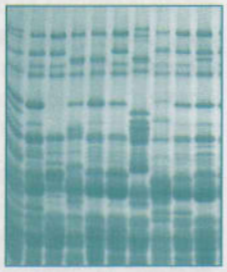




















Fig. 10.1 Una mala alimentación y la falta de ejercicio son las causas principales del sobrepeso y la diabetes.



Fig. 10.2 Cómo la GOD identifica, une y transforma la glucosa de una mezcla de azúcares (detalladamente en Cap. 2).



Fig. 10.3 La GOD es una glicoproteína dimérica (aquí no se representan las cadenas de azúcares). La flavina adenina dinucleótido (FAD, en rojo) absorbe en el centro activo dos electrones de la glucosa y los transfiere al oxígeno. El oxígeno (O_2) reducido une dos protones (H^+) del agua y se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La glucosa se reduce a gluconolactona, la cual reacciona con agua para formar ácido glucónico.

10.1 Pruebas enzimáticas para millones de diabéticos

Con el descubrimiento de las enzimas se cumplió el antiguo sueño de realizar un diagnóstico exacto a partir de los fluidos corporales. Partiendo de una mezcla de cientos de sustancias tal como se hallan en la sangre o la orina, se puede detectar de forma selectiva y específica cada una las sustancias, como la β-D-**glucosa** en la **diabetes**. Por ejemplo, esto puede llevarse a cabo con la **glucosa deshidrogenasa** (GDH). La GDH convierte la glucosa con el cofactor nicotinamida-adenina-dinucleótido (NAD^+) en gluconolactona y reduce el NAD^+ a NADH (+ H^+). El NADH se puede determinar fácilmente en el fotómetro con la prueba óptica de Otto Warburg (Cap. 2) para una longitud de onda de 340 nm. Por el contrario, el NAD^+ no absorbe la luz a esta longitud de onda.

Otra enzima, también una oxidorreductasa, es la **glucosa oxidasa (GOD**, Figs. 10.2 y 10.3). La GOD reduce el oxígeno con los electrones de la glucosa para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2). A partir de una mezcla de azúcares, sólo transforma la β-D-glucosa. Por tanto, si se detecta H_2O_2 tras añadir GOD en una mezcla (sangre, suero, orina), eso significa que hay glucosa presente. Cuanto más H_2O_2 se encuentre (para la misma cantidad de enzima), más cantidad de glucosa habrá. Con disoluciones de una concentración conocida de glucosa se elaborará una curva patrón (calibración), a partir de la cual se puede leer la concentración de la mezcla investigada. Para ello, actualmente existen aparatos **biosensores** de bolsillo que puede utilizar cada diabético por sí solo (Fig. 10.12).

Aproximadamente un 8% de la población alemana sufre diabetes. La diabetes *mellitus* ("flujo de miel" o enfermedad del azúcar) es una enfermedad del metabolismo en la que aumenta constantemente el nivel de azúcar en la sangre. Cuando hay demasiada glucosa en la sangre, los riñones ya no pueden filtrarla y se excreta abundante glucosa con la orina.

La causa de la diabetes es una carencia o una alteración de la hormona **insulina** (Cap. 3), que se forma en el páncreas. La insulina reduce el azúcar de la sangre incorporando la glucosa en las células. La hormona se integra al mismo tiempo en el metabolismo de las grasas y de las proteínas, por lo que cuando hay una carencia no se produce una alteración del consumo de azúcar.

El **nivel de azúcar en la sangre** normal se halla entre 60 y 110 mg/dL, e incluso después de las comidas no aumenta por encima de los 140 mg/dL. Sin embargo, en los diabéticos, incluso en ayunas asciende a más de 126 mg/dL y después de las comidas alcanza valores de 200 mg/dL y superiores.

En la **diabetes tipo I** falta insulina debido a una alteración de las células que la producen en el páncreas. Probablemente la causa sea una reacción autoinmunitaria previa por la que el cuerpo ataca a sus propias células y las destruye. No está clara la causa de que se desencadene de repente esta reacción inmunitaria. Se ha propuesto, por ejemplo, una infección viral de la infancia. Los factores genéticos también influyen: el 20% de los enfermos tienen parientes con diabetes tipo I.

Si bien los "diabéticos por la edad"(**diabetes tipo II**) (Fig. 10.1) producen en principio suficiente insulina, el efecto de la hormona en el cuerpo desciende (resistencia a la insulina): los receptores de la insulina se hacen cada vez más insensibles. Con ello penetra menos glucosa en las células y la concentración de ésta en la sangre aumenta. Esto hace que el páncreas expulse aún más insulina para rebajar la concentración de azúcar en la sangre –con la consecuencia de que la cantidad de receptores en las células se reduce y la reacción a la insulina sigue disminuyendo. Debido a una sobreproducción constante de insulina se origina una fatiga de las células β y finalmente la deficiencia de insulina.

Normalmente, cuando se diagnostica la diabetes tipo II ya hace mucho tiempo que ha aparecido. Los puntos de partida para sospechar la existencia de diabetes *mellitus* son poco característicos: los síntomas generales, como cansancio, disminución del rendimiento, hambre feroz, pérdida de peso, sudoración y dolores de cabeza, por sí solos no conducen al diagnóstico. ¡Aquí son importantes las **pruebas bioanalíticas**! Más de la mitad de los diabéticos no sabe nada de su enfermedad. Si no se trata, la diabetes puede provocar daños colaterales catastróficos: la diabetes *mellitus* es la causa, en Alemania, de unas 30 000 embolias anuales, 3000 casos de ceguera y 35 000 infartos de miocardio. Los riñones también corren peligro: 3000 pacientes deben someterse a diálisis. Además, aproximadamente un 70% de todas las amputaciones de pies y piernas se deben a la diabetes (Cap. 9, EGF).

10.2 Biosensores

¿Cómo se mide la glucosa rápidamente y de forma exacta? ¡Con biosensores! Los pioneros fueron, 600 años después de la primera referencia literaria de un "biosensor de glucosa" por **Giovanni Boccaccio**

(Fig. 10.6), los americanos **Leland Clark Jr.** y **George Wilson**, el japonés **Isao Karube**, el británico **Anthony P.F. Turner** y el alemán **Frieder W. Scheller** (Fig. 10.9).

La idea básica de los biosensores es realizar un acoplamiento directo (**inmovilización**, Cap. 2) de biomoléculas (enzimas, anticuerpos) o células con sensores (electrodos o sensores ópticos). Mediante el **acoplamiento directo**, el analito (por ejemplo la glucosa) se convierte, mediante los biocomponentes (por ejemplo la GOD), en una señal bioquímica (por ejemplo H_2O_2) (Fig. 10.8), la cual llega de inmediato al sensor. Allí se convierte en una señal electrónica (corriente) y se manifiesta mediante un amplificador.

El biocomponente inmovilizado se **regenera después de su uso.** Por ejemplo, en los análisis de sangre con sensores de glucosa, con la misma GOD se puede medir la glucosa aproximadamente 10 000 veces. Para los laboratorios clínicos, la posibilidad de reutilizar el biosensor era prioritaria. Hay cientos de análisis de pacientes por hacer de forma rentable y rápida (Fig. 10.10).

Por el contrario, los **sensores unitarios** ("de usar y tirar", Fig. 10.12) son ideales para el autoanálisis del diabético, sobre todo porque también protegen contra infecciones (VIH, hepatitis). El "biochip" sólo se utiliza una vez y luego se desecha. Con frecuencia el diabético recibe el aparato medidor electrónico como regalo de una compañía (con el fin de "captar un cliente"), pero debe comprar siempre los "biochips" a ésta.

La mayoría de los biosensores de glucosa utilizan una enzima especial procedente de un moho (*Aspergillus*), la **glucosa oxidasa** (**GOD**). La SGOD sólo une β-D-glucosa y oxígeno, y en fracciones de segundo los convierte en ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Fig. 10.2). El principio de la medición de la glucosa es el siguiente: cuanta más glucosa haya en la muestra, más producto se formará y más oxígeno se consumirá. Se mide la cantidad de producto mediante ensayos de coloración, tiras de análisis y sensores de glucosa modernos.

Con los sensores de glucosa se desarrolló la **primera generación de "biochips".** Por primera vez se unieron dos altas tecnologías, la microelectrónica y la biotecnología: electrónica y proteínas.

Normalmente, para evitar infecciones (VIH, hepatitis) los medidores de glucosa portátiles y económicos utilizan "chips" de un solo uso (Fig. 10.12). En ellos se encuentra GOD seca absorbida mediante un sistema de impresión (*screen-printing*) (o sea, se inmoviliza; Cap. 2). En este caso no es necesario realizar una inmovilización permanente como en los sensores reutilizables, ya que los "chips" sólo se utilizan una vez.

El diabético introduce un "biochip" en el aparato (Fig. 10.12), luego realiza una punción en la yema del dedo (o en el antebrazo, según el aparato) con una lanceta automática (empaquetada de modo estéril) y la gota de sangre diminuta es aspirada por capilaridad hacia el interior del "biochip". Allí se activa la GOD (por la sangre) y convierte la glucosa en pocos segundos. La glucosa también se une y transfiere electrones a una sustancia auxiliar, un **mediador** (por ejemplo el ferroceno) (Fig. 10.7).

La ventaja de los mediadores consiste en que el sensor ya no depende del oxígeno. En una gota de sangre es difícil ajustar la **concentración de oxígeno.** La enzima prefiere ahora el mediador en lugar del cosustrato natural oxígeno. Dos moléculas de ferroceno ceden un electrón cada una, a través del centro activo de la GOD (flavina-adenina-dinucleótido, FAD), reducido por una molécula de glucosa. El ferricinio se difunde desde la GOD y alcanza el electrodo (Fig. 10.7). Allí transfiere los electrones al sensor del "chip" y emite una señal eléctrica. La pantalla del aparato indica finalmente la intensidad de corriente convertida en concentración de glucosa.

Posteriormente llegaron otros biosensores. Un **sensor de lactato** mide en la actualidad la forma física de los deportistas y de los caballos de carreras. En Hong Kong se determinaron los valores de **glucosa** y **lactato** con sensores de enzimas antes y después de una carrera de tres a cinco minutos de duración. El lactato aumenta rápidamente cuando los músculos no tienen suficiente oxígeno, la glu-

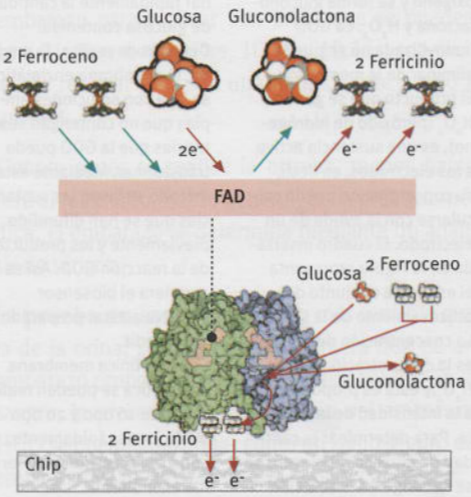




Fig. 10.4 Claudius Galenus de Pérgamo (129-199), junto con Hipócrates el médico más importante de la Antigüedad, elaboró la antigua teoría de los cuatro humores.



Fig. 10.5 En el experimento, las mariposas tropicales detectan cuál es la orina cuyo sabor es más dulce que la de control normal.



Fig. 10.6 Giovanni Boccaccio (1313-1375) escribió, entre 1348 y 1353, el *Decamerón* (impreso en 1470, después de su muerte), y en él describió el primer "biosensor" para determinar la glucosa en la orina: la lengua del médico al cual se llamó para visitar a una paciente hermosa.

Fig. 10.7 Chip unitario para la glucosa. En el centro activo de la GOD absorbida en el chip, la glucosa se une a la flavina adenina dinucleótido (FAD) y mediante ella capta dos electrones de dos moléculas mediadoras pequeñas (ferroceno), que salen de este modo del centro activo en forma oxidada (ferricinio). Se difunden por la superficie del chip y allí ceden los electrones. La intensidad de la corriente es proporcional a la cantidad de electrones transferidos, y éstos son proporcionales a la concentración del mediador y, en última instancia, de la glucosa.

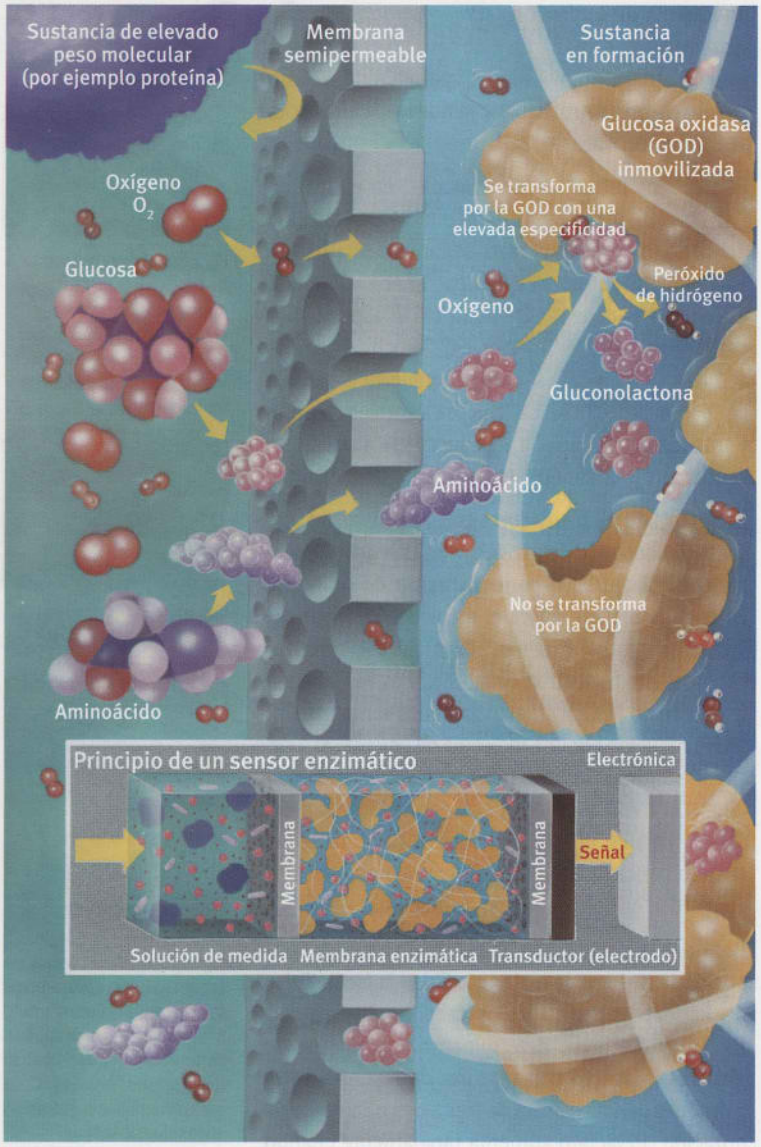


Fig. 10.8 Sensor enzimático reutilizable para glucosa. Los sensores clínicos que pueden realizar miles de medidas con la misma enzima (Figs. 10.10 y 10.11) constan de un sensor (electrodo) recubierto de una membrana enzimática delgada de glucosa oxidasa inmovilizada (GOD). La GOD se introduce en geles de poliuretano (derecha). A partir de una mezcla de la muestra (izquierda), tan sólo las moléculas de bajo peso molecular y el oxígeno (en rojo) se difunden a través de los poros de la membrana de diálisis (centro) en el gel (azul claro). Los analitos de elevado peso molecular o los microbios (arriba, a la izquierda) no pueden penetrar en la membrana. La GOD sólo convierte la β-D-glucosa consumiendo oxígeno y se forma gluconolactona y H_2O_2. La GOD inmovilizada no se puede eliminar de la membrana. El producto que se genera, H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), es una sustancia activa a los electrodos, es decir, su concentración puede calcularse con la ayuda de un electrodo. El cuadro insertado en la Figura representa el esquema conjunto del procesamiento de la señal. La concentración de glucosa es la concentración del H_2O_2, y ésta es proporcional a la intensidad de la corriente. Para determinar la cantidad de glucosa, el biosensor se sumerge en la solución a analizar. Gracias al peróxido de hidrógeno que se ha formado, se puede determinar rápidamente la cantidad de glucosa contenida. Después de realizar la medida, la membrana enzimática se lava con soluciones limpias que no contengan sustancias que la GOD pueda transformar. Mediante este método se lavan las sustancias que se han difundido previamente y los productos de la reacción GOD. Así se regenera el biosensor y vuelve a estar preparado para medir. Con una única membrana enzimática se pueden realizar entre 10 000 y 20 000 mediciones rápidamente, con gran precisión y de forma económica.

cosa se transforma anaeróbicamente (Cap. 1). Cuanto más entrenado está un caballo, menos lactato se produce. Naturalmente, el caballo "en mejor forma" no tiene por qué ser el ganador; el jinete se encarga de que el resultado no sea tan predecible.

Sin embargo, la medición de glucosa sigue siendo la aplicación más frecuente de los biosensores: el volumen del mercado de sensores de glucosa asciende aproximadamente a 300 millones de dólares en todo el mundo. Gracias a países en crecimiento, como China, el mercado se ampliará rápidamente.

10.3 Sensores microbianos: las levaduras miden la carga de los vertidos en cinco minutos

Los biosensores que utilizan microbios inmovilizados vivos –principalmente levaduras como *Trichosporon cutaneum* y *Arxula adeninivorans* (Cap. 1)– son importantes para controlar el medio ambiente y pueden medir de modo directo la **carga orgánica** de los vertidos. La levadura *Arxula* se monitorizó originariamente para un proyecto *single cell protein* en la Unión Soviética. La celulosa siberiana debía descomponerse con ácido y convertirse en hidratos de carbono. Luego se neutralizaba el ácido con una base. Se formaba sal en una concentración elevada. Entonces se buscó un microorganismo que consumiese hidratos de carbono ("el devoratodo") y que además fuese afín a la sal (halófilo).

Finalmente, el proyecto proteína unicelular-celulosa fracasó (Cap. 7), al igual que los proyectos petróleo-SCP, pero las levaduras eran idóneas para los sensores para vertidos. En los países tropicales con escasez de agua dulce y cercanos a la costa, los retretes utilizan agua de mar. Por consiguiente, las aguas residuales tienen un contenido de sal elevado, que deja inactivos a muchos microbios, pero no a *Arxula*.

La idea del sensor microbiano (Fig. 10.11) surgió de la medición tradicional de la llamada **demanda bioquímica de oxígeno** a los cinco días (**DBO_5**, en inglés BOD_5 por *Biochemical Oxygen Demand in five days*). La prueba comercial de la DBO_5 (Cuadro 6.2, Cap. 6) incuba muestras de vertidos con una mezcla de microbios durante cinco días a 20-25 °C y mide el contenido en oxígeno con un electrodo Clark antes y después de la incubación. Si el agua está limpia, los microbios aeróbicos no tienen nada que consumir ("¡no hay comida!"), se ponen "en espera" y no consumen oxígeno. Por consiguiente, el contenido en oxígeno después de los cinco días no ha cambiado.

Si, por el contrario, la muestra recibe muchas sustancias consumibles de forma aeróbica, los microbios se multiplicarán proporcionalmente a la "cantidad de comida" y agotarán el oxígeno. De este modo se puede calcular cuánto oxígeno se ha necesitado para consumir por completo las sustancias biodegradables en una muestra de vertidos –es decir, para obtener agua pura. En las instalaciones de vertidos en Alemania, el agua depurada no puede tener un valor DBO_5 superior a 20 mg O_2/L.

La prueba DBO precisa cinco días; por el contrario, el biosensor microbiano sólo necesita cinco minutos para realizar una medición. Las células vivas de levadura se inmovilizan en un gel polímero (como en el sensor de glucosa, Fig. 10.8) y se colocan en un electrodo de oxígeno (Fig. 10.13). El sensor mide entonces cuánto oxígeno consumen las células "hambrientas". Si se añade una muestra limpia de vertidos que, por lo tanto, no contiene sustancias consumibles, las levaduras tampoco absorben oxígeno adicional. Sin embargo, si se añade una muestra con "alimento" (hidratos de carbono, aminoácidos, ácidos grasos) las células se activarán, la absorberán y "respirarán". El consumo de oxígeno aumenta proporcionalmente a la "cantidad de alimento".

Tales sensores microbianos son ideales para **monitorizar** las instalaciones de vertidos. Indican la carga del agua de entrada y regulan las bombas de aire para la cuba de lodo activado. De este modo es posible ahorrar energía. Un biosensor a la salida de la instalación de depuración indica si el agua se ha depurado o no.

10.4 Prueba inmunológica del embarazo

Hacia el año 1600, las mujeres centroeuropeas estaban embarazadas una media de 20 veces durante su vida. Hoy en día, en los países industrializados disponemos de métodos anticonceptivos ("la píldora", Cap. 4) y de un diagnóstico rápido del embarazo.

Inyectar orina de las embarazadas a las ranas ("¡la rana ha dado positivo!") pertenece ya a la historia de la medicina. La **prueba de la rana** o la **prueba del sapo** (prueba de Galli-Mainini) era una verificación biológica de la existencia de embarazo. A una rana macho (o a un sapo macho) se le inyectaba en el saco linfático dorsal o de forma subcutánea orina o suero sanguíneo de un sujeto de prueba femenino. Si después de 24 horas se podían ver en el microscopio células seminales en la orina del batracio, eso significaba que la mujer (no la rana) estaba embarazada. Hasta los años 1960, la prueba de la rana o del sapo fue el método elegido para determinar el embarazo en una primera fase. El animal que servía para hacer la prueba, la llamada "rana del boticario" (casi siempre una rana africana con garras, Cap. 3), volvía a estar disponible para la siguiente prueba después de un tiempo para recuperarse. Además de las inyecciones, el "celibato" y el cautiverio, no tenía que sufrir otras torturas. En la actualidad se ha sustituido la prueba de la rana o del sapo por la **prueba inmunológica del embarazo**.

Aparte de la prueba enzimática de la glucosa, las pruebas inmunológicas del embarazo son las biopruebas que más se venden actualmente. Los anticuerpos identifican a la perfección, en sangre u orina, sustancias como la encargada de que se forme el cuerpo lúteo del embarazo, la **gonadotropina coriónica humana (HCG)**.

¿Qué cambios bioquímicos ocurren en un embarazo? En un plazo de seis días desde la fecundación el óvulo anida en la mucosa del útero. La anidación tiene como resultado una liberación enorme de hormonas en la futura madre y en el embrión. Una hormona que se produce muy rápidamente en la placenta es la gonadotropina coriónica humana. La HCG "rompe" el ciclo hormonal normal que, de lo contrario, culmina en la menstruación. Se produce tanta HCG que se halla en la sangre en una concentración extremadamente elevada, y se elimina por la orina a través de los riñones.

Por definición, la **orina** es un "fluido corporal eliminado voluntariamente en grandes cantidades" y, por consiguiente, se puede obtener con facilidad y –al contrario que las muestras de sangre– sin dolor, es decir, que es muy adecuada para los autotests. Hoy existen en las farmacias muchas pruebas de embarazo para realizar con orina que se pueden adquirir libremente (Figs. 10.14 y 10.15), son fáciles de realizar y tienen una fiabilidad de un 90 a un 98%.

Cuanto antes se realice la prueba, menos fiable será el resultado. Por lo general, en la práctica médica, el embarazo se determina mediante un análisis de sangre.

La **prueba en sangre** es mucho más sensible que la de la orina; por tanto, en la primera fase de un embarazo proporciona resultados más fiables. En la sangre, la presencia de la hormona del embarazo HCG se puede interpretar como un signo seguro de embarazo ya diez días después de la fecundación.



Fig. 10.9 En sus años mozos, el autor (segundo por la derecha) tuvo el privilegio y el placer de investigar como doctorando en el grupo de Frieder W. Scheller. Éste (a la izquierda, actualmente prorrector de la Universidad de Potsdam) inició su investigación de los biosensores después que los otros pioneros en el tema, en 1975, en Berlín-Buch, de Berlín Este. El trabajo se desarrolló en condiciones técnicas y materiales difíciles, y Scheller se adelantó a su tiempo: su grupo desarrolló el sensor de glucosa más rápido del mundo, el GKM-01.



Fig. 10.10 El producto más nuevo de BST, Bio Sensor Technologie GmbH de Berlín: un sensor de glucosa reutilizable en un aparato de la empresa ABT Advanced Bioanalytical Technology GmbH, el glucómetro 3000.

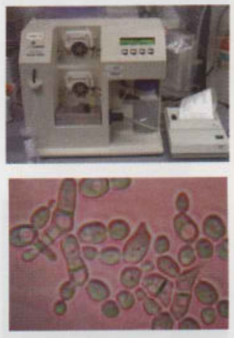


Fig. 10.11 Un sensor reutilizable para vertidos (arriba) que determina el valor DBO en sólo cinco minutos (en lugar de cinco días) con células de levadura inmovilizadas (abajo).





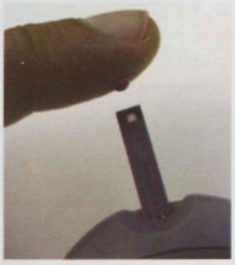




Fig. 10.12 Autotest de glucosa: cómo determina uno mismo la cantidad de glucosa de forma rápida y segura. Un valor de glucosa de 104 mg/dL (o de 5,6 mmol/dL) es normal.

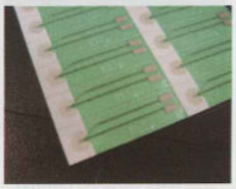


Fig. 10.13 Sensores para fabricar biosensores. Sensores impresos de densidad (empresa BioSensor Technologie, Berlín).

La prueba en orina muestra una raya coloreada como control (Fig. 10.14, "el test funciona") y una segunda raya coloreada decisiva: "¡Bebé en camino!". Cuando no aparece esta raya, no hay HCG en la orina y, en consecuencia, tampoco hay embarazo.

Aunque la prueba dura sólo un minuto, naturalmente no revela el embarazo ya el mismo día de la fecundación; en primer lugar, el embrión debe tener tiempo de anidar. La prueba sólo puede funcionar a partir del día en que se debería haber producido la menstruación.

La prueba del embarazo utiliza **anticuerpos monoclonales** (Cap. 5) para detectar la hormona. Éstos reconocen específicamente la hormona HCG que se forma en la placenta, sólo a ésta entre una mezcla de miles de sustancias. De forma similar a las enzimas, los anticuerpos "pescan" sustancias que se unen de forma exacta. En los anticuerpos, los "antígenos" adecuados se unen, pero no se transforman como los sustratos.

¿Cómo se puede visualizar si un anticuerpo ha encontrado el antígeno HCG?

En el inmunoanálisis enzimático (**ELISA**, por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; detalles en Cap. 5) se utilizan enzimas para formar un complejo de anticuerpos y antígenos. Esto es "química húmeda" y requiere aparatos lectores (*Reader*). Sin embargo, en el resultado de las pruebas se obtienen concentraciones exactas de antígenos.

En el caso de las **tiras de prueba** se obtiene un resultado rápido sin aparatos –una señal fiable **"Sí/No"** (no aproximadamente un "55% de estar embarazada"). Se añaden anticuerpos al extremo de una tira delgada de papel de filtro y ésta se deja secar. Los anticuerpos ya se habían unido previamente a bolitas de colores de látex (rojas, azules o verdes) o a oro coloidal. Se denominan **anticuerpos detectores** porque son portadores de un color detectable.

Cuando se moja el extremo de una hoja de papel secante en un líquido, éste sube por los poros y capilares del papel. Esta característica se puede aprovechar para la **inmunocromatografía**. Es decir, cuando el extremo de la tira de papel se moja en orina, ésta sube por el papel y empapa poco a poco toda la tira. El líquido transporta la HCG de la orina al anticuerpo detector "que está esperando".

HCG ··· Ac detector con bola de color

Éste se une con la HCG y empieza a desplazarse unido con ésta. Seguidamente, empieza a salir serpenteando un complejo por los poros del papel. En el centro de la tira se enlaza de forma fija a un anticuerpo "captador" y se marca como una raya en el papel. El "captador" también reconoce la HCG y "pesca" el complejo HCG-detector-colorante del líquido y lo sujeta con fuerza.

La unión tiene lugar mediante la HCG. Puesto que esta HCG se enlaza por ambas partes –por el captador y por el detector–, todo el conjunto recibe también el nombre de *sandwich*.

El complejo tiene el siguiente aspecto:

Papel ··· Ac captador ··· HCG ··· Ac detector con bola de color

Se forma una **raya de color** claramente visible. Si no hay HCG en la orina, naturalmente ésta no puede unirse con el complejo del detector-colorante. En tal caso, el detector se dirige sólo hacia el captador, el cual, sin embargo, no lo puede pescar porque le falta la HCG para formar el *sandwich*. A consecuencia de esto, tampoco aparece una raya de color. La **línea de control** indica si el test ha funcionado. Se une un segundo anticuerpo captador en el papel, el cual identifica también el anticuerpo detector incluso sin HCG. El control indica lo siguiente:

Papel ··· Ac captador para Ac detector ··· Ac detector con bola de color

Si el control no ha funcionado, el resultado de la prueba no es fiable.

10.5 Pruebas del sida

Imaginemos lo siguiente: ¡cada día se infectan 15 000 personas con un virus mortal! ¿Dónde quedan el pánico mundial y las acciones de ayuda? Entretanto, convivimos con el virus y su amenaza. Hay aproximadamente 40 millones de personas enfermas de **sida** (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) en el mundo entero (Cap. 5). En África hay 5,3 millones de personas seropositivas para el VIH (*Human Immune Deficiency Virus*), lo que corresponde a un 12% de la población. En Alemania hay aproximadamente 39 000 personas afectadas.

Lo "rastrero" del VIH es que ataca al sistema inmunitario protector. Cuando alguien se infecta con el VIH se activan, al igual que en otras infecciones, las defensas del cuerpo. Al contrario de otras infecciones, el cuerpo tarda al menos de cuatro a siete semanas en formar **anticuerpos** contra el virus. De este modo, el cuerpo "toca la corneta" para atacar a los intrusos. Se pueden detectar estos anticuerpos en la sangre de una persona infectada. Puesto que los primeros síntomas del sida a menudo son leves o inexistentes, se desarrollaron pruebas: una prueba

inmunológica para detectar los anticuerpos formados y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, ver más abajo) para detectar el RNA viral. La desventaja principal de la prueba inmunológica es que, previamente, el organismo tiene que haber producido anticuerpos para que la prueba pueda indicar una infección. Las infecciones nuevas no se detectan, eso sólo lo puede hacer la PCR. Hay otras pruebas de virus que funcionan de forma similar a la del sida, por ejemplo la de la **hepatitis B**. Además, existen tiras para pruebas "Sí/No", cada vez más fáciles de manejar, para todas estas enfermedades virales, las cuales son similares a la prueba del embarazo.

10.6 Pruebas para el infarto de miocardio

Un infarto cardiaco (infarto de miocardio agudo) comienza con malestar y una fuerte sensación de presión en el esternón; el dolor se irradia hacia el brazo izquierdo, aparece el miedo a morir y gotas de sudor frío en la frente. ¡Pero los síntomas de un infarto de miocardio no son siempre tan claros! Puede ocurrir que sólo se produzca malestar, y en las mujeres aparecen a menudo dolores de estómago. En aproximadamente el 40% de los infartos el **electrocardiograma** (ECG) no detecta un infarto agudo. En estos casos sirven de ayuda las pruebas inmunológicas rápidas.

En un infarto, el riego sanguíneo del corazón se ve reducido o completamente interrumpido por un coágulo de sangre (**trombo**). Las células cardiacas no reciben sustancias nutritivas ni oxígeno y empiezan a morir. Las células cardíacas que mueren liberan proteínas de sus células, las cuales van a la sangre. En los últimos años se han medido, sobre todo, enzimas del músculo cardiaco como la **creatina quinasa (CK)** y proteínas como diversas **troponinas**.

Estas proteínas, relativamente grandes, se denominan **marcadores tardíos**. Cuando estas proteínas aparecen en la sangre, ya ha sucedido: ¡por lo menos hace una hora que ha empezado a producirse el infarto de miocardio! La advertencia es buena, pero se produce demasiado tarde.

"**¡El tiempo salva al músculo cardiaco!**", dice el cardiólogo. Cuanto antes se disuelva el trombo, menos tejido cardiaco morirá. Si se inyecta la enzima fabricada por ingeniería genética, el coágulo de sangre se disuelve (activador tisular del plasminógeno, t-PA; Cap. 9), pero existe el peligro de hemorragia cerebral. El riesgo bajo, aunque existente, sólo se justifica cuando está muy claro que hay un infarto de miocardio. Por ese motivo se buscan febrilmente marcadores más rápidos.

El autor, con su equipo de investigadores de Hong Kong y dos compañías de Berlín-Buch, junto con Jan F.D. Glatz, de Maastricht (Holanda) (Fig. 10.16), está sobre la pista de un marcador de estas características desde principios de los años 1990, primero en Münster y ahora en Hong Kong: la proteína de unión de los ácidos grasos (*Fatty Acid-Binding Protein*, FABP) es una proteína muy pequeña (PM 15 000), la cual, por lo tanto, aparece en la sangre inmediatamente después de un infarto. Se detecta entre una y dos horas antes en la sangre que los marcadores "tardíos" de infarto, la creatina quinasa y la troponina T e I; es un **marcador temprano**.

La prueba del infarto de miocardio más rápida del mundo funciona de forma similar a la prueba del embarazo (ver arriba), excepto que aquí se introducen anticuerpos monoclonales contra la proteína de unión de los ácidos grasos del corazón. Éstos identifican la FABP en una mezcla de miles de sustancias en la sangre (Fig. 10.17).

¿Cómo se puede visualizar si un anticuerpo ha encontrado la FABP?

Se añade el anticuerpo –como en la prueba del embarazo– al extremo de una tira de papel de filtro delgada y se deja secar. En este caso, el anticuerpo no se une a partículas coloreadas de látex (como en la prueba del embarazo) sino a **partículas de oro coloidal**. Las partículas en solución dan un hermoso color rojo. Es decir, el anticuerpo "detector" está marcado en rojo. La tira para pruebas se halla en el interior de un plástico plano en forma de tarjeta de crédito (Fig. 10.16) y tiene una abertura (embudo) para absorber la sangre y una ventana para mostrar el resultado. Hay que pincharse el dedo (como en la prueba de la diabetes) con una lanceta estéril y echar tres gotas de sangre en el "embudo" de la prueba. El papel de filtro aspira la sangre hacia el interior por capilaridad. El líquido transporta entonces la FABP de la sangre al anticuerpo detector marcado con oro "que está en espera". Éste enlaza la FABP y empieza a desplazarse junto con ella –en ese momento se mueve todo el complejo

FABP···Ac detector con bola de oro roja

por los poros del papel.

En el centro de la tira hay un anticuerpo "captador" fijo, marcado de nuevo como una raya en el papel.

Papel ··· Ac captador

Este captador "pesca" el complejo FABP-anticuerpo detector-oro del líquido y lo sujeta firmemente. La unión se produce mediante la FABP como *sandwich* (Fig. 10.19).

Papel ··· Ac captador ··· FABP ··· Ac detector con bola de oro roja



Fig. 10.14 Prueba del embarazo en forma de autoanálisis en la clase de bioanalítica. La prueba de orina sólo indica una línea en la ventana (la línea de control); la segunda raya, correspondiente a la HCG, no aparece. Los estudiantes, divertidos, dijeron: "¡El profesor no está embarazado!"



Fig. 10.15 El ordenador *Persona®* (ordenador de ciclo hormonal) consta de un monitor y varillas para la prueba de la orina. *Persona®* analiza las varillas de prueba e indica cuáles son los días fértiles de una mujer.





Fig. 10.16 Arriba: Jan F.C. Glatz (Universidad de Maastricht, Holanda) descubrió el marcador de infarto de miocardio más rápido hasta la fecha, la FABP. Abajo: la "tarjeta de crédito que salva vidas" como prueba rápida (Rennesens GmbH, Berlín-Buch).





Fig. 10.17 La cinta se introduce en un envoltorio plano de plástico, como el de una tarjeta de crédito, con una abertura (embudo) para colocar la sangre y una ventana para indicar el resultado. Se pincha el dedo (como en la prueba de la diabetes) con una lanceta estéril. Tres gotas de sangre pura inician la autoprueba. Si el resultado no queda claro, se debería repetir aproximadamente media hora más tarde. La "tarjeta de crédito que salva vidas" cabe en cualquier cartera o bolso, en la ambulancia y en urgencias. Hay millones de diabéticos que tienen un riesgo medio de sufrir un infarto dos veces mayor que los no diabéticos. Éstos deberían llevar consigo la tarjeta de crédito que salva vidas. El médico puede entonces decidir más rápidamente e inyectar sin peligro enzimas que disuelven los trombos.

Se forma una **raya roja** claramente visible y, de este modo, se revela un **infarto.**

Si no hay FABP en la sangre, esta proteína tampoco se une con el detector marcado con oro. En tal caso, el detector se dirige solo hacia el captador, el cual, sin embargo, no lo puede captar porque falta la FABP para formar el *sandwich*. A consecuencia de esto, tampoco aparece ninguna raya roja. Una **línea de control** indica si el test ha funcionado. La prueba completa dura de 10 a 15 minutos. Esta prueba ya ha ayudado a los médicos a establecer diagnósticos exactos en periodos de tiempo adecuados para salvar vidas (Fig. 10.17).

10.7 Pruebas *Point-of-Care* (POC)

Hay nuevas pruebas inmunológicas a la vista, por ejemplo para medir el **riesgo** de sufrir un infarto de miocardio o una embolia. Para ello, hasta el momento sólo se habían medido sobre todo grasas en sangre. Actualmente, en algunas farmacias ya se puede determinar el **perfil de lípidos** en cinco minutos: antes, el valor del colesterol total era un parámetro importante. Pero ahora se sabe que un colesterol elevado no indica nada sobre el riesgo de arteriosclerosis. Para ello hay que medir diversas grasas en la sangre.

Hay que diferenciar entre los triglicéridos, el colesterol "bueno" HDL (*high density lipoprotein*), el colesterol "malo" LDL (*low density lipoprotein*) y las *very low density lipoprotein* (VLDL). La proporción definitiva de colesterol total respecto a las HDL debería ser inferior a 4,0. Con valores superiores aumenta el riesgo de arteriosclerosis.

En los laboratorios clínicos existen **máquinas de análisis** gigantescas que miden cientos de sustancias al mismo tiempo. Esto no siempre es adecuado. Sin embargo, está claro que la tendencia es descentralizar y realizar pruebas rápidas en el lugar, lo que se denomina pruebas *Point-of-Care* (POC).

¿Entonces cómo se sabe antes de que sea demasiado tarde si hay amenaza de infarto de miocardio o de embolia? Los **marcadores de inflamación** (*inflamation markers*) facilitan señales de advertencia: la proteína C reactiva (CRP) ya se ha reconocido en Estados Unidos como un marcador de riesgo adicional a las grasas sanguíneas. El mismo presidente estadounidense Bush se ha hecho la prueba de la proteína C reactiva y se le ha encontrado físicamente sano.

Muy interesantes son las futuras pruebas rápidas que, en caso de goteo nasal y fiebre, revelan si se trata de una infección viral o bacteriana. Los marcadores son la procalcitonina (PCT) para las bacterias y la neopterina para los virus.

Como se sabe, los **antibióticos** sólo sirven de ayuda en las infecciones bacterianas. La prescripción masiva de antibióticos –y también el abandono temprano y arbitrario de la medicación por parte de los pacientes al notar los primeros síntomas de mejoría– ha causado la aparición de cepas bacterianas resistentes, contra las cuales se necesitan armas nuevas o dosis más elevadas (Cap. 4). ¡Un círculo vicioso que se debe romper!

Las pruebas inmunológicas rápidas son muy importantes para detectar bacterias y virus a fin de poder administrar antibióticos de forma más selectiva. Las pruebas de DNA son una nueva herramienta.

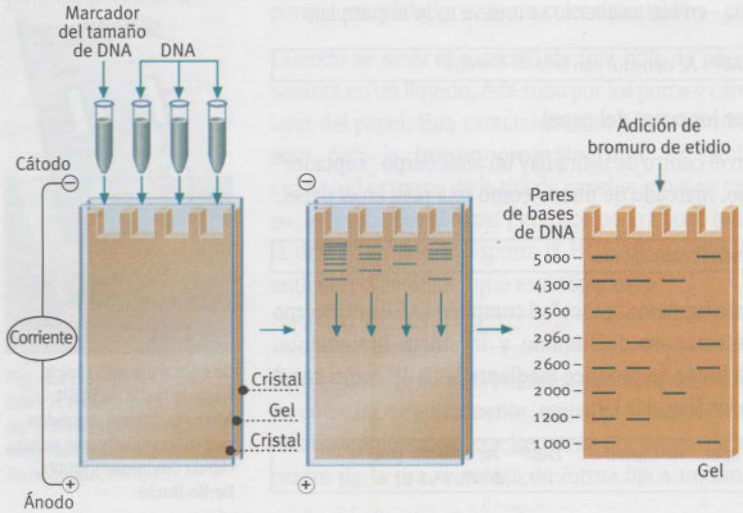
10.8 Cómo se analiza el DNA: la electroforesis en gel separa los fragmentos de DNA según su tamaño

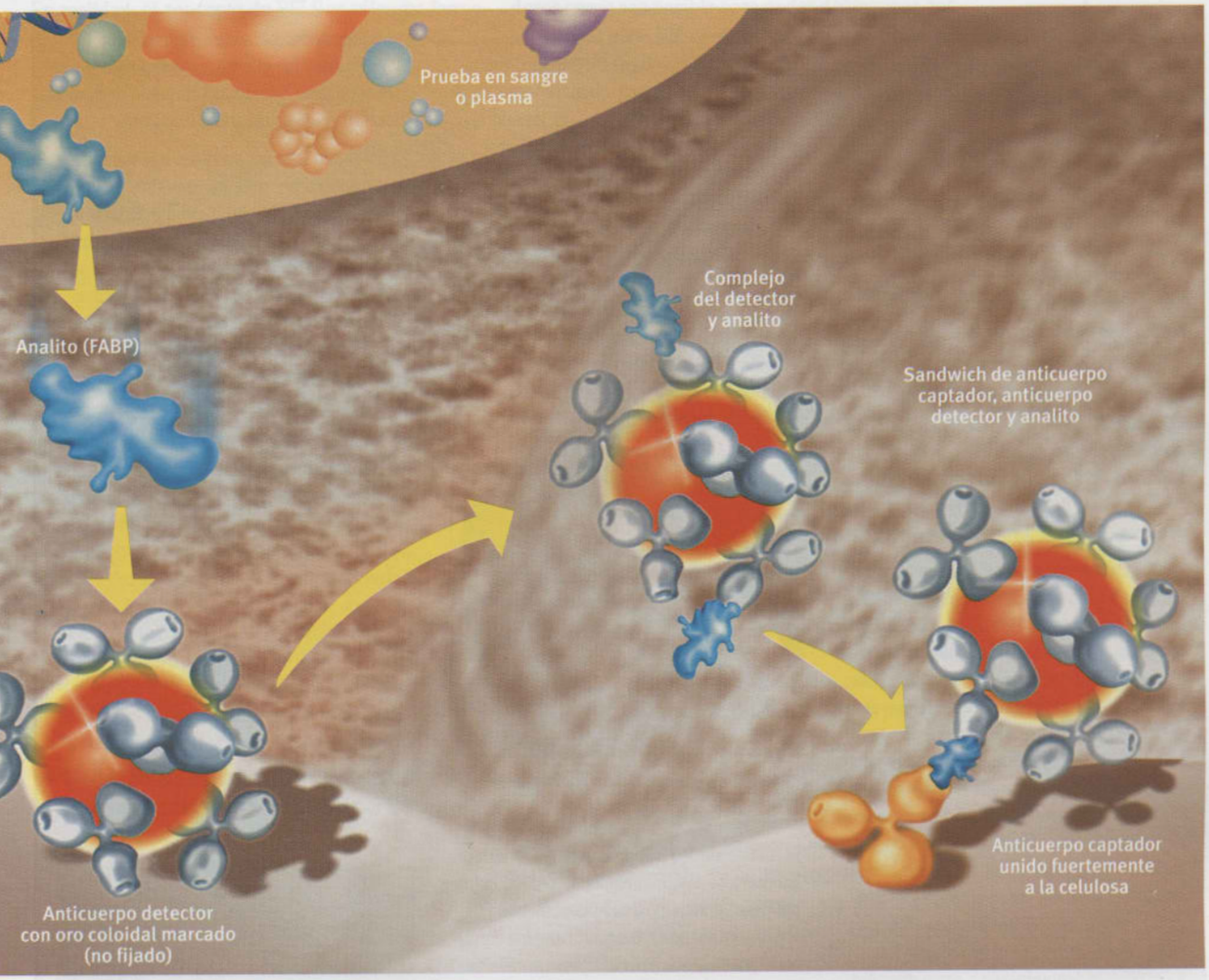
¿Cómo se puede analizar una secuencia de DNA? Para analizar los genes se corta el DNA genómico (u otro DNA a analizar, por ejemplo el plásmido bacteriano) con una o varias enzimas de restricción (Cap. 3) y en un **gel de agarosa** se separan según su tamaño los fragmentos que aparecen.

La agarosa es un polisacárido que se obtiene a partir de las algas marinas rojas (Cap. 7) y se disuelve por ebullición en un tampón, aunque al enfriarse solidifica en forma de gel de gran porosidad. Si se aplica un **campo eléctrico** a este gel, los ácidos nucleicos, debido a los grupos fosfato cargados negativamente, se dirigen al polo positivo (ánodo). En la electroforesis en gel, los fragmentos más pequeños de DNA atraviesan los poros más rápidamente que los grandes (Figs. 10.18 y 10.20).

Los fragmentos de DNA que se han aplicado al gel se separan según su **tamaño**. Al mismo tiempo y en

Fig. 10.18 Principio de la electroforesis en gel.





las mismas condiciones, se aplica un **DNA estándar.** Éste consta de fragmentos de DNA de tamaño conocido y de una "escalera" (*ladder*) que contiene, por ejemplo, fragmentos de 1000 a 5000 pares de bases (Fig. 10.18) y permite calcular de forma aproximada los tamaños de los fragmentos.

El colorante que une DNA, el **bromuro de etidio**, sirve para revelar el DNA. El bromuro de etidio se aloja entre las bases de los ácidos nucleicos (intercalado) y es fluorescente a la luz UV. Esta coloración se produce después del recorrido electroforético, o bien el bromuro de etidio se aplica al principio con el gel de agarosa (Fig. 10.21). Asimismo, se puede utilizar DNA marcado con radiactividad y revelarlo mediante una película radiográfica (autorradiografía).

Si se rompe una molécula de DNA con una o varias enzimas de restricción, se puede elaborar un **mapa de restricción**, es decir, se determinan la localización y las distancias de los lugares de rotura de restricción dentro de la molécula de DNA.

La electroforesis en gel fue un método importante para las huellas dactilares genéticas (*genetic fingerprint*).

10.9 Vida y muerte: huellas dactilares genéticas para aclarar la paternidad y el asesinato

Desde 1892 se utilizan las huellas dactilares para la identificación de personas **(dactiloscopia)**. Incluso los gemelos univitelinos tienen huellas dactilares diferentes.

La caída de la estrella de fútbol americano, O.J. Simpson, dio a conocer por los medios de comunicación de todo el mundo las huellas dactilares de DNA. No obstante, al final no se pudo probar la culpabilidad de Simpson porque hubo negligencia por parte de la policía al recoger pruebas y porque sus abogados hicieron que la acusación incurriera en contradicciones. La prueba prácticamente condenatoria se destruyó. En el asesinato políti-

Fig. 10.19 Cómo funciona la prueba de la FABP para el infarto de miocardio.



Fig. 10.20 Aparatos para realizar la electroforesis en gel de agarosa.

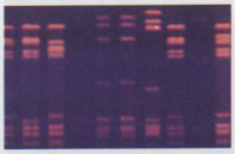


Fig. 10.21 Bandas de DNA visibles con bromuro de etidio a la luz UV después de una electroforesis en gel de agarosa.

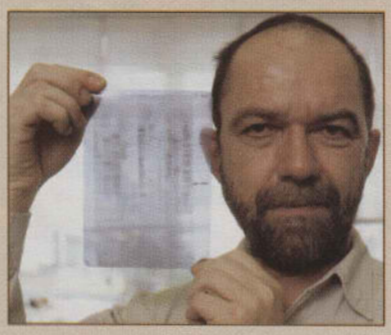
Cuadro 10.1 Historia de la biotecnología: Perfiles de DNA y el caso Colin Pitchfork

En 1983 violaron a la joven de 15 años Lynda Mann y la encontraron estrangulada en el pueblo de Narborough, en Inglaterra. Tres años más tarde encontraron el cuerpo de Dawn Ashworth, también de 15 años, en la localidad cercana de Enderby. Encontraron a ambas muchachas en un sendero oscuro. Los periódicos hablaban de *The Black Pad Killer.*

La policía no encontró ninguna huella, y **Alec Jeffreys**, un especialista en genética de la Universidad de Leicester, publicó su método del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (*Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP*).

El descubrimiento le sorprendió en la cámara oscura a las nueve de la mañana del lunes 15 de septiembre de 1984. Jeffreys investigó la evolución del gen para la proteína transportadora de oxígeno en el músculo, la mioglobina, y después de una electroforesis en gel fotografió los fragmentos correspondientes de DNA. Jeffreys miró la fotografía acabada de revelar. Ésta mostraba el DNA en diversas bandas que parecían los códigos de barras de los envoltorios. ¡Dios mío –debió de pensar él–, qué tenemos aquí! ¡Muestras completamente diferentes, pero tan singulares que cada persona puede identificarse a través de ellas! Sólo unas pocas horas después, Jeffreys y sus colegas denominaron a aquel descubrimiento casual "huella dactilar genética".

Se aisló DNA a partir de restos de esperma para reconstruir el perfil del DNA del asesino. Se pidió a 5000 hombres de 16 a 34 años, sin coartada, que facilitaran una muestra de sangre. Naturalmente, la policía había supuesto que el asesino no se iba a dejar investigar voluntariamente de esta forma. Eso también sucedió por casualidad. En agosto de 1987, una mujer de una panadería relató a la policía que uno de sus colegas del *pub* le había explicado que había dado su sangre en lugar de la de otro hombre para ayudarle. Cuando se interrogó a Ian Kelly, no lo negó. Su compañero de 27 años, Colin Pitchfork, le había hecho creer que ya había dado su sangre por otro que estaba en apuros.



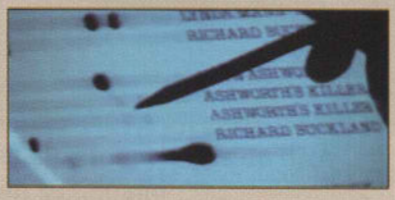
Alec J. Jeffreys con la primera huella dactilar de DNA de la historia.

El motivo verdadero: ¡Pitchfork era el asesino! En enero de 1988, Pitchfork se declaró culpable y fue condenado a cadena perpetua. Fue el primer asesino de la historia que fue condenado por su DNA. Previamente, un enfermo mental de 19 años, Rodney Buckley, se había declarado culpable de haber matado a Dawn Ashworth. Se le puso en libertad dado que su DNA no coincidía en absoluto con el DNA del esperma encontrado en el lugar del crimen. Buckley fue el primer sospechoso de la historia de la humanidad al que se declaró inocente gracias a un análisis de DNA.

En 1987, en Estados Unidos e Inglaterra se admitieron por primera vez oficialmente los análisis de DNA como prueba. El banco de datos nacional británico contiene aproximadamente 700 000 perfiles de DNA y hasta ahora se ha utilizado en 75 000 casos, unas 500 veces por semana. En 10 000 casos de violación entre 1989 y 1996 se logró descartar el 25% de los presuntos sospechosos mediante un análisis de DNA.

Se puso de manifiesto que los testigos oculares también se suelen equivocar, según dicen asimismo las autoridades de justicia de Estados Unidos: El *Innocence Project* (Proyecto de inocencia) del fiscal de Nueva York **Barry Scheck** se refiere al DNA como "la balanza de oro de la inocencia", y desde 1992, mediante análisis de DNA, se ha logrado excarcelar a más de 70 inocentes, entre ellos también condenados a muerte. Scheck dice que de cada siete personas que se ejecutan en Estados Unidos, como mínimo una (!) es inocente.

La Reina otorgó a Alec J. Jeffreys un título nobiliario por sus servicios a la humanidad.



La huella dactilar genética del asesino coincide con la de Pitchfork.





Fig. 10.22 Las huellas dactilares de DNA muestran también el grado de "fidelidad" de los pájaros; aquí los inseparables *Agapornis* (arriba). La cuestión de quién es el papá de este bebé (abajo) no tiene importancia en la jaula del autor.

co de la ministra sueca de Asuntos Exteriores, Anna Lindt, la policía, al contrario que en el asesinato no aclarado de Olof Palme, descubrió el arma del crimen: un cuchillo. En éste no se encontraron huellas dactilares, pero sí partículas de piel. Igual de rápida y eficaz fue la investigación del DNA en el asesinato del rey de la moda de Munich, Moshammer. Se inculpó a los autores mediante un análisis de DNA.

El DNA de dos personas sólo se diferencia en un 0,1%. Por tanto, en caso de personas sin parentesco, aproximadamente cada mil bases hay una letra cambiada. Sin embargo, esta diferencia es suficiente para fabricar una "huella dactilar genética" que sea inconfundible. Es interesante el hecho de que la diferencia genética entre personas de distintos continentes sea menor que lo que se había supuesto hasta ahora: un individuo africano puede ser genéticamente más similar a un individuo europeo o asiático que a otro africano.

El primero que describió la huella dactilar del DNA fue, en los años 1970, **Alec J. Jeffreys** en Inglaterra, en la Universidad de Leicester (detalles en el Cuadro 10.1). La prueba se basa en que los fragmentos de DNA de diferentes personas cortados con la ayuda de enzimas de restricción se diferencian en la cantidad y el tamaño. A esta técnica se la denomina análisis del **polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), abreviado **RFLP** (ver Cuadro). Los ingenieros genéticos lo pronuncian "riflip".

En realidad, el concepto de RFLP es sólo una forma de detectar las variantes de DNA: la aplicación de enzimas muy específicas que cortan el DNA, las endonucleasas de restricción (Cap. 3). Cuando dos variantes de DNA se diferencian en la secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción, ésta corta una de las variantes, mientras que la otra tal vez no. Por consiguiente, los fragmentos cortados de las variantes tienen diferentes longitudes (detalles en el Cuadro 10.2).

La mayor parte del DNA de los organismos superiores (97%) no contiene información sobre la formación de las proteínas. Los genes son oasis en este desierto. Sin embargo, este **"DNA no codificante"** (intrones) suele ser portador de mutaciones más a menudo que el codificante, ya que en la mayoría de los casos estas **mutaciones** permanecen en la célula sin efectos que pongan en peligro la vida. ¡Es lógico! Las mutaciones se transmiten de generación en generación sin que el aspecto externo del organismo (el fenotipo) se modifique. Los **RFLP no codificantes** se diferencian entre individuos más que las secuencias de DNA codificantes. Esto es ideal para el diagnóstico.

10.10 Marcadores de DNA: breves repeticiones en tándem y SNP

Sin embargo, el RFLP no basta para realizar análisis amplios, entre otras cosas porque cada lugar de corte sólo tiene dos posibles estados.

El **DNA de microsatélites** desempeña un papel importante. Representa el 5% de los polimorfismos secuenciales. Éstos son fragmentos de DNA cortos que se repiten en forma de tándem (***Short Tandem Repeats*, STR**), tales como CACACACACA. Las unidades de repetición tienen una longitud de dos a diez nucleótidos y se repiten de cinco a veinte veces. La cantidad de repeticiones por satélite es diferente en cada caso. El genoma humano contiene un mínimo de 650 000 STR. El DNA de microsatélites aparece raras veces en los genes y, cuando aparece, tiene como consecuencia, por ejemplo, la enfermedad hereditaria corea de Huntington, el "baile de San Vito". Su número permite un mapeo del genoma humano con una resolución aceptable.

Los RFLP y los marcadores de satélites tienen en común que se pueden **mapear bien físicamente**, es decir, se pueden fijar en un mapa genómico y, de este modo, determinarse en un cromosoma. En el mapeo hay que cubrir el cromosoma (o el genoma entero) por completo con tantos marcadores como sea posible para poder determinar con más facilidad, por ejemplo, la ubicación de los genes de una enfermedad. Después se calcula la frecuencia con que se heredan los marcadores investigados (RFLP, STR) junto con la enfermedad en ciertas familias.

Sin embargo, los más importantes son los **SNP** (*Single Nucleotide Polymorphism*), que se pronuncia "snips" ("recortes").

Polimorfismo significa que las diferentes copias de un gen de una población no son exactamente idénticas. Se produce polimorfismo de un nucleótido individual cuando la diferencia entre los genes comparados ya tiene el tamaño de una base.

En estudios a gran escala de seres humanos o de otros tipos de poblaciones, los SNP son los marcadores elegidos porque se pueden medir fácilmente con **"chips" genéticos** (ver más abajo).

Los SNP representan el 95% de las variaciones secuenciales polimórficas. Ya se conocen 1,5 millones de SNP. La única desventaja es que cada SNP sólo puede ser uno de los dos pares de bases A-T o G-C. Por consiguiente, diferenciar a dos personas puede ser difícil.

Hay que encontrar **bloques de SNP** como un código genético lineal. Estas combinaciones de SNP se denominan también haplotipos. En la actualidad, el mapeo de un **haplotipo** forma parte de cada programa de mapeo del gen. En los años 1990 se completó el *fingerprinting* RFLP con los SNP.

En **criminalística**, el DNA desempeña un papel cada vez más importante. Actualmente, una huella dactilar de DNA puede obtenerse con 20-50 nanogramos de DNA. Se comparan con *fingerprinting*, por ejemplo, una muestra de DNA de la víctima de una violación, de los restos de esperma y del DNA del sospechoso. En Alemania, en las llamadas investigaciones reticulares de DNA, también se extrajeron y se examinaron frotis de la mucosa bucal de miles de hombres sospechosos con los llamados *swabs* (bastoncillos de algodón) (Fig. 10.23 y Fig. 10.25), ¡a menudo con éxito!

Sin embargo, la apertura de un **banco de datos de DNA** en Alemania es muy polémica por motivos legales, pero tiene muchos partidarios desde el asesinato en Munich del rey de la moda, Moshammer.

El *fingerprinting* cada vez es más sensible. Basta con unas gotitas de saliva en el auricular del móvil o una única raíz de un pelo. El **método de la raíz capilar** lo desarrolló la policía judicial federal ale-

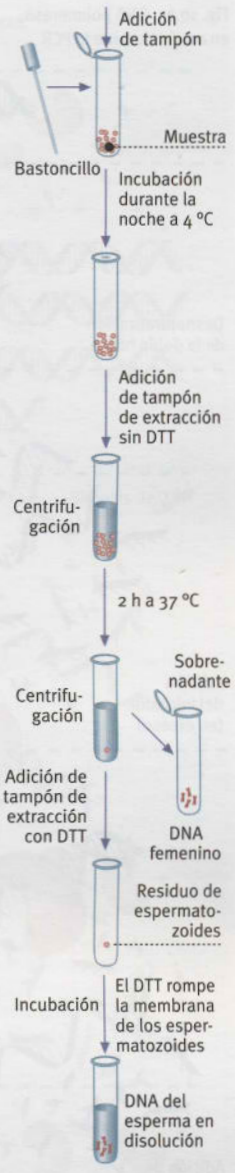


Fig. 10.23 Prueba de DNA para criminalística; el DNA femenino separado del DNA del esperma.





Fig. 10.24 El gatito *Fortuna* proporciona una muestra de DNA con un bastoncillo bucal.

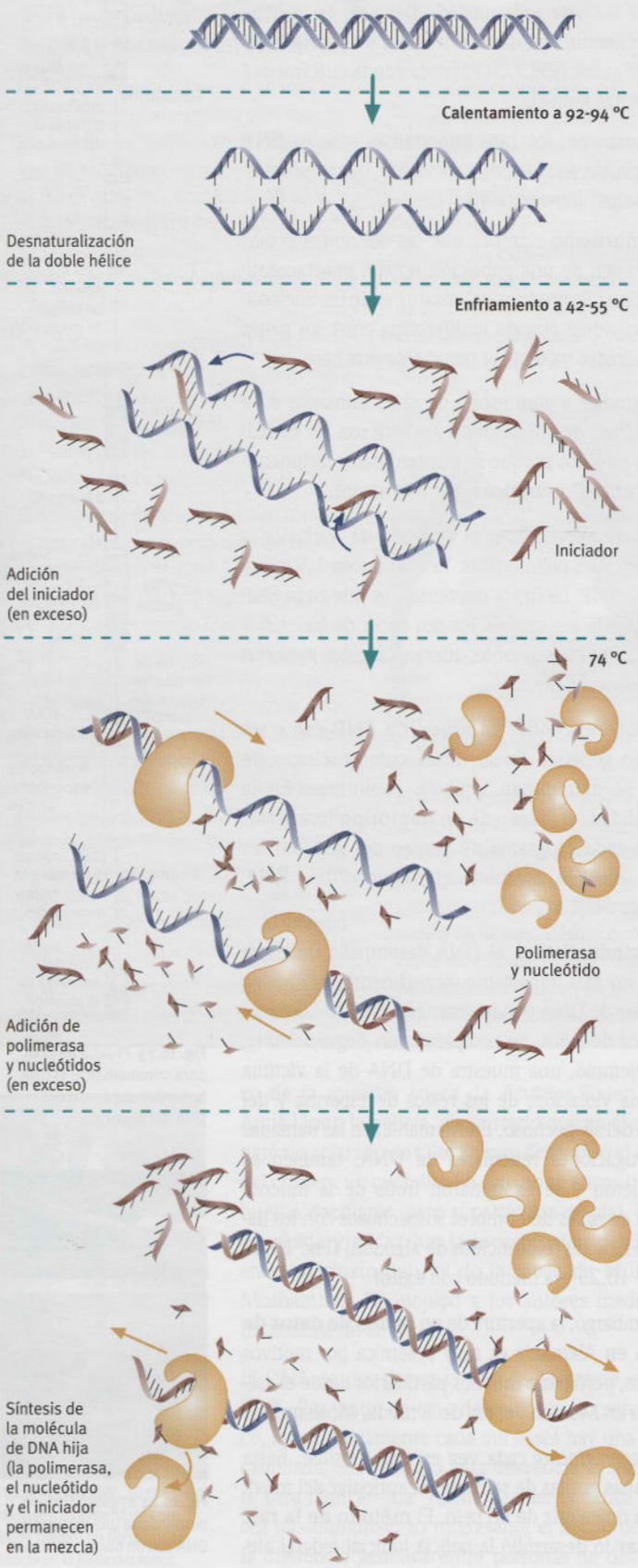


Fig. 10.25 DNA polimerasa en acción durante la PCR

mana. Gracias a los análisis de DNA, el movimiento de "Las Abuelas" argentinas pudo devolver a sus familias originales, como mínimo, algunos de los 2000 niños secuestrados durante la dictadura militar. En este caso se analizó el **DNA mitocondrial** de los niños y de las abuelas. El DNA mitocondrial lo transmiten exclusivamente las madres. También llamó mucho la atención el análisis del DNA de la familia real Romanov y el desenmascaramiento de Anne Anderson, la última de las supuestas "hijas del zar".

Otras aplicaciones son, por ejemplo, el **análisis de fibras**: que un jersey de cachemira proceda realmente de una cabra de Cachemira y no de una oveja normal. Las huellas dactilares de DNA también pueden extenderse al **DNA artificial**, por ejemplo para hacer marcas especiales (*tags*) y evitar falsificaciones. Un DNA de 20 bases ofrece diez trillones de posibles variantes para codificar. De este modo se podrían marcar pinturas y coches de lujo.

Sin embargo, si sólo se dispone de pequeñas cantidades de DNA, primero habrá que multiplicar este DNA. Las palabras mágicas son "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR).

10.11 La reacción en cadena de la polimerasa: el copiador de DNA

El copiador de DNA por excelencia se denomina **reacción en cadena de la polimerasa** (**PCR**, por *Polymerase Chain Reaction*). En realidad, en ella sucede lo mismo que cuando se divide una célula madre en dos células hijas. Puesto que cada célula hija necesita exactamente la misma información hereditaria, la información de la célula madre debe copiarse en su totalidad. Para ello, ambas hebras de la doble hélice se separan. Las dos moléculas de DNA con una hebra sirven de matriz para dos hebras nuevas. Con la ayuda de una enzima, la **DNA polimerasa** (Fig. 10.25), ambas hebras complementarias se sintetizan en la célula. La polimerasa forma el nucleótido correcto que se adapta a la matriz respectiva. Los dos DNA de las células hijas son idénticos al DNA de la célula madre.

Miles de bioquímicos y biotecnólogos intentaron durante años imitar esto en un tubo de ensayo, pero fue **Kary Mullis** quien tuvo la idea decisiva: la PCR (Cuadro 10.3).

En resumen, el principio genial de la PCR es el siguiente:

- Calentamiento y, de este modo, separación (desnaturalización) del DNA.
- Enfriamiento y adición del iniciador.
- Calentamiento y síntesis del nuevo DNA mediante la polimerasa.
- Calentamiento y separación (desnaturalización) del nuevo DNA.
- El mismo procedimiento desde el principio.

Un ciclo transcurre automáticamente en pocos minutos.

En un principio, la DNA polimerasa se añadía de nuevo en cada ciclo, puesto que la enzima de las bacterias *Coli* perdía su actividad en la etapa de desnaturalización a 94 °C. Más tarde se descubrieron bacterias en fuentes en ebullición, por ejemplo en los géiseres del Parque Nacional Yellowstone (Fig. 10.36). ¡Éstas también necesitan una polimerasa para poder proliferar allí!

La enzima aislada de *Thermus aquaticus* (la ***Taq* polimerasa**) se modificó mediante ingeniería genética y se fabricó en grandes cantidades. La *Taq* polimerasa trabaja de forma óptima a 72 °C y soporta una temperatura de 94 °C sin sufrir daños. Puede permanecer en el tubo de ensayo en todos los ciclos, lo cual es decisivo para el éxito del método. El Cuadro 10.4 y la Fig. 10.25 describen los detalles de la PCR.

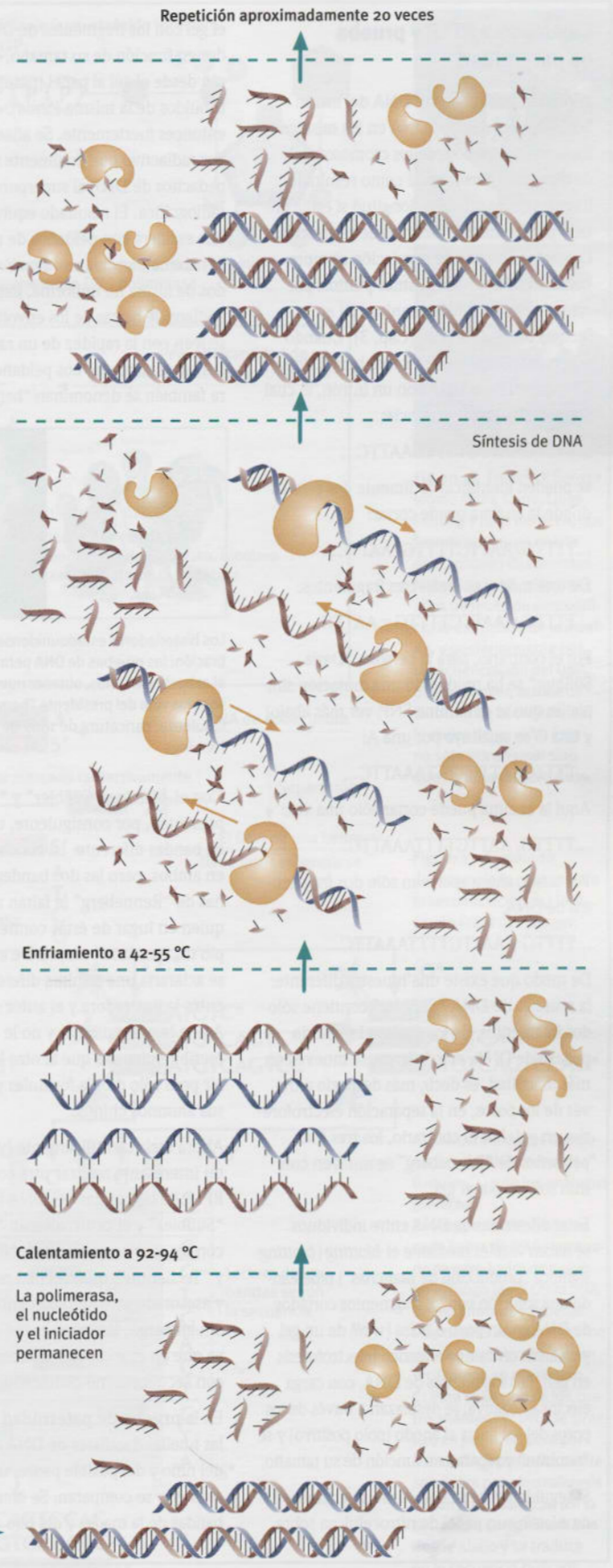
10.12 ¿Se despertará a los saurios y al mamut a una nueva vida?

Los análisis de animales extinguidos con la ayuda de la PCR constituyen un tema apasionante. Siempre que haya huellas de DNA, se pueden ampliar.

Un mamut que se encontró en el hielo siberiano después de 20 000 años demostró, con el análisis de DNA, el parentesco esperado con el elefante actual. El equipo ruso-francés-americano que corta bloques enormes de hielo de los suelos helados en la Era Pérmica, que contienen ejemplares de mamut lanudo (Fig. 10.31), espera encontrar DNA intacto de mamut y luego poderlo transferir a óvulos de elefante para su clonación (Cap. 8).

De este modo se podría volver a crear una de las primeras especies de animales extinguidas por nosotros. Un gesto de agradecimiento: al fin y al cabo, en gran medida hay que agradecer al mamut la supervivencia del ser humano en la edad del hielo. Era casi el único proveedor de carne en el desierto helado.

Es cierto que los **insectos** atrapados en ámbar (Fig. 10.32) podrían haber chupado la sangre de los



Cuadro 10.2 RFLP y prueba de paternidad

¿Cómo es posible que el DNA del intrón homólogo (es decir, el DNA en los mismos fragmentos idénticos de los cromosomas) de diferentes personas dé como resultado fragmentos de diferente longitud si está cortado por las mismas enzimas de restricción? Las endonucleasas de restricción siempre cortan el DNA en los mismos puntos, por ejemplo después de la guanina (G) en la secuencia ...GAATTC... (Cap. 3). Cuando la persona, llamémosle "Renneberg", tiene un fragmento de DNA con un intrón, el cual posee la siguiente secuencia:

...TTTTGAATTCTTTTGAATTC...

se pueden identificar fácilmente dos puntos donde la enzima puede cortar:

...TTTTG/AATTCTTTTG/AATTC...

De este modo, se crean tres fragmentos:

...TTTTG y AATTCTTTTG y AATTC...

Por el contrario, para la persona "Darja Süßbier" se ha producido una mutación simple (lo que se denomina SNP, ver más abajo) y una G se sustituye por una A:

...TTTTGAATTCTTTTAAATTC...

Aquí la enzima puede cortar sólo una vez:

...TTTTG/AATTCTTTTAAATTC...

Por tanto, ahora aparecen sólo dos fragmentos de DNA:

...TTTTG y AATTCTTTTAAATTC...

De modo que existe una muestra diferente: la muestra de DNA "Süßbier" contiene sólo dos fragmentos, de los cuales el segundo pedazo de DNA, el más largo, se mueve con más dificultad, es decir, más despacio a través de los poros, en la separación electroforética en gel. Por el contrario, los tres más pequeños de "Renneberg" se mueven con más soltura por el gel.

Estas diferencias de DNA entre individuos se hacen visibles mediante el *blotting* (*blotting* significa "producción de manchas") pipeteando una solución con los fragmentos cortados de DNA en un pozo o bolsa (*well*) de un gel y creando un campo eléctrico (electroforesis en gel). Los fragmentos de DNA, con carga eléctrica negativa, se desplazan a través de los poros del gel hacia el ánodo (polo positivo) y se "tamizan" y separan en función de su tamaño.

Si seguidamente se coloca en un aparato de *blotting* un papel de nitrocelulosa sobre el gel con los fragmentos de DNA distribuidos en función de su tamaño, éstos se aspirarán desde el gel al papel (naturalmente, distribuidos de la misma forma). Allí se unen entonces fuertemente. Se añade un marcador radiactivo que finalmente revela los pedacitos de DNA al superponerle una placa radiográfica. El resultado equivale al de una escalera con peldaños de más grosor que lo habitual, los cuales además están distribuidos de forma no uniforme. Recuerda a los códigos de barras de los envoltorios, que se leen con la rapidez de un rayo en la caja del supermercado. Los peldaños de la escalera también se denominan "bandas de DNA".



Los historiadores estadounidenses están de celebración: las pruebas de DNA permiten, incluso al cabo de cien años, obtener nueva información sobre la vida del presidente Thomas Jefferson. Izquierda: caricatura de 1802 de Jefferson y Sally Hemings

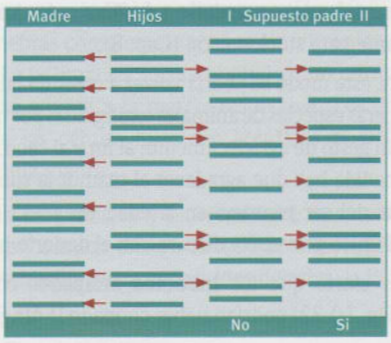
Con el *blotting*, "Süßbier" y "Renneberg" presentan, por consiguiente, una muestra de bandas diferente. La banda TTTTG existe en ambos, pero las dos bandas más pequeñas de "Renneberg" le faltan a "Süßbier", quien en lugar de éstas contiene como propio un "peldaño" mayor. De este modo se aclararía una mínima diferencia genética entre la ilustradora y el autor de este libro. A una le gusta dibujar y no le entusiasma escribir, mientras que al otro le gusta escribir pero sólo dibuja fórmulas y cómics para sus alumnos chinos.

Ahora sería científicamente (y humanamente) interesante realizar otra comparación RFLP de las bandas del DNA de la berlinesa "Süßbier" y el centroalemán "Renneberg" con los alemanes del norte "Braunbeck" y "Techentin", quienes han revisado y asesorado este libro con entusiasmo. Sin embargo, tampoco es tan simple, ya que en este caso estaríamos tratando con secuencias no codificadoras.

En la **prueba de paternidad** se colocan las huellas dactilares de DNA de la madre, del niño y del posible padre, unas junto a otras, y se comparan. Se identifican las bandas de la madre y del hijo que están a la misma altura. Seguidamente se comparan las bandas restantes del niño con las del posible padre. Las bandas que no coinciden con las de la madre deberán coincidir entonces con las del padre biológico. Si las bandas no coinciden, es muy probable que ése no sea el padre.

Apenas suele haber límites para la aplicación de las huellas dactilares genéticas. En Francia se exhumó el cadáver del actor y cantante Yves Montand para aclarar una batalla de paternidad (¡él no era el papá!). Un ejemplo aún más extravagante que ocurrió en América: en 1802, un periódico acusó al presidente Thomas Jefferson, el padre de la Declaración de Independencia Americana, de haber mantenido una relación clandestina con su esclava mulata Sally Hemings. Por tanto, Jefferson podía ser el padre de uno de los siete hijos de Sally Hemings. En 1997 se recogieron 19 muestras de DNA de los descendientes de Jefferson, entre ellas muestras de sangre de descendientes masculinos del tío de Jefferson por parte de padre, Field Jefferson. Con un marcador polimórfico, en cada muestra se investigó el cromosoma Y (que sólo transmite genes a través de la línea masculina). El análisis indicó que, por lo visto, Jefferson era el padre del hijo menor, Eston Hemings.

Esto sólo fue un preludio del "culebrón Lewinsky" de agosto de 1998. Ambas pruebas de DNA de la muestra de sangre de Bill Clinton y de la mancha de esperma del vestido de Monica demostraron ser idénticas con una probabilidad de 1 a 7 820 000 000 000 (siete billones), según comunicó oficialmente el FBI. Seguidamente, el proceso de destitución en el Senado obtuvo la mayoría. Algunos graciosos solicitaron que se destituyera de su cargo al santo presidente Jefferson a título póstumo.



Ejemplo de análisis de paternidad.

Fig. 10.26 Frederick Sanger (como Marie Curie, Linus Pauling y John Bardeen, que fueron los únicos aparte de él) obtuvo dos premios Nobel: en 1958, sólo tres años después de descodificar la estructura de la insulina, y posteriormente por la secuenciación del DNA. Según Sanger, la idea de la rotura de la cadena fue la mejor de su vida; ésta no sólo era original sino que finalmente tuvo éxito.

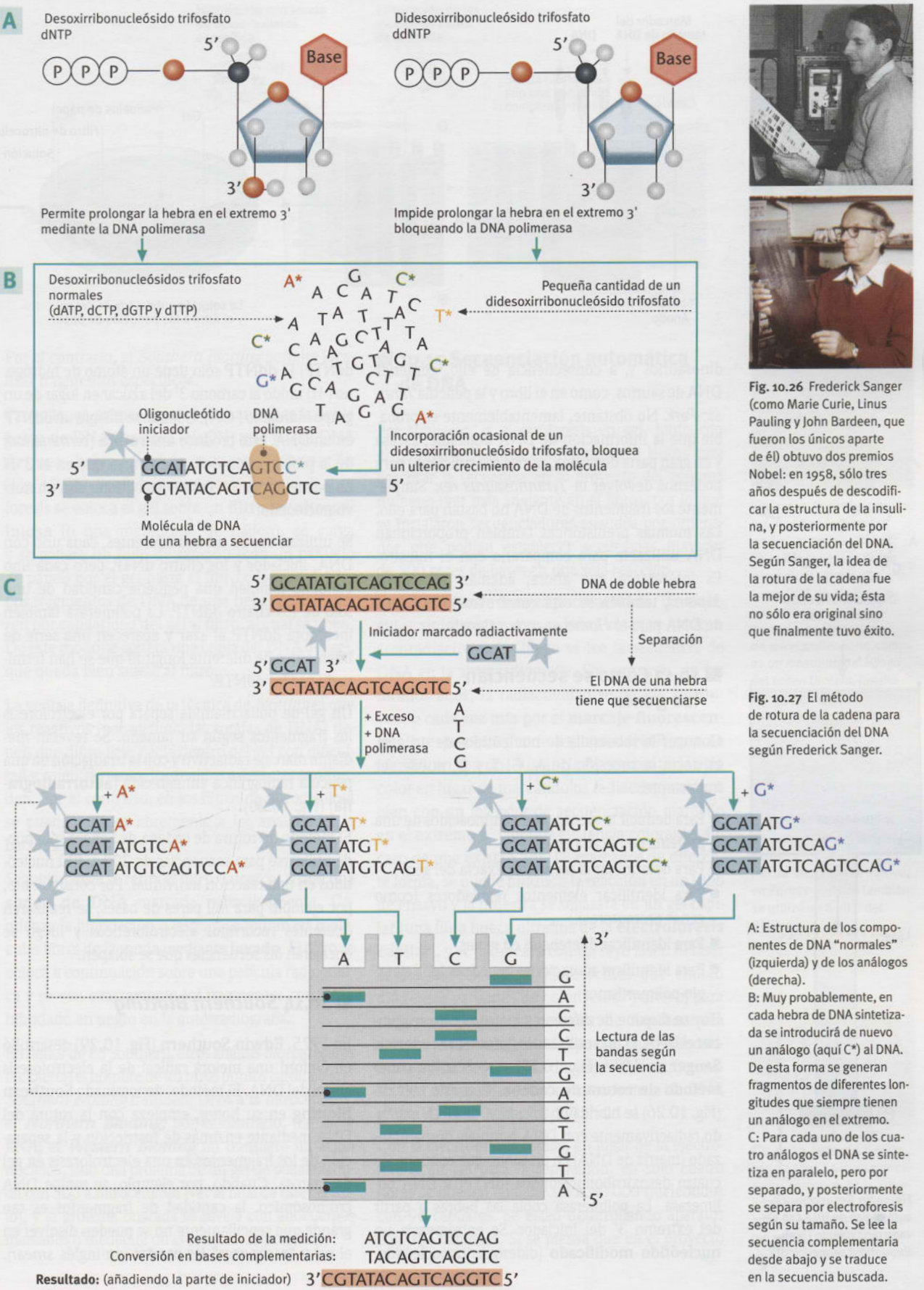


Fig. 10.27 El método de rotura de la cadena para la secuenciación del DNA según Frederick Sanger.

A: Estructura de los componentes de DNA "normales" (izquierda) y de los análogos (derecha).
B: Muy probablemente, en cada hebra de DNA sintetizada se introducirá de nuevo un análogo (aquí C*) al DNA. De esta forma se generan fragmentos de diferentes longitudes que siempre tienen un análogo en el extremo.
C: Para cada uno de los cuatro análogos el DNA se sintetiza en paralelo, pero por separado, y posteriormente se separa por electroforesis según su tamaño. Se lee la secuencia complementaria desde abajo y se traduce en la secuencia buscada.

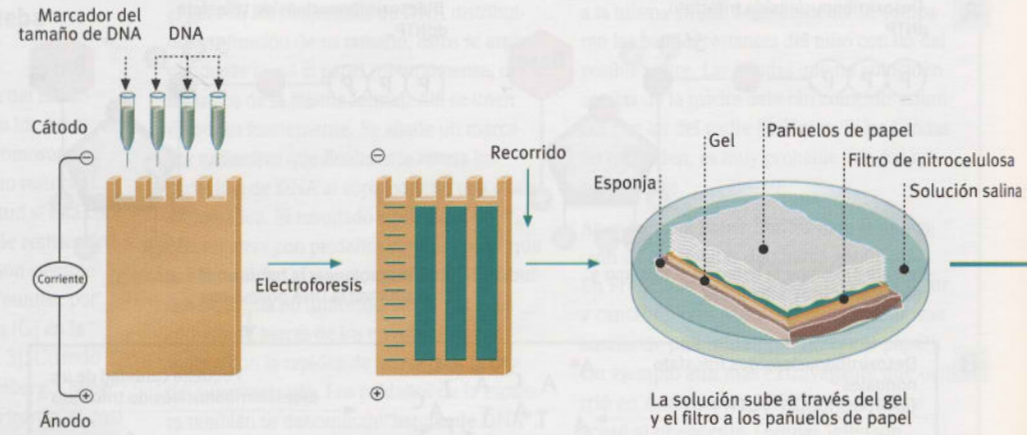


Fig. 10.28 Análisis de DNA por electroforesis en gel y *Southern Blotting*.



Fig. 10.29 Sir Edwin Southern (Universidad de Oxford) desarrolló el *Southern Blot*.

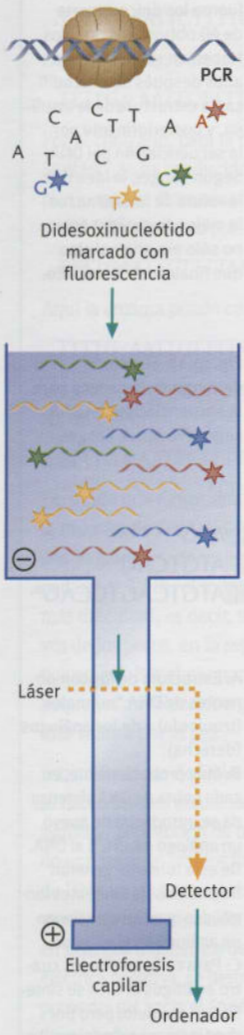


Fig. 10.30 Secuenciación automática de DNA con elevado rendimiento (*high throughput sequencing*).

dinosaurios y, a consecuencia de ello, contener DNA de saurios, como en el libro y la película *Jurassic Park*. No obstante, lamentablemente es probable que la información de DNA utilizable, escasa y en gran parte destruida, nunca sea suficiente para podernos devolver el *Tyrannosaurus rex*. Simplemente los fragmentos de DNA no bastan para ello. Las momias prehistóricas también proporcionan DNA utilizable para compararlo con el nuestro. Es interesante que ahora, además del *Homo sapiens*, también se está construyendo el banco de DNA para el *Homo neandertalensis*.

10.13 Cómo se secuencian los genes

Conocer la secuencia de nucleótidos de un gen, es decir, la sucesión de A, G, T y C, puede ser importante:

- Para deducir la secuencia de aminoácidos de una proteína codificada en el gen.
- Para determinar la secuencia exacta del gen.
- Para identificar elementos reguladores (como genes promotores).
- Para identificar diferencias en genes.
- Para identificar mutaciones genéticas (por ejemplo polimorfismos).

Hoy se dispone de diferentes métodos para secuenciar el DNA. El más utilizado lo desarrolló **Frederick Sanger** en 1977 (Fig. 10.27) y se describe como **método de rotura de cadena**. Con este método (Fig. 10.26) se hibrida un iniciador de DNA marcado radiactivamente con DNA *template* desnaturalizado (matriz de DNA) en un tubito que contiene los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTP) y DNA polimerasa. La polimerasa copia las hebras a partir del extremo 3' del iniciador. Se entremezcla un **nucleótido modificado** (didesoxirribonucleótido, ddNTP) El **ddNTP** sólo tiene un átomo de hidrógeno (-H) unido al carbono 3' del azúcar en lugar de un grupo hidróxido (-OH). Cuando se integra un ddNTP en un DNA, esto produce una **rotura** (*termination*) de la prolongación de la cadena, ya que en el 3'-H no puede formar un enlace fosfodiéster con un nuevo nucleótido.

Se utilizan cuatro tubitos diferentes, cada uno con DNA, iniciador y los cuatro dNTP, pero cada uno contiene también una pequeña cantidad de uno solo de los cuatro ddNTP. La polimerasa también incorpora ddNTP al azar y aparecen una serie de fragmentos de diferente longitud que se han terminado por los ddNTP.

Un gel de poliacrilamida separa por electroforesis los fragmentos según su tamaño. Se revelan mediante marcaje radiactivo y con la irradiación de una película radiográfica ennegrecida (**autorradiografía**) (Fig. 10.26).

El método de rotura de cadena de Sanger sólo puede utilizarse para secuencias de 200 a 400 nucleótidos en una reacción individual. Por consiguiente, por ejemplo para mil pares de bases, se realizarán diferentes recorridos electroforéticos y luego se encajarán las secuencias que se solapen.

10.14 *Southern Blotting*

En 1975, **Edwin Southern** (Fig. 10.29) desarrolló en Oxford una mejora radical de la electroforesis en gel del DNA. El método, denominado **Southern Blotting** en su honor, empieza con la rotura del DNA mediante enzimas de restricción y la separación de los fragmentos en una electroforesis en gel de agarosa. Cuando, por ejemplo, se rompe DNA cromosómico, la cantidad de fragmentos es tan grande que sencillamente no se pueden disolver en el gel y "reconocer" las bandas (en inglés *smear*).

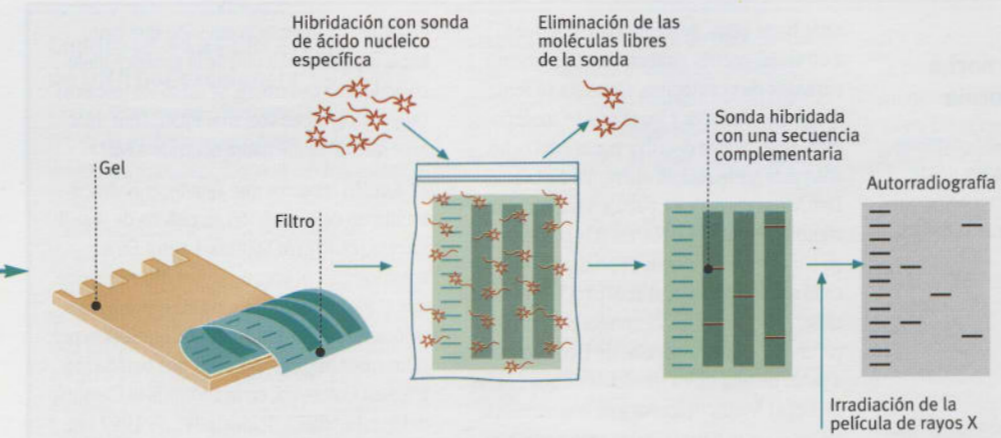




Fig. 10.31 Una reconstrucción satisfactoria de un mamut en la oficina del autor en la Universidad de Hong Kong (modelo del Museo Británico).

Por el contrario, el *Southern Blotting* permite localizar fragmentos específicos.

Para ello, en primer lugar se desnaturaliza la doble hebra de DNA con sosa (NaOH) y se forma DNA de una hebra para la posterior hibridación (Fig. 10.28). Seguidamente, después de la electroforesis se coloca el gel sobre un **filtro de nitrocelulosa** (o una membrana de nailon), se carga y se genera un flujo de tampón (con un pañuelo de papel) por el gel hasta el filtro o la membrana. Los fragmentos de DNA de una hebra se transfieren por capilaridad del gel al filtro, al cual se unen. De este modo se genera una copia del DNA del gel, que queda bien sujeta al filtro.

La ventaja definitiva de la técnica de *blotting* es que los reactivos (por ejemplo las sondas de DNA) tienen que difundirse hacia dentro del gel con dificultad y, mientras tanto, los analitos a detectar se difunden. Por el contrario, en los filtros de nitrocelulosa se puede acceder libremente a los analitos en la bandeja de presentación.

Seguidamente se retira el filtro. Luego se añade una **sonda de DNA** marcada radiactivamente. Comienza la hibridación. Después se retiran las moléculas libres de la sonda mediante **lavado**. El filtro se coloca a continuación sobre una película radiográfica y se ven exactamente los fragmentos con DNA hibridado en negro en la autorradiografía.

En honor de Ed Southern, otros análisis *blot* parecidos recibieron el nombre de los otros puntos cardinales: el *Southern Blotting* transfiere DNA a la nitrocelulosa; el ***Northern Blotting***, por el contrario, transfiere RNA; el ***Western Blotting*** no transfiere un ácido nucleico, sino una proteína de un gel de poliacrilamida con SDS a nitrocelulosa (ver al final de este capítulo), y la proteína buscada se revela con anticuerpos marcados o mediante otras pruebas de proteínas.

10.15 Secuenciación automática de DNA

Por supuesto, la electroforesis en gel, junto con el *Southern Blotting*, eran demasiado lentos para descifrar la secuencia en el proyecto del genoma humano (ver más adelante en el libro), por lo que se instalaron secuenciadores asistidos por ordenador que podían establecer secuencias mayores de 500 pares de bases en una sola reacción.

En el proceso de Sanger ya comentado, las moléculas sintetizadas con cadenas rotas se marcan con radiactividad y luego se lee la secuencia de DNA en la autorradiografía. Sin embargo, en los últimos años, la radiactividad se ha ido sustituyendo cada vez más por el **marcaje fluorescente**. Este proceso puede utilizar ddNTP, que se identifican con una sustancia fluorescente de otro color en lugar de marcándolos radiactivamente, o bien con un iniciador de secuenciación marcado en el extremo 5' con una sustancia colorante. En caso de que existan ddNTP marcados de diferente forma, se puede producir la reacción en un tubo de ensayo y la muestra se separará en un gel capilar (una fibra hueca ultrafina de la **electroforesis capilar**), y se escaneará con un rayo láser. El láser excita los colorantes fluorescentes que emiten diferentes variantes de color (*color pattern*) para cada nucleótido. Un detector de fluorescencia registra las señales emitidas por las bandas individuales y un ordenador convierte las cuatro señales de colores diferentes en la secuencia de DNA (Figs. 10.30, 10.38 y 10.39).

Con la electroforesis capilar, en lugar de la electroforesis en gel para la separación, en sólo cuatro horas se pueden analizar unos 40 000 nucleótidos con 96 capilares. Se están desarrollando aparatos con 384 capilares. Si se piensa que en el proyecto



Fig. 10.32 Verdaderamente, los insectos encerrados en ámbar podrían haber chupado la sangre de los dinosaurios y, por ello, contener DNA de dinosaurio. Sin embargo, el insecto que aquí se muestra, de www.amberworld.com, es un mosquito del hongo del orden *Diptera*, familia *Mycetophilidae*. El ámbar del Báltico tiene una edad aproximada de 28 a 54 millones de años. En el ámbar del Cretáceo de Nueva Jersey, el Líbano o Birmania, podría haber mosquitos "chupópteros" de sangre; sin embargo, estos casos son muy poco frecuentes. Por ese motivo, en *Parque Jurásico* también se utilizó un ámbar del Báltico.



Fig. 10.33 Hace cinco millones de años tuvimos antepasados comunes; en la actualidad, la diferencia del DNA entre el hombre y los primates es del 1 al 2%.

Cuadro 10.3 Historia de la biotecnología: De noche en la autopista de California

Kary Mullis se encontró en 1985, durante un viaje a casa en un fin de semana desde el laboratorio de la empresa biotecnológica Cetus, en una autopista californiana bañada por la luz de la luna.



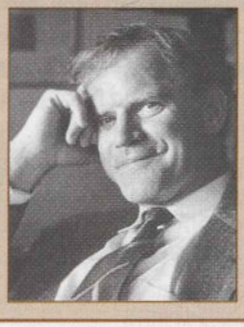
Las luces de una autopista dieron la idea a Mullis.

Durante tres largas horas reflexionó sobre una idea: ¿cómo puede copiarse un solo pedacito especial de DNA millones y miles de millones de veces? ¡Sería como poder encontrar la aguja molecular en el pajar! Una posibilidad consistiría en integrar el DNA en un plásmido anular y luego introducir el plásmido en bacterias, hacer que éstas se reprodujeran millones de veces, volver a extraer el plásmido y cortar el DNA clonado de esta forma. ¡Muy laborioso!

Mullis vio cómo las luces de los automóviles a ambos lados de la autopista se dirigían unas hacia otras, se deslizaban unas junto a otras, los coches giraban constantemente para salir de la autopista. Con esta sinfonía de carriles de luces y luces que se superponían, tuvo la idea decisiva por la cual ocho años más tarde recibió el Premio Nobel. Detuvo su coche y empezó a dibujar líneas: cómo se duplica el DNA en el tubo de ensayo (*in vitro*) a la vez que el producto de cada ciclo suministra las matrices para el siguiente ciclo. ¡Sólo bastarían 20 rondas para producir un millón de moléculas de DNA idénticas a partir de una única molécula de dos hebras de DNA! Mullis despertó a su acompañante femenina que dormía: «¡No te lo podrás creer! ¡Es tan increíble!» Ella gruñó algo poco amistoso y volvió a dormirse, un estado que Mullis no pudo alcanzar aquella noche, ya que «en mi cabeza explotaban bombas desoxirribonucleares».

Cuando Mullis volvió el lunes a Cetus probó febrilmente la idea, ¡y funcionó! Sin embargo, sólo unos pocos colegas se quedaron impresionados. Era tan sencillo que seguro que alguien lo habría probado con anterioridad. Cuando, poco después, el premio Nobel **Joshua Lederberg** (Cap. 3) estudió cuidadosamente el póster de Mullis en un congreso, preguntó más bien de forma casual: «¿Funciona?». Cuando Mullis dijo que sí, él obtuvo finalmente la reacción que tanto había esperado: el icono de la genética molecular, Joshua Lederberg, se mesó los (escasos) cabellos y gritó en voz alta: «¡Oh, Dios mío! ¿Por qué no se me habrá ocurrido a MÍ?».

¿Y a quién tenemos que agradecer el descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)? ¡Al Sputnik 1 ruso! En su autobiografía, el premio Nobel Mullis escribe que él y sus compañeros de clase ensayaban colocarse debajo de la mesa rápidamente, por si los rusos malvados tiraban una bomba atómica en Columbia, en la adormilada Carolina del Sur. El "shock del Sputnik" de 1957 provocó entonces que el gobierno estadounidense invirtiera lo más rápido posible en la formación de sus ciudadanos. El treceañero Kary pidió para Navidad un juego de química. Así empezó la historia de la PCR.



Kary Mullis (nacido en 1944).



Fig. 10.34 Autómatas para la secuenciación en el proyecto del genoma humano.

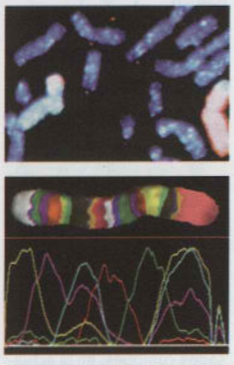


Fig. 10.35 FISH (arriba) y *Multi-Color-Banding* (abajo) de un cromosoma, por Ilse Chudoba (*Metasystems* Jena).

genómico se han utilizado en parte más de cien aparatos, se pueden secuenciar genomas enteros a corto plazo, aunque se necesiten múltiples determinaciones de cada secuencia debido a los posibles errores de lectura.

10.16 FISH: localización en cromosomas y cantidad de copias genéticas

¿Cómo se puede averiguar en qué cromosoma está localizado un gen o si un gen está disponible como copia individual o de forma múltiple en el genoma? Con el método **FISH** (hibridación fluorescente *in situ*) se puede analizar cuál es el cromosoma portador de un gen determinado. Los cromosomas se extienden sobre un portaobjetos de microscopio; se marca un DNA complementario (*Complementary* DNA, DNAc) del gen en cuestión, como sonda de DNA, de forma enzimática con nucleótidos fluorescentes, y se incuba con los cromosomas.

La sonda se hibrida con los genes correspondientes en los cromosomas. En el microscopio fluorescente se iluminan entonces los genes marcados. Cuando se clasifican los 23 cromosomas humanos según su tamaño y la formación de bandas de sus cromátidas, se puede representar el **cariotipo** (Fig. 10.35).

En la actualidad, la técnica moderna de diagnóstico prenatal (Cap. 9) permite realizar un análisis directo de células no cultivadas, por ejemplo las células del **líquido amniótico**. Examinando los cromosomas de las células amnióticas es fácil detectar, por ejemplo, la existencia de una trisomía 21 (síndrome de Down). Sin embargo, dado que la modificación de células individuales no proporciona información alguna sobre los daños cromosómicos de una persona, antes de realizar una amniocentesis hay que investigar como mínimo 50 células para poder obtener un resultado fiable.

Con la prueba FISH se pueden identificar aberraciones cromosómicas numéricas de los cromosomas autosomales 13, 18 y 21, y de los cromosomas sexuales X e Y, en células amnióticas no cultivadas. Científicos de la Universidad de Jena y de la empresa Metasystems han desarrollado un procedimiento para investigar la estructura y la composición de los cromosomas (Fig. 10.35).

Cuadro 10.4 La PCR: el copiador de DNA por excelencia

Con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de ***Polymerase Chain Reaction***) se multiplica exponencialmente un fragmento seleccionado de DNA de una forma enormemente eficaz. Éste puede ser cualquier trozo de un DNA cualquiera, siempre y cuando se conozcan los dos extremos de las secuencias, es decir, el orden de las bases. El motivo es que la DNA polimerasa necesita puntos de apoyo a partir de los cuales poder empezar a copiar. La multiplicación del DNA en sí se lleva a cabo con la polimerasa térmicamente estable de *Thermus aquaticus* (***Taq* polimerasa**) (Fig. 10.36), u otra polimerasa que sea térmicamente estable. Para el desarrollo de una PCR automatizada, la estabilidad térmica de la enzima fue decisiva. Así, no es necesario que después de cada ciclo se sustituya la polimerasa, que de lo contrario quedaría destruida por el calor, por otra nueva.

Cuando se conocen los extremos del fragmento de DNA que se debe multiplicar, el químico sintetiza fragmentos cortos de DNA de una hebra, los llamados iniciadores o secuencias iniciadoras que están hechas a medida de forma complementaria a las zonas de inicio cerca de ambos extremos del fragmento de DNA.



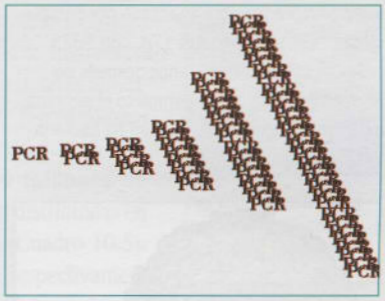


Termocicladores. Arriba: MJ Research modelo Tetriad; abajo: Roche Light Cycler

Empieza la PCR: todos los reactivos necesarios, las matrices de DNA (*template*), ambos iniciadores, la polimerasa y los componentes de DNA (los cuatro nucleótidos A, G, C y T, también reunidos como dNTP) se disuelven en un tampón óptimo dentro de un tubito de ensayo. El **termociclador** se ocupa entonces de que se produzca una reacción automatizada:

- Calentar la doble hélice a 94 °C y de este modo se formarán dos DNA de una hebra.
- Enfriarse de 40 a 60°C, y acto seguido se unen ambos iniciadores en la zona de inicio correspondiente cerca de los extremos de los DNA de una hebra (hibridación). De esta manera aparecen puntos de unión breves para las polimerasas, que marcan al mismo tiempo las posiciones de inicio del proceso de copia.
- Desde ambos extremos del DNA, dos polimerasas trabajan conjuntamente e integran los nucleótidos correspondientes y copian el fragmento deseado de DNA. De este modo se forman dos dobles hélices de DNA hijas idénticas.
- Ahora se vuelve a calentar a 94 °C y ambas moléculas de DNA hijas se dividen en un total de cuatro hebras simples de DNA.
- Enfriar de nuevo, se unen cuatro iniciadores a los cuatro extremos que existen ahora; la polimerasa produce cuatro DNA de doble hélice, los cuales son todos idénticos.
- Se repite el ciclo y se generan exponencialmente 8, 16, 32, 64, 128, 256 copias... Y así sucesivamente.

¡En un ciclo que sólo dura tres minutos, se puede generar en una hora (20 rondas) un millón de copias! Para iniciar la PCR, en teoría basta con una única molécula de DNA a multiplicar. Sin embargo, en la práctica se necesitan de tres a cinco moléculas de DNA a multiplicar para poder poner en marcha la PCR.



Representación gráfica del principio de la PCR.

La PCR no sólo es incalculablemente valiosa para la investigación, sino también para el diagnóstico. Con este método también se pueden detectar directamente virus y bacterias, es decir, sin tener que provocar previamente su proliferación de forma artificial. Para diagnosticar enfermedades hereditarias y cáncer cada vez se utiliza más la PCR. Sin embargo, se produce un problema debido a la extrema sensibilidad de la técnica: cuando no se trabaja en condiciones muy asépticas, el DNA ajeno existente en el laboratorio en forma de contaminación puede falsear fácilmente los resultados. ¡Incluso hay DNA en el aire! Cuando se produjo la epidemia de SARS en Hong Kong, esto hizo que personas en realidad sanas recibieran tratamiento como si estuviesen enfermas y, trágicamente, se infectaran en el hospital, porque habían dado falso positivo en la prueba.

El método denominado ***Multi-Color-Banding*** (Fig. 10.35) adquirirá gran importancia, especialmente en el diagnóstico y la terapia del cáncer, ya que cada célula cancerosa presenta, al contrario que las células corporales sanas de su entorno, modificaciones típicas en su información hereditaria, la cual se multiplica de forma incontrolada con cada división. En las células tumorales, el orden normal de los 23 pares de cromosomas humanos está alterado: faltan fragmentos de cromosomas, están invertidos respecto a su ubicación original o se encuentran como apéndices de otros cromosomas. Precisamente estos cambios en el material hereditario son los que revela el método *Multi-Color-Banding* según el color. Los cromosomas marcados de una célula tumoral son fluorescentes en todos los colores. Los defectos citogenéticos son claramente visibles, por ejemplo, cuando a uno de los dos cromosomas número cinco le falta un "rizo" azul a pesar de poseer la contrapartida normal, o cuando los colores de una secuencia están cambiados. A menudo se encuentran varios defectos de este tipo en una célula tumoral. Para el diagnóstico se necesita un programa de cálculo muy complejo –y ser hábil en ingeniería genética, porque para que los fragmentos de cromosomas se iluminen de colores se deben hibridar con sondas de DNA marcadas con fluorescencia. Tras un análisis *Multi-Color-Banding* citogenético de las células

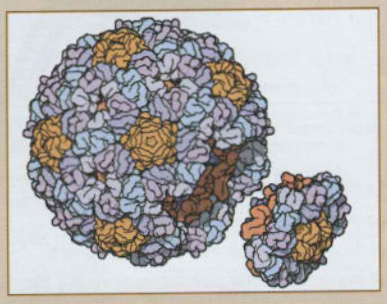




Fig. 10.36 *Thermus aquaticus* (abajo) de las fuentes termales del Parque Nacional Yellowstone.

Cuadro 10.5 Historia de la biotecnología: El proyecto del genoma humano

La idea de mapear todo el material genético humano aún se consideraba imposible a mediados de los años 1980. En aquel momento sólo se había mapeado el genoma completo de un virus diminuto. En 1977, **Fred Sanger** ya había analizado por completo el genoma del fago ΦX 174, con 5375 bases, pero hasta veinte años después no se pudo secuenciar por completo el genoma del primer organismo vivo libre (la bacteria *Haemophilus influenzae*).



El genoma del bacteriófago ΦX (aquí se muestra la estructura de la cápsula de la proteína, no el DNA) fue el primero que se secuenció en la historia de la humanidad.

Robert Sinsheimer, rector de la Universidad de California en Santa Cruz, en su búsqueda de un nuevo gran proyecto biológico reunió en su campus, en 1985, a los investigadores del genoma más influyentes. «¡Arriesgado y emocionante, pero no viable!» era la consigna. Pero **Walter Gilbert**, que recibió posteriormente el premio Nobel por su método alternativo de secuenciación del DNA (compartió el premio con Sanger) no se rindió. Encontró un aliado poderoso en **James D. Watson** (Cap. 3).

Después del fin de la Guerra Fría, el Ministerio de Energía norteamericano (*Department of Energy*, DOE) buscó nuevas tareas. El primer monedero repleto estaba disponible; no obstante, muchos investigadores dudaban todavía del sentido y la utilidad del proyecto. Amenazaba "una investigación increíblemente aburrida a escala industrial". El premio Nobel **Sydney Brenner** propuso en broma entregar la secuenciación del DNA a los presos: ¡cuanto más grave sea el delito, mayor será el cromosoma a procesar!

Otro temor era que casi no iba a quedar dinero para otras investigaciones biológicas. ¿Y qué se puede hacer con una secuencia de tres mil millones de letras que probablemente en un 97% no tiene función (directa)? ¿Era realmente competente el Ministerio de Energía? El *National Institute of Health* (NIH), la espléndida central de la investigación biomédica en Estados Unidos, también vaciló. Un comité especial de la *American Academy of Sciences* (AAS), compuesto por detractores y partidarios, recomendó finalmente un proceso por etapas: primero se tenía que elaborar un mapa general del genoma. Además, se debían abordar en paralelo los genomas de diferentes organismos simples, el de *Escherichia coli*, el de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el del gusano *Caenorhabditis elegans*, al mismo tiempo que probar técnicas nuevas.

El Congreso de Estados Unidos autorizó el dinero, pero en aquel momento el NIH también quería participar y en 1988 creó un puesto directivo para la investigación del genoma. Watson se convirtió en el comandante superior. Se puso manos a la obra: «Esta oportunidad en mi vida científica para recorrer el camino de la doble hélice y los tres mil millones de peldaños del genoma humano sólo se va a presentar una vez». De este modo, el NIH había logrado estar de nuevo en la cumbre de la investigación del genoma. Watson perseguía una doble estrategia: ¡desarrollar nuevas técnicas de mapeado y localizar rápidamente genes de enfermedades!

En 1989 se fundó la *Human Genome Organisation* (HUGO), una organización internacional con miembros pertenecientes a 30 países, la cual coordina todas las actividades para evitar la competencia innecesaria y la duplicación de trabajos. Todo parecía funcionar en armonía hasta que apareció en escena **Craig Venter**. Venter, que aún estaba trabajando en el NIH, no quiso desperdiciar tiempo con "chatarra" (la parte no funcional del DNA), sino "pescar" y patentar de inmediato los genes que podían ser rentables. Poco antes de la publicación del artículo de Venter sobre EST (*Expressed Sequence Tags*), el departamento de patentes del NIH solicitó la patente de los primeros 347 EST.

La reacción de los otros científicos fue de una cólera increíble. Watson dudaba públicamente de la "no obviedad" del procedimiento de secuenciación de Venter y lo denominó "el trabajo de un robot descerebrado". El programa EST también podrían "realizarlo los monos". Seguidamente, el equipo del laboratorio de Venter apareció con máscaras de gorila frente a los fotógrafos. El premio Nobel **Paul Berg**, el vicepresidente Al Gore, todos estaban de acuerdo: el genoma humano no debía patentarse.

Watson discutió con la directora del NIH, Bernadine Healy, quien insistía en la solicitud de la patente y en 1992 dejó su trabajo en el proyecto del genoma. La Oficina de Patentes rechazó en agosto de 1992, en una primera ronda, todas las solicitudes de patentes que se habían recibido hasta el momento. En 1994, el nuevo director del NIH, el premio Nobel **Harold Varmus**, retiró definitivamente todas las solicitudes.

Craig Venter abandonó el NIH en julio de 1992, pero en dirección contraria: una sociedad de capital de riesgo le ofreció 70 millones de dólares (que posteriormente se incrementaron a 85 millones) para poner en práctica sus planes. Craig Venter estaba encantado: «Éste es el sueño de todos los científicos: tener un benefactor que invierta en sus ideas, sueños y capacidades».



Un acontecimiento escenificado como la llegada a la Luna: Craig Venter (izq.), el Presidente Bill Clinton y Francis Collins (dcha.) anuncian la conclusión de la secuenciación del genoma humano. Bill Clinton: «Hoy conocemos el idioma en que Dios creó la vida».

La competencia estimula el negocio: la investigación estatal contra la industrial en el material hereditario humano. Toda la historia, tan emocionante como una novela policíaca, se puede leer en el libro de Kevin Davies que apareció en 2003: *Die Sequenz. Der Wettlauf um das menschliche Genom* (*La conquista del genoma humano*). Aquí sólo hay lugar para mencionar los puntos principales.

En 1995 Venter aclaró que él, junto con la Universidad John Hopkins, había mapeado por vez primera todo el genoma de un ser vivo libre: *Haemophilus influenzae*, una bacteria. Sólo en un año habían tenido éxito con el método de la escopeta (*shot gun*). El NIH había rechazado este método argumentando que no era fiable ni "digno de investigación".

En 1996, los "investigadores estatales" consiguieron presentar el genoma completo de

la levadura del pan (*Saccaromyces cerevisiae*). En mayo de 1998, Venter contraatacó afirmando que con su nueva empresa Celera Genomics podía secuenciar el genoma humano completo con la ayuda del método tan polémico de la escopeta, ¡por sólo 300 millones de dólares y sólo en tres años! El sucesor de Watson, **Francis Collins**, un pionero de la búsqueda de genes de enfermedades, anunció nuevos objetivos: en la primavera de 2001 el esbozo del genoma humano (90% de la secuencia completa) y en 2003 la secuencia completa, dos años antes de lo previsto. Venter se vengó sólo un año más tarde con el genoma completo de la mosca del vinagre *Drosophila*. En enero de 2000, por lo visto Celera había mapeado el 90% del genoma humano. El proyecto público comunicó dos meses más tarde que había descifrado dos mil millones de pares de bases.

La presión sobre los gallos de pelea del genoma aumentó. El DOE actuó de mediador y ambas partes acordaron publicar simultáneamente las dos versiones de las secuencias. Esto sucedió el 26 de junio de 2000: Craig Venter, Bill Clinton y Francis Collins dieron una conferencia de prensa. Obviamente, la presión de Clinton (y de Blair por parte británica) había vencido a corto plazo. Pero sólo cinco meses después, Venter se negó a hacer accesible su versión en una base de datos pública. Entonces, en febrero de 2001, la revista americana *Science* publicó el mapa del genoma humano de Venter y *Nature* el del proyecto público.

Pero no sólo existen diferencias entre la financiación y el trabajo de publicación, sino también en las estrategias fundamentales. Los investigadores del proyecto del genoma estatal "desmenuzaron" primero el genoma en porciones manejables y las volvieron a clasificar. Venter cortó primero el genoma mecánicamente en pedazos "rentables", pero secuenció los fragmentos de DNA antes de volver a unir al final todos los fragmentos.

El proyecto estatal había analizado el DNA de doce donantes anónimos. Además, corría el rumor de que Celera había secuenciado principalmente el DNA de un solo ser humano. Resultó que los "cazadores de escopeta" privados tan fabulosos y rentables no lograron salir adelante sin la información adicional de los investigadores públicos. El superordenador de Celera utilizó secuencias parciales de la competencia. ¡En realidad, ambos enemigos se complementaban, como ocurre tan a menudo en la vida!

cancerosas se puede determinar un pronóstico mucho más preciso para los pacientes sobre el desarrollo individual de su enfermedad, y así planificar una terapia adaptada a los riesgos.

10.17 La coronación de la biotecnología: el proyecto del genoma humano

En octubre de 1990 se inició el proyecto biológico mayor de todos los tiempos. En total se invirtieron aproximadamente 3000 millones de dólares americanos en medios de investigación. Biotecnólogos y biólogos moleculares trabajaron sin descanso para mapear los aproximadamente **3400 millones de pares de bases** existentes que están distribuidas en 23 pares de cromosomas humanos (Cuadro 10.5). En los 23 pares, cada juego procede respectivamente de una parte de los progenitores: 22 pares de cromosomas autosomales y dos cromosomas sexuales (femenino XX o masculino XY). Los 3400 millones de pares de bases contienen una cantidad de información increíble, que equivale a 200 guías telefónicas de Nueva York que tienen mil páginas cada una. Esto corresponde aproximadamente a 750 megabytes de información digital, pero ésta podría caber en un solo DVD (*Digital Versatil Disc*).

El cromosoma más pequeño, que produce la "minúscula" diferencia entre el hombre y la mujer, el **cromosoma Y**, tiene 50 millones de pares de bases, y el más grande (cromosoma 1) 250 millones. En comparación con esto, los "organismos modelo" como la mosca del vinagre *Drosophila* "sólo" necesitan diez guías telefónicas, la levadura sólo una y *Escherichia coli* 300 páginas de la guía telefónica de Manhattan.

Unas 6000 enfermedades son causadas, respectivamente, por un único gen dañado. Cuando se deletrea incorrectamente una palabra en el código genético, la célula no produce la proteína correcta o sintetiza una cantidad errónea de proteína.

En otras enfermedades complejas participan diversos genes, a menudo docenas de ellos: infarto de miocardio, arteriosclerosis, asma, cáncer... A lo que hay que añadir la interacción con venenos medioambientales (sustancias tóxicas) y la alimentación.

Enfermedades monogenéticas son, por ejemplo, la fenilcetonuria (PKU), la corea de Huntington (baile de San Vito) y la mucoviscidosis (fibrosis quística).

Los investigadores parten de la base de que para algunas enfermedades como el cáncer y el asma se pueden desarrollar estrategias de tratamiento y prevención totalmente nuevas conociendo el genoma humano.





Fig. 10.37 Arriba: Craig Venter y Bill Clinton. Abajo: Francis Collins.

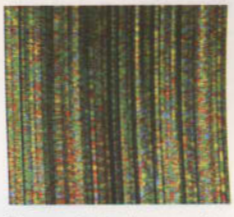


Fig. 10.38 Gel de secuenciación con marcadores fluorescentes.



Fig. 10.39 Típica impresión de una secuencia de DNA.

El DNA como un ovillo de lana

Supongamos que aumentamos una célula humana típica aproximadamente 300 000 veces hasta alcanzar el tamaño de una amplia sala de estar. En una esquina de la habitación hay un VW "escarabajo" que hace las veces de núcleo celular. De este modo, la molécula de DNA de un cromosoma se podría representar mediante un hilo de algodón de varios kilómetros de longitud, el cual se encuentra enrollado, retorcido y hecho un ovillo en uno de los 46 ovillos que se hallan en el interior del vehículo.

Según Boys Rensberger, *Life itself* (NY 1996)





Fig. 10.40 El principio de la supernova: ¿se puede sustituir la PCR por métodos más simples? Dieter Trau y la compañía 8 sens.bio-gnostic AG Berlín-Buch tuvieron la idea en 1997: el empaquetado más denso de los átomos se encuentra en los cristales (arriba un diamante). Sólo se utilizan cristales de fluoróforo como marcas para las sondas de DNA. Un cristal de 100 nm contiene cien millones de moléculas del fluoróforo. Cuando se utiliza este cristal como marcador, se convierte en insoluble al agua y se le une DNA de una hebra; después de las etapas de lavado, en teoría habría cien millones de moléculas detectadas unidas a una molécula de DNA. Si se añade un disolvente orgánico, el cristal se disuelve. Las moléculas fluorescentes se liberan y la solución brilla entonces con la luz fluorescente más brillante. ¡Casi como una supernova en el universo!





Para comprender un genoma hay que realizar tres análisis:

- **Genómico**: recogida de datos de la secuencia de DNA. Los datos se obtienen en forma de múltiples secuencias individuales de 500 a 800 bp, las cuales deben unirse posteriormente para formar la secuencia genómica continua. Para ello se necesita una estrategia de ordenación.
- **Posgenómico** o genómico funcional: hay que localizar genes, secuencias de control y otras características interesantes. Seguidamente se aclarará la función de los genes desconocidos descubiertos.
- **Bioinformático:** utilización de ordenadores de elevado rendimiento para la genómica y la posgenómica. Se elaboran secuencias de DNA relacionadas, se investiga la posible existencia de genes y se planifica la función genética. Debe registrarse una enorme cantidad de datos.

10.18 Mapas genómicos genéticos

El genoma de un ser vivo consta de miles de millones de pares de bases. Puesto que con las técnicas de secuenciación descritas, en la mayoría de los casos sólo se facilitan secuencias de 750 bp, las piezas del genoma deben encajarse. El proyecto público del genoma confiaba en los llamados **mapas genómicos** para encontrar las posiciones de las partes de secuencias cortas. Los mapas genómicos deben tener muchos **marcadores** claros y uniformes. Los componentes de los puzzles secuenciados deberán llevar, en la medida de lo posible, una referencia más o menos clara en un marcador. Existen dos tipos de mapas genómicos: los genéticos y los físicos.

Por métodos genéticos se pueden identificar ubicaciones de genes (cruces en seres vivos de laboratorio, análisis de árboles genealógicos en seres humanos). En 1994 se alcanzó el objetivo del proyecto del genoma humano de elaborar un **mapa genético** con un marcador por cada millón de pares de bases. Dos años después, el mapa tenía un marcador por cada 600 000 bp, es decir, se había depurado. Se basa en 5264 **microsatélites o STR** (*Short Tandem Repeats*), breves sucesiones repetidas de las bases CACACA. Este DNA en tándem aparece en todos los cromosomas. Se puede calcular su cantidad en un lugar del gen con la PCR. Se utilizan iniciadores que realizan la deshibridación a ambos lados del STR, como por ejemplo:

iniciador-CACACA-iniciador

y

iniciador-CACACACACACACACA-iniciador

y seguidamente, después de realizar la PCR, se calcula el tamaño de los productos por electroforesis en gel de agarosa. El primer producto de la PCR es más pequeño que el segundo y, por ello, circula más rápido por el gel. El genoma humano tiene como mínimo 650 000 STR.

Otros marcadores son los **RFPL** y los **SNP**. Ahora, los RFPL se detectan con iniciadores de PCR, PCR y luego por rotura por restricción y electroforesis. Se detecta la presencia o ausencia de un lugar de corte. Los SNP son lugares del genoma donde pueden aparecer como mínimo dos nucleótidos diferentes, es decir, mutaciones puntuales. Se detectan con sondas cortas de oligonucleótidos, las cuales se hibridan respectivamente sólo con una forma SNP.

Todos estos marcadores son variables, es decir, aparecen como mínimo en dos expresiones, o sea, formas de alelos. Analizando el árbol genealógico o realizando experimentos de cruzamientos se sigue el rastro de la herencia de los diferentes alelos en una ubicación de gen determinada (*locus*).

10.19 Mapas genómicos físicos

Un mapa genómico físico indica la ubicación de secuencias de DNA muy determinadas en la molécula de DNA de un cromosoma. Los marcadores de DNA son etiquetas de secuencia expresadas (EST, *Expressed Sequence Tags*) (Cuadro 10.6). Éstas son secuencias cortas que se obtienen a partir del DNA complementario (DNAc), es decir, a partir de secuencias parciales de genes.

La idea es que sólo los genes expresados en la célula se transcriben en el RNAm. Por consiguiente, cuando se utiliza este RNAm como material de partida y se convierte en DNA, se puede crear una biblioteca de los genes expresados. El propio DNAc se fabrica mediante la transcriptasa inversa a partir del RNAm (Cap. 3).

Si bien por la secuencia EST no se puede ver de qué gen se trata, se puede calcular rápidamente la **ubicación del gen**. Se utilizan dos métodos:

- Hibridación por fluorescencia *in situ* (**FISH**) (ver arriba): se utilizan simultáneamente dos sondas de DNA que están marcadas con otro fluorocromo. Cuando se amplían y se extienden los DNA cromosómicos, se pueden localizar los marcadores con mayor precisión.
- Se utiliza un **agente de mapeado**, una serie de fragmentos de DNA que se solapan, que cubre el gen o el cromosoma investigado.

10.20 La lucha de los métodos: Contig contra escopeta

En 1998, **Craig Venter**, que seis años antes había abandonado el proyecto del genoma humano, fundó su empresa Celera Genomics (detalles en Cuadro 10.5). En ella pretendía secuenciar el DNA humano más rápidamente que con el proyecto público del genoma.

Después de una competición incesante, en el año 2000 ambas partes "acordaron" presentar sus datos conjuntamente y al mismo tiempo. Las diferencias de opinión se referían básicamente a los distintos métodos utilizados: el de clonación Contig contra el de escopeta.

Las expresiones "mapeado antes de secuenciación" y "clon a clon" corresponden al principio del proyecto público del genoma humano.

En el **método de clonación Contig**, antes de la secuenciación se lleva a cabo una fase en la cual se identifica una serie de **clones que se solapan**. Muchas copias del genoma se separan con restrictasas. Se originan fragmentos de aproximadamente 150 000 pares de bases (150 kb). Estos fragmentos se clonan en cromosomas bacterianos artificiales (*Bacterial Artificial Cromosomes*, **BAC**) y se introducen en bacterias.

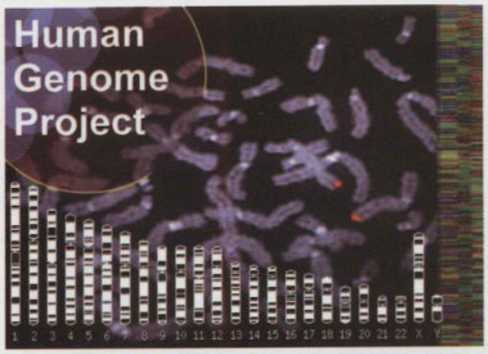
Los **cromosomas bacterianos artificiales** son vectores nuevos basados en los llamados plásmidos F. Éstos "incluyen" fragmentos de DNA de hasta 300 kb.

Con cada división celular bacteriana también se multiplican los fragmentos de DNA humano. Cada bacteria contiene una copia de DNA. Si se compara ésta con una enciclopedia de 23 volúmenes (según Thomas Weber), el resultado sería, por ejemplo, el siguiente:

El clon A contendría las páginas 26 a 49 del volumen 12
El clon B contendría las páginas 35 a 52 del mismo volumen 12
El clon C contendría las páginas 18 a 36 del volumen 12
El clon D las páginas 27 a 50.

No obstante, en realidad no sabemos qué páginas de qué volumen aparecen en un clon determinado. Lo que está claro es que la biblioteca de clones abarca todo el genoma.

Ahora, cada uno de los clones deberá colocarse en un contexto espacial con los otros clones. Para ello se volverán a tratar los clones con una o varias restrictasas, que generarán una huella dactilar del clon. Luego se utilizará la PCR para detectar la presencia



o ausencia de lugares de corte (antes se realizaban *Southern Blots*).

Seguidamente se secuencian los fragmentos de DNA clonados individualmente y esta secuencia se coloca en el lugar adecuado del denominado **mapa Contig**.

Si, por ejemplo, el clon A tiene marcadores (por ejemplo STR) en las páginas 42 y 46, las cuales también se encuentran en el clon B, entonces se podrán reconstruir las páginas 26 a 52. Si en el clon A hay marcadores en las páginas 27 y 30 que también aparecen en el clon C, entonces se podrá ampliar la reconstrucción hasta la página 18. Sin embargo, no se utilizan todos los clones: ya no tiene sentido incluir ahora el clon D (27 a 50). Por ello, se busca el número más pequeño de clones que se solapan parcialmente y que abarcan el genoma completo, lo que recibe el nombre de Contig. Éstos son 30 000 clones BAC en el genoma humano.

Los fragmentos de los BAC vuelven a ser demasiado grandes para realizar una secuenciación directa; se descomponen de nuevo en fragmentos más pequeños y se multiplican en subclones. ¡Por fin! Ahora éstos se secuencian con la versión más moderna del método de rotura de cadena de Sanger. Una cosa queda clara: ¡esto es lento y caro! ¿Cómo se puede hacer de forma más rápida y económica?

Craig Venter y Celera Genomics realizaron una **secuenciación con "escopeta"** (*shot gun*, disparo), que había tenido éxito en la secuenciación del genoma de *Haemophilus influenzae* en 1995.

Sin un mapeado previo, en aquel entonces el genoma de 1830 kb de tamaño se dividió en pequeños fragmentos según el **principio de la casualidad** (mediante ultrasonidos) y se analizó. En las secuencias generadas de este modo se buscan **solapamientos**. Naturalmente se tienen que poder identificar solapamientos entre todas las secuencias individuales; de lo contrario la escopeta no funciona. El DNA manipulado por ultrasonidos se separó

El "Top Ten" de las sorpresas del genoma

Dedicado a David Letterman, el maestro del *Late Night Show*, y pidiéndole excusas, Francis Collins presentó en el congreso anual de la *American Association for the Advancement of Science* (AAAS), en febrero de 2001, el "Top Ten" (aquí abreviado):

10. El genoma es muy "grumoso" – algunos cromosomas presentan una densidad genética mucho mayor que otros.

9. La cantidad total de los genes humanos es mucho menor que lo esperado.

8. Debido a sus empalmes alternativos, los genes humanos producen más proteínas.

7. Debido al crecimiento de otras zonas en cuanto a proteínas conservadas, los genes humanos están construidos de forma más refinada que en los demás organismos.

6. Más de 200 genes humanos no tienen parientes en la evolución en otros organismos pluricelulares, pero sí contrapartidas en las bacterias. Esto hace sospechar que son el resultado de una transferencia genética horizontal de las bacterias.

5. Las secuencias repetitivas de DNA son un tipo de "registro fosilizado", el cual data de hace aproximadamente 800 millones de años.

4. En realidad, el DNA *junk* (basura) tiene una función importante.

3. El coeficiente de mutación en el hombre es el doble que en la mujer. Por consiguiente, los hombres aportan la mayoría de las mutaciones genéticas al "*pool* genético", pero al mismo tiempo son los motores principales del progreso evolutivo.

2. Los seres humanos son idénticos en un 99,9%. La mayoría de nuestras diferencias genéticas se produce en diversas etnias y razas. No hay ninguna base científica para las categorías de raza exactas.

Y el **NÚMERO UNO**: estos conocimientos hacen hincapié en la importancia de poder acceder libremente y sin obstáculos a la secuencia del genoma.

Francis Collins recibió una ovación por parte del público puesto en pie.

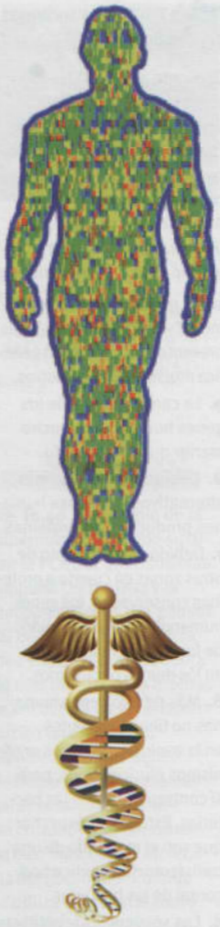


Fig. 10.41 Símbolos del proyecto del genoma humano.



Fig. 10.42 El proyecto *HapMap* registrará las variaciones genéticas del genoma humano.



Fig. 10.43 Los chips genéticos (*arrays* de DNA) facilitarán en teoría los análisis de los genomas de todos los seres vivos.

mediante electroforesis en gel. A partir del gel se purificaron los fragmentos y se clonaron en *E. coli*. Se obtuvo una **biblioteca de clones** con 19 687 clones. Con éstos se realizaron un total de 28 643 experimentos de secuenciación. Se desecharon las secuencias demasiado pequeñas. Sin embargo, las 24 304 restantes se introdujeron en el ordenador, que estuvo analizando los datos durante 36 horas: se obtuvieron 140 secuencias relacionadas (llamadas Contigs). En ese momento se podrían haber secuenciado aún más fragmentos manipulados con ultrasonidos para cerrar los huecos, pero se tomó la decisión de cerrar los huecos introduciendo sondas de oligonucleótidos y una biblioteca de fago λ (Cap. 5).

Los genomas bacterianos eran muy adecuados para la escopeta: pequeños y con pocas o ninguna secuencia de DNA repetitiva. No obstante, estas **secuencias repetitivas** en el genoma de los eucariotas pueden inducir una confusión absoluta con la escopeta, puesto que se generan solapamientos erróneos.

Por consiguiente, es muy difícil colocar los datos secuenciales en el orden correcto sin una ayuda orientativa debido al tamaño de la secuencia de DNA. Sin embargo, Venter desarrolló esquemas de cálculo complejos para poder ordenar la secuencia con la ayuda de ordenadores, pero finalmente se vio obligado a volver a recurrir a los mapas físicos del proyecto del genoma humano, públicamente accesibles.

Por tanto, en el caso de los genomas bacterianos, el método de la escopeta era sencillo: los genomas no sólo son pequeños, sino que contienen pocas secuencias de DNA repetitivas. Al añadir dichas secuencias repetitivas de genes de eucariotas, que pueden tener una longitud de hasta varias kilobases, se pueden producir posicionamientos erróneos. Sin embargo, se puede evitar esta limitación si para añadir las secuencias obtenidas con el método de la escopeta se utiliza un mapa genómico. ¿Cuál es el compromiso? El **"método selectivo de la escopeta"** como procedimiento rápido para la secuenciación de genomas grandes. La secuencia generada con el método de la escopeta se aplica constantemente en relación con un mapa genético.

10.21 ¿Cómo se continúa con el genoma humano?

El cromosoma Y masculino que se encarga de establecer una diferencia tan pequeña, y a la vez tan importante, consta casi exclusivamente de DNA *junk* (basura), bromeó James Watson. Por lo demás, los genes humanos constituyen oasis (¡aproximadamente un 3%!) en el inmenso desierto del DNA no codificado (es decir, DNA que no contiene instrucciones para producir proteínas, y a que falta de una mejor expresión se denomina "basura").

Hay que buscar secuencias de codificación para 3400 millones de letras del genoma, una tarea de la bioinformática. Éste no es el lugar para aclarar esto con precisión, pero al respecto hay que decir lo siguiente: lo decepcionante es que la joya de la creación "sólo" posee de 20 000 a 30 000 genes (principios del año 2005). Es interesante establecer una comparación: la levadura del pan tiene 6000 genes y el nematodo *Caenorhabditis elegans* 18 000.

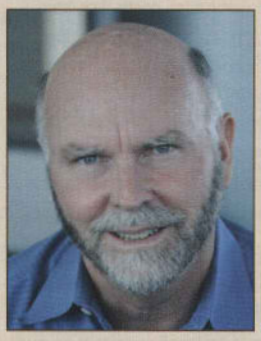
¡En el caso de las bacterias intestinales, un 78% son codificadoras y en las personas sólo un 3%! Recurriendo a la comparación con la guía telefónica de Manhattan: un 78% de las 300 páginas de las bacterias, es decir, 234 páginas, se pueden leer ahora "con sentido" y contienen información. Por el contrario, en el caso de los seres humanos, la información genética, que corresponde en total a 6000 páginas, está distribuida en dos millones de páginas. ¿Qué hay detrás de esto? Con toda seguridad no se trata de información genial de los extraterrestres, como especulan algunos autores de ciencia-ficción, ni del lugar donde se ubica el alma o el *CHI* chino (ver también Cap.9, RNAi).

Un consorcio internacional ha iniciado el **proyecto HapMap** (*map of haplotypes*) (Fig. 10.42), valorado en 100 millones de dólares, para poder representar la siguiente generación del genoma humano. El objetivo del proyecto es impulsar el descubrimiento de genes que intervienen en enfermedades muy extendidas, como el asma, el cáncer y la diabetes. En el consorcio están representados Estados Unidos, Japón, China, Canadá, Nigeria y Gran Bretaña, según comunicó el *National Human Genome Research Insitute* (NHGRI).

En tres años se deberá completar el proyecto *HapMap* y representar las variaciones genéticas dentro del genoma humano. Comparando las diferencias genéticas entre individuos –eso espera el consorcio–, los investigadores dispondrán de una herramienta para poder identificar la influencia de los genes en muchas enfermedades. Mientras que el proyecto del genoma humano constituyó la base de los descubrimientos genéticos, el *HapMap* debe ser el comienzo para poner en práctica los resultados de la investigación del genoma.

El DNA para el *HapMap* procede de muestras de sangre que han recogido investigadores de Nigeria, Japón, China y Estados Unidos. En principio los investigadores trabajarán con muestras de sangre de 200

Cuadro 10.6 Historia de la biotecnología: La impaciencia de Craig Venter o las etiquetas de secuencias



Craig Venter en la actualidad.

A Craig Venter le llegó la inspiración a diez kilómetros sobre el Pacífico, en un vuelo de regreso de Japón a Estados Unidos. El trabajo de Venter en el *National Institute of Health* (NIH) consistía en buscar un receptor para la hormona del esfuerzo, la adrenalina, la cual se halla en la superficie de las células cardiacas. Durante años, los investigadores se esforzaron en purificar las proteínas y en detectar los genes. ¡Un negocio lento y caro! En 1986, Venter voló a California, a *Applied Biosystems* (ABI), que había desarrollado un nuevo autómata de secuenciación. El nuevo sistema aplicaba el principio de Fred Sanger, pero utilizaba colorantes fluorescentes (en lugar de marcaje radiactivo), podía analizar 24 muestras a la vez con el ABI 373A y suministrar diariamente unas 12 000 letras del DNA. No obstante, la máquina costaba 100 000 dólares.

A principios de 1987 el laboratorio del NIH de Venter probó el nuevo "juguete" y secuenció genes de rata que tenían relación con el receptor de la adrenalina. El autómata era más rápido y, en conjunto, más barato que los métodos manuales existentes hasta el momento. Pero en realidad Venter quería algo más: detectar los genes más interesantes, por ejemplo un segmento en el brazo largo del cromosoma X (Xq28), en el cual se habían situado docenas de enfermedades de causa genética. Venter solicitó dinero al centro genómico del NIH, que estaba dirigido por el gran **James Watson**. La respuesta se retrasó indefinidamente.

Venter aprovechó el desmoralizador tiempo de espera para dos proyectos menores que tenían un significado primordial para la genética humana: la corea de Huntington (baile de San Vito hereditario) en el cromosoma 4 y la distrofia muscular (miotonía distrófica) en el cromosoma 19. Por una parte, los genes que se encontraron en ambos casos no eran directamente relevantes, pero los autómatas de secuenciación funcionaron de forma brillante con 60 000 y 106 000 bases. Entre los colaboradores de Venter se encontraba, por cierto, su futuro oponente, **Francis Collins**. Pero para Venter todo iba aún demasiado despacio.

¿La inspiración? Había que "concentrar" genes para secuenciar tramos cortos de DNA no codificador (en inglés *junk*-DNA). La naturaleza se engaña a sí misma en la trascripción (Cap. 3). El DNA de doble hebra se transcribe a RNA mensajero de una hebra y se elimina la "chatarra" (las secuencias no codificadoras o intrones). En este momento, el RNAm "lleno de significado" y maduro que codifica las proteínas logra pasar del núcleo celular a los ribosomas de la célula y allí se traduce (*translation*).



Venter en el laboratorio.

Cuando las moléculas relativamente inestables de RNA de una célula se aíslan, se purifican y se vuelven a convertir en DNA complementario (*complementary DNA*, DNAc), se obtiene una colección de DNAc, lo que se denomina una biblioteca de DNAc. Como hemos visto en el Cap. 3, esto se puede obtener con la transcriptasa inversa. El RNAm eucariota (sólo un 1 a 3% del RNA total en la célula) puede separarse fácilmente mediante una columna cromatográfica de afinidad, ya que en el extremo 3' lleva una secuencia de oligo-A (es decir, ...AAAAAA-3'). La columna contiene una matriz oligo-T con secuencias TTTTT y los AAAAA se hibridan allí y luego se eluyen con retraso por la columna.

La idea de Venter era tremendamente sencilla: junto con su colega **Mark Adams** produjo la biblioteca de DNAc de una neurona. Ésta contenía 10000 copias de genes activos en el cerebro. Para ello, el RNAm se reescribió en DNAc con la transcriptasa inversa, se integró en el plásmido bacteriano y se introdujo en las bacterias. En ese momento se logró hacer crecer las bacterias en una placa de Petri para formar colonias y luego seleccionar algunas. ¡Cada colonia contiene el DNAc de un gen todavía enigmático que se ha expresado en el cerebro! ¡Y este DNA se debía secuenciar! Seguidamente Venter comparó la secuencia de una longitud de 200 a 300 con los genes previamente identificados de otros seres humanos del banco de datos de genes público. Cada recorte de secuencia de DNAc se describió como una etiqueta de secuencia expresada (*expressed sequence tag*) o EST.

Así de sencillo y elegante era el plan. Sin embargo, el premio Nobel **Sydney Brenner** había dicho en 1986 que secuenciar el DNA basura era igual que pagar el impuesto sobre la renta: es inevitable, pero hay maneras de evitarlo, y en cualquier caso es uno de los problemas que podemos y en realidad deberíamos dejar a nuestros sucesores.

Sin embargo, Venter lo había conseguido de forma muy eficaz. Retiró su solicitud para secuenciar el brazo largo del cromosoma X que se había estado "cociendo" durante dos años y se quejó a Watson de que en ese tiempo había logrado secuenciar dos millones de letras. Luego anunció, en junio de 1991, su nueva estrategia EST en *Science*. Había descubierto 330 genes nuevos activos en el cerebro humano. Al fin y al cabo, el sistema nervioso se ve afectado por aproximadamente una cuarta parte de las 5000 enfermedades genéticas conocidas. En ese momento, el banco genético público del NIH contenía las secuencias de menos de 3000 genes humanos. Por tanto, en pocos meses, Venter había secuenciado más del 10% del total de todos los genes conocidos.



El legendario autómata secuenciador de DNA, ABI373 A.

Cuadro 10.7 Chips de DNA

Los chips de DNA y los *microarrays* de DNA no son más que una colección ordenada de moléculas de DNA con una secuencia conocida. Así pues, normalmente un *array* está dispuesto en forma de rectángulo o cuadrado. Puede constar sólo de cien unidades, pero también de algunas decenas de miles de unidades (por ejemplo 60×40, 100×100 o 300×500). Cada unidad es un punto exactamente definido en el espacio sobre la superficie del cristal, con un diámetro de menos de 200 µm. Contiene millones de copias de un fragmento de DNA corto y perfectamente definido. En el ordenador se puede consultar información sobre qué DNA se encuentra en un *array*.

Existen dos versiones:

1. Prefabricar el DNA y luego llevarlo a la superficie *(spotted microarray)*.
2. Sintetizar el DNA *in situ* (*high-density oligonucleotide chip*) sobre la placa de vidrio.

Affymetrix domina el negocio con chips *in situ* que precisan luz para colocar el DNA en puntos diminutos en un chip de cristal. Por lo general, los chips de DNA son pequeñas plaquitas de cristal o plástico. Normalmente llevan moléculas de DNA a distancias periódicas, principalmente oligonucleótidos muy cortos de una única hebra. Los "oligos" se sintetizan directamente en la superficie del chip. El proceso fotolitográfico lo desarrolló **Steve Fodor** junto con sus colegas de Affymetrix.

Dicho de una forma más sencilla, se utiliza radiación láser y siempre se cubre con máscaras una parte de los chips para protegerlos de la luz (**fotolitografía**). Sólo en los puntos iluminados se unen nucleótidos (es decir, A, G, C o T) en puntos de inicio especiales con la ayuda de energía luminosa alta. De este modo se pueden sintetizar en un solo chip moléculas de DNA de una hebra muy diferentes. Entretanto, ya se pueden colocar de 250 000 a 1 000 000 oligonucleótidos en un centímetro cuadrado (!).

Otra posibilidad consiste en verter gotitas de DNA sobre el chip con un robot y dejarlas secar. De este modo se pueden colocar varios miles de oligonucleótidos en el chip. También se aplica el principio de la impresora de chorro de tinta.

Seguidamente se colocan los fragmentos de DNA en el chip. (Cuando se parte del RNAm, éste se convierte en DNAc con la transcriptasa inversa.) El DNA se habrá "cortado en pedacitos pequeños" mediante enzimas de restricción. Además, los pedacitos de DNA de doble hélice que se van a analizar se deberán "fundir", es decir, convertirse en DNA de una hebra (esto se produce mediante calentamiento, ver también Cuadro 10.4). Sólo se unen en los lugares del chip que contienen bases complementarias.

Un "oligo" con la secuencia

CTTTTTTCCCCCC

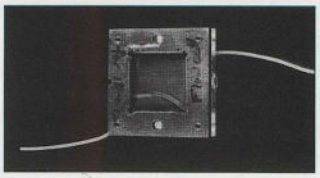
"pesca" un DNA de una hebra con la secuencia parcial

GAAAAAAGGGGG

De este modo, los fragmentos de DNA colocados en los chips (sondas de DNA) sirven como "codificadores" para la "pesca molecular" de fragmentos de DNA (*fish on chips* moleculares). Por tanto, a partir de una mezcla compleja de millones de diferentes moléculas de DNA, cada sonda de DNA puede pescar exactamente aquellas que coinciden genéticamente por completo (hibridación).

Se forma una doble hélice corta. Los fragmentos de DNA pescados se quedan, por consiguiente, "pegados" en un punto exactamente definido del chip de DNA. Cuando antes del experimento se aplican al DNA colorantes fluorescentes, esos puntos se iluminan con la luz láser y pueden detectarse con facilidad.

Si se examina el chip con un escáner láser, sólo se iluminan los puntos de los híbridos que han tenido éxito. Dado que el ordenador "sabe" de qué "oligos" se trata y en qué lugar del chip se encuentran, también se puede decir qué fragmentos rotos de DNA contenía la muestra.



El primer chip de DNA de Affymetrix.



Allen Yeoh (Universidad de Singapur) con un chip genético de Affymetrix en la mano y la imagen de *microarrays* con que se investiga la leucemia linfoblástica en los niños mediante el *Gen-expressions profiling* (medalla de oro en el Asian Innovation Award de 2003).

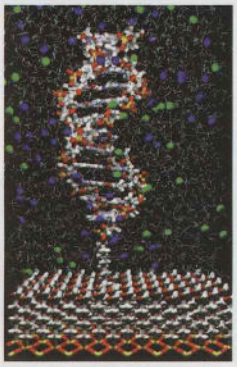


Fig. 10.44 Chip de DNA: un DNA de una hebra se hibrida con una sonda de DNA.

a 400 personas. Los resultados de los análisis estarán disponibles gratuitamente en Internet. Cuando se complete el *HapMap*, los datos estarán disponibles para los científicos de todo el mundo a fin de que puedan investigar los factores genéticos de riesgo para una gran variedad de enfermedades. Cualquier persona que esté interesada, puede enviar su DNA al *National Geographic Project* y reproducir los caminos que han seguido sus antepasados por 130 dólares.

El proyecto del genoma humano se extiende más allá de la investigación de las enfermedades genéticas. Hay que encontrar nuevos puntos de partida para medicamentos (farmacogenómica) y hay que lograr curar finalmente el cáncer.

10.22 ¿Cómo se puede entender la secuencia genómica?

Ahora tenemos la secuencia del DNA en el ordenador, pero... ¿Cómo se pueden localizar los genes que constituyen el 3% de oasis en el desierto? Si se conoce la secuencia de aminoácidos del producto de la proteína, prever la secuencia de DNA no supone un problema. Sin embargo, para la mayor parte de los genes no existe ningún tipo de información.

¿Por dónde hay que empezar a leer? La secuencia del DNA de un gen es una **"pauta abierta de lectura"** (*Open Reading Frames*, ORF). Se trata de una secuencia de tripletes que empieza con un

codón inicial (a menudo TAC, o sea AUG, en el RNAm) y acaba con un codón final: ATT (UAA), ATC (UAG) o ACT (UGA), que indica el final de una secuencia de codificación.

Hay que rastrear seis retículas de lectura, ya que los genes pueden estar ordenados en ambas direcciones en la doble hélice. Imaginemos una secuencia idealizada de DNA.

```
5'-TACATAGGAGTTGCCGTTAAATCCCATCTTACCACGACT-3'
3'-ATGTATCC TCAACGGCAATTTAGGGTAGAATGGTGCTGA-5
```

Por tanto, se puede leer en seis retículas de la siguiente manera:

```
TAC/A  ──────►  1ª lectura
 ACA/T ──────►  2ª lectura
  CAT/A ──────►  3ª lectura
5'-TACATAGGAGTTGCCGTTAAATCCCATCTTACCACGACT-3'
```

Y ahora, leído desde el "otro extremo":

```
3'-ATGTATCC TCAACGGCAATTTAGGGTAGAATGGTGCTGA-5'
4ª lectura  ◄──────  C/TGA
5ª lectura  ◄──────  G/CTG
6ª lectura  ◄──────  T/GCT
```

Traducimos la tercera lectura a RNAm (verde) y entonces a aminoácido (rojo):

```
5'-TA/CATAGGAGTTGCCGTTAAATCCCATCTTACCACGACT-3'
AU/GUA/UCC/UCA/ACG/GCA/AUU/UAG/GGU/AGA/AUG/GUG/CUG/A
   Val  Ser  Ser  Lys  Ala  Ile STOP!
```

La retícula no está abierta y mediante "UAG" se interrumpe y sólo se traduce parcialmente en el RNAm (¡STOP!). De este modo se pueden recorrer todas las retículas. Para abreviar: sólo la primera retícula de lectura de las seis está "abierta".

```
5'-TACATAGGAGTTGCCGTTAAATCCCATCTTACCACGACT-3'
AUG/UAU/CCU/CAA/CGG/CAA/UUU/AGG/GUA/GAA/UGG/UGC/UGA
Inicio Tyr Pro Gln Arg Gln Phe Arg Val Glu Trp Cys STOP!
```

¡Fantástico! Un péptido completo, y sin embargo una proteína diminuta.

En el caso de las bacterias esto podría funcionar así, pero en los eucariotas existen espacios intermedios enormes entre los genes, aunque también existen ORF cortos fortuitos que no son genes verdaderos. Muchos genes están divididos en exones e intrones.

Cuando se ha encontrado un gen de forma provisional, se buscan homologías en la base de datos, así como secuencias similares también con otros seres vivos. ¡Si se tiene suerte, a menudo se logra coordinar una función! Incluso se encontraron genes para el nematodo *Caenorhabditis elegans* y la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster* que también aparecen en los seres humanos.

10.23 La farmacogenómica

«Menos de la mitad de los pacientes a los que se prescriben los medicamentos más caros sacan algún provecho de ellos», afirmó **Allen Roses**, vicepresidente de genética de la multinacional GlaxoSmithKline (GSK) –un secreto a voces en la industria farmacéutica (Fig. 10.46). Los medicamentos para la enfermedad de Alzheimer tienen efecto en menos de uno de cada tres pacientes, los del cáncer sólo en uno de cada cuatro. Los medicamentos contra la migraña, la osteoporosis y la artritis sólo funcionan en la mitad de los pacientes. «Esto sucede porque los receptores tienen genes que interfieren con los medicamentos. La gran mayoría de los medicamentos, más de un 90%, funciona sólo en un 30 a 50% de los pacientes», aclaró Roses. Él es un experto en farmacogenómica.

En realidad, esto lo sabe cualquiera: a menudo, el mismo medicamento tiene efectos distintos en personas diferentes. El médico prescribe los fármacos basándose en la enfermedad correspondiente. Sin embargo, si pudiese tener en cuenta además la predisposición genética, esto supondría una revolución en medicina. Incluso se podrían reducir los efectos secundarios de los medicamentos. Cuando los investigadores del genoma identifican, por ejemplo, un grupo de genes que pueden desempeñar un papel en el cáncer de pulmón, éstos se pueden comparar entre pacientes sanos y pacientes con cáncer. Las diferencias (polimorfismos) entre ambas secuencias de genes pueden influir sobre la probabilidad de enfermar de cáncer. A menudo sólo se trata de pares de bases aislados que han mutado, por ejemplo, de A a G o de T a C (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP).

En este momento, la información sólo puede aprovecharse para **pruebas de diagnóstico**; se advierte en ese sentido a las personas con mayor riesgo de padecer cáncer. Además, el médico puede averiguar qué medicamento funciona mejor en cada paciente (Fig. 10.48). El gen β-2AR determina, por ejemplo, en qué medida responden los enfermos de asma al salbutamol (albuterol). El salbutamol abre las vías respiratorias distendiendo los músculos de los pulmones. En los seres humanos existen de cuatro a cinco expresiones diferentes (**alelos**) de este gen. Esto explica por qué el salbutamol no funciona bien en aproximada-





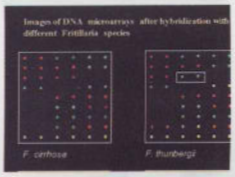


Fig. 10.45 Un ejemplo práctico de *Genotyping*: puede utilizarse el chip genético de Michael Yang (Universidad de la ciudad de Hong Kong y Genetel) para identificar hierbas medicinales chinas (arriba). La *Fritillaria cirrhosa* (en chino *Chuan bei mu*, centro) se utiliza para tratar la tos crónica y la tuberculosis; la *F. thunbergii* contra el cáncer de mama. El chip genético (abajo) constituye una clara prueba de identificación: una medicina falseada se identifica de inmediato.



Fig. 10.46 "Menos de la mitad de los pacientes a los que se prescriben los medicamentos más caros sacan algún provecho de ellos", declaró Allen Roses.

La alarmante baja eficacia de los medicamentos (según Allen Roses)

- Enfermedad de Alzheimer: 30%
- Analgésicos: 80%
- Asma: 60%
- Arritmias cardiacas: 60%
- Depresión (ISRS): 62%
- Diabetes: 57%
- Hepatitis C: 47%
- Incontinencia: 40%
- Migraña (aguda): 52%
- Migraña (profilaxis): 50%
- Oncología: 25%
- Artritis: 50%
- Esquizofrenia: 60%



Fig. 10.47 Chip genético de Affymetrix.

mente el 25% de los pacientes de asma. Una prueba con las variantes de la enzima citocromo P-450 (Cap. 4) aclararía si una persona reacciona ante ciertos antidepresivos. Otras pruebas podrían prever las reacciones a medicamentos que se suelen prescribir para la presión arterial elevada o la migraña (Fig. 10.48).

El pionero en el genoma humano, **Francis Collins** (Fig. 10.37), prevé que en el año 2010 se dispondrá ampliamente de pruebas para 25 enfermedades muy extendidas, las cuales permitirán a los hombres cambiar su estilo de vida. Hacia el año 2020 se dispondrá de medicamentos de diseño, basados en la genética, para la diabetes, la presión arterial elevada y muchas otras enfermedades comunes. En 2030 se habrán localizado los genes que controlan el proceso del envejecimiento, mientras que la secuenciación individual del DNA bajo petición costará menos de 1000 dólares.

En el año 2040, la medicina basada en la genética será habitual para identificar la mayor parte de las enfermedades antes de que se produzcan los síntomas, y elaborará terapias farmacológicas y genéticas individuales hechas a medida. ¡La medicina personalizada está a la vista! Entretanto, esta información, además de suponer una alegría para nosotros los pacientes, también alegra a otros grupos de personas: compañías de seguros, direcciones de empresas y gobiernos, así como a sus servicios secretos.

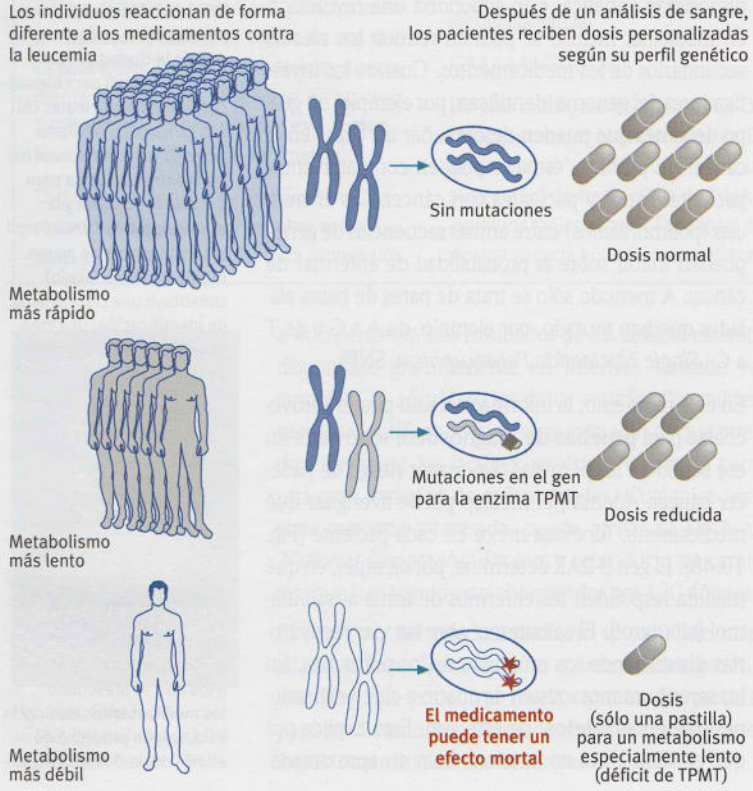


Fig. 10.48 Medicamentos con base genética.

Collins opina que todos somos portadores de cuatro o cinco genes verdaderamente nefastos y otra media docena que no son tan endiablados y que conllevan algún tipo de riesgo. Las personas no podrán seleccionar sus genes, y los genes tampoco deberían utilizarse contra ellos.

Para la propia industria farmacéutica, es prioritario desarrollar un diagnóstico muy eficaz de SNP debido a los costes elevados de la realización de pruebas clínicas para nuevos medicamentos (cientos de millones de dólares), sobre todo porque muchos medicamentos fallan en las últimas fases de prueba. El corazón de la "revolución de la medicina" se oculta en una plaquita del tamaño de un sello: "chips" de DNA o *microarrays* de DNA (Fig. 10.47).

10.24 Chips de DNA

Ha empezado una nueva revolución. Con los chips de DNA se puede determinar rápidamente, con tecnología de chips y escáner láser o análisis de imágenes CCD, qué patrón de DNA contiene una muestra (Cuadro 10.7).

Los chips de DNA –también denominados chips genéticos o ***microarrays* de DNA**– se desarrollaron a principios de la década de 1990. La empresa Affymetrix, Inc., de Santa Clara, California, Estados Unidos, tuvo la idea de colocar miles de sondas de DNA en microchips de cristal, de forma similar a transistores de silicona (Fig. 10.47). Para ello se readaptaron los métodos para producir chips informáticos. Desde entonces, la técnica de los chips de DNA se está desarrollando con una rapidez vertiginosa. Como máximo dentro de diez años, nuestra vida diaria será inconcebible sin chips de DNA.

Los chips genéticos se utilizan con frecuencia para analizar el genoma de los genes y sus actividades. Muchas pruebas de DNA necesitan docenas o incluso cientos de reacciones de hibridación para recibir toda la información. La idea del biochip permite que todo se lleve a cabo en una muestra diminuta, ya que el chip también es muy pequeño y todo cabe en un chip. Las aplicaciones son infinitas:

- Los perfiles de expresión miden el RNA total en la célula: qué genes contienen, cuánto RNA, cuántas proteínas y en qué tiempo determinado.
- Prueba de mutación de una secuencia de DNA, por ejemplo para la investigación del sida y del cáncer y para la farmacogenómica.
- Análisis de SNP.

Cuando hay suficientes sondas de DNA en un biochip, con ellas se puede secuenciar el DNA. Esto reci-

be el nombre de *Sequencing by Hybridization* (SBH). Sin embargo, probablemente lo más práctico sea el análisis de SNP para medicamentos personalizados.

10.25 Descubrir las causas de las enfermedades: perfiles de expresión genética

Con la ayuda de perfiles de expresión (como en la levadura, Fig. 10.43) se intenta localizar los cambios de la actividad de los genes humanos que se producen a causa de una enfermedad.

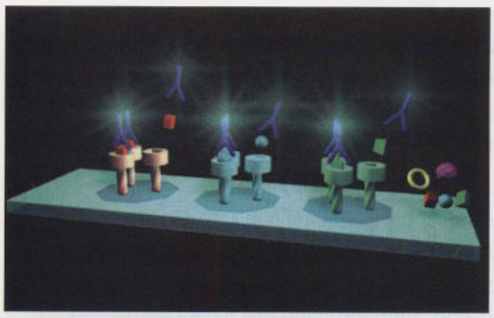
Para descubrir qué genes están activos en los tejidos sanos y en los enfermos, en primer lugar se aíslan los RNAm de ambas muestras de tejido. A partir de ahí, con transcriptasa inversa se fabrican copias de DNAc marcadas con fluorescencia y se colocan sobre chips genéticos cargados con miles de fragmentos de genes. Si los DNAc marcados se unen con sus fragmentos complementarios en el chip, se revelan los genes activos. A menudo, una comparación de perfiles de expresión suele requerir diferencias de actividad en varios cientos de genes al día. Seguidamente se trata de encontrar los genes que realmente desencadenan la enfermedad.

Se aplica una serie de métodos a partir de la investigación funcional del genoma para evaluar los genes candidatos, es decir, los que se sospecha que causan la enfermedad. En primer lugar se consultan los bancos de datos respecto a la función de los genes identificados. Los genes que, según esta información, no participan aparentemente en los daños causados al conjunto celular, quedarán excluidos. Al final de la serie de experimentos suelen realizarse principalmente las investigaciones de unos pocos genes candidatos en modelos animales. Ahí se prueba si las modificaciones genéticas en el animal producen el mismo cuadro clínico que en los seres humanos. Sólo entonces se puede considerar segura la participación de un gen en la producción de una enfermedad a nivel molecular.

Desde 1995 existe la tendencia a analizar globalmente la expresión genética, en la cual se siguen al mismo tiempo los perfiles de expresión de miles de genes. Será posible seguir todo el **transcriptoma**, es decir, todos los RNAm de la célula. De este modo podrán identificarse todos los genes que participan en el proceso médico en cuestión.

10.26 La proteómica

El análisis del transcriptoma (RNAm) que acabamos de describir parece ser una forma útil de estudiar y caracterizar las enfermedades, así como de prever nuestra reacción ante los medicamentos o las modificaciones del medio ambiente. Sin embargo, las moléculas funcionales actuales de la célula no son de RNAm, sino de proteínas. La existencia de un transcripto (es decir, el RNAm) no siempre se correlaciona con la proteína correspondiente, ya que a menudo la síntesis de proteínas se regula de forma independiente.



Los conceptos, propuestos en 1995, de "**proteómica**" o "**análisis proteómico**" se refieren a la investigación del equipamiento total de proteínas de una célula, un tejido o un organismo completo. En los organismos superiores se supone que, a partir de un gen, se producen como término medio diez proteínas. La expresión, función e interacción de proteínas conectadas entre sí es la proteómica o la genómica funcional.

En general, el análisis del proteoma se puede dividir en dos partes conectadas entre sí: la obtención de muestras y la separación de las proteínas individuales, y seguidamente la identificación de proteínas y el análisis de la estructura fina de la proteína (modificaciones).

Para la separación de muestras, la mayor parte de las veces se aplica electroforesis bidimensional (2D) en gel de poliacrilamida (PAGE). Al igual que en la electroforesis en gel de agarosa de los ácidos nucleicos, aquí la separación tendrá lugar según la movilidad hidrodinámica (las proteínas más pequeñas se mueven con más rapidez), pero también adicionalmente según la carga.

Al contrario que los ácidos nucleicos, las proteínas no están cargadas de forma unitaria. Las proteínas con carga total negativa se desplazan hacia el polo positivo (ánodo) de la electroforesis, y las que tienen carga positiva hacia el cátodo.

La forma especial de este método, la **PAGE-(SDS)** con dodecilsulfato de sodio, desnaturaliza la proteína en primer lugar en presencia de mercaptoetanol (que reduce los posibles puentes disulfuro S-S a grupos SH) (Fig. 10.50). El SDS es un detergente aniónico (tensoactivo) que está totalmente disociado. Destruye casi todas las interacciones no covalentes dentro de la proteína (es decir, especialmente los puentes de hidrógeno) y "despliega" así todas las estructuras de proteínas, forma luego **micelas** y, de este modo, enmascara las diversas cargas de la pro-

Fig. 10.49 Visión de un chip proteínico.

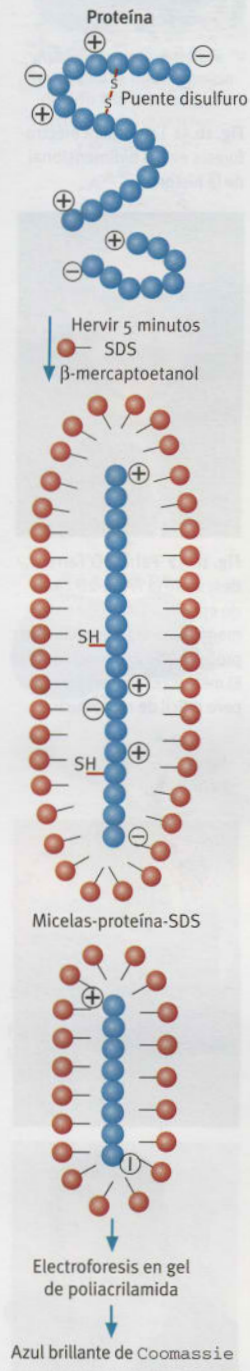


Fig. 10.50 Principio de la PAGE-SDS.



Fig. 10.51 La primera electroforesis en gel bidimensional de la historia.

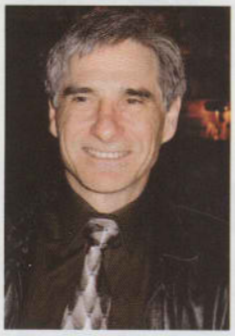


Fig. 10.52 Patrick O'Farrell descubrió la PAGE-2D cuando era estudiante. De este modo logró separar miles de proteínas de *Escherichia coli*. El método es importante, pero difícil de reproducir.





Fig. 10.53 Franz Hillenkamp construyó, en la Universidad de Münster, el primer espectrómetro de masas *Time-of-flight* (TOF). Arriba: un espectrómetro de masas de elevado rendimiento.

teína. Entonces, la carga neta negativa de la micela es proporcional al tamaño de la molécula (como en los ácidos nucleicos). Las proteínas desnaturalizadas cargadas con SDS se pueden separar seguidamente en geles, al igual que los ácidos nucleicos.

A continuación, la proteína se revela en el gel marcándola normalmente con azul *Coomassie*, de forma que se obtienen bandas azules. De todos modos, se pueden detectar 0,1 microgramos de proteína, dando como resultado una banda visible.

Un método más reciente es la **electroforesis en gel bidimensional** (2D-GE) (Fig. 10.51). En primer lugar, ésta utiliza el enfoque isoeléctrico: se crea un gel vertical con un gradiente de pH (pH inferior respecto a pH superior). Posteriormente se extiende la muestra de proteína y se aplica una corriente eléctrica. Las proteínas se desplazan hacia su valor de pH isoeléctrico, es decir, hacia donde su carga neta sea igual a cero. De este modo se forman bandas. Luego se incuba en gel con SDS, se coloca horizontalmente sobre un gel de poliacrilamida con SDS y se realiza una electroforesis. Así se crea una muestra de puntos bidimensional. Por consiguiente, las proteínas se separan en una dirección según su carga y seguidamente en ángulo recto según la masa.

Sin embargo, la mayoría de los investigadores no están del todo satisfechos con la electroforesis en gel bidimensional, especialmente con su precisión y reproducibilidad. Otra solución consiste en el espectrómetro de masas (MS). Después de la separación mediante electroforesis en gel bidimensional, los puntos de las proteínas que hayan aparecido en éste se extraen con un instrumento punzante, son digeridos por una proteasa (como la tripsina) y se fragmentan en péptidos. Mediante estos péptidos se pueden identificar entonces las proteínas por espectrometría de masas.

10.27 MALDI: Un gas de iones de proteínas

Los espectrómetros de masas se desarrollaron en principio para poder detectar átomos ionizados de elevada sensibilidad. También se utilizan desde hace mucho tiempo para analizar pequeñas moléculas inorgánicas y orgánicas. No obstante, hasta hace poco tiempo no se había logrado realizar el análisis por espectrometría de masas de biomoléculas tan grandes como las proteínas y el DNA, aunque deben separarlas individualmente de su entorno acuoso, trasladarlas al vacío del espectrómetro de masas y dotarlas de una carga sin que se rompan en pedazos.

Es algo así como si se dejase a un astronauta en el universo sin traje espacial. ¡Sin trucos, las moléculas tan grandes y cargadas no son volátiles!

Uno de los trucos actuales se llama ***Matrix-Assisted Laser-Desorption Ionization*** **(MALDI),** desarrollado a finales de los años 1980 por **Franz Hillenkamp** (Fig. 10.52) y sus colaboradores de la Universidad de Münster.

Se integran las proteínas en cristales de moléculas que absorben rayos UV. Esto se hace, en la mayoría de los casos mezclando las soluciones de la matriz y las moléculas de proteínas sobre un soporte metálico, y se espera hasta que se haya volatilizado el disolvente. El soporte con los cristales que llevan proteínas se introduce entonces en vacío elevado y se irradia la muestra con un impulso láser UV muy corto e intenso. De este modo se liberan al vacío las moléculas de la matriz que absorben la radiación UV como si se produjese una explosión, y con ellas también las proteínas. En este proceso también se transfiere carga positiva o negativa a algunas proteínas.

Por lo general, los iones generados mediante MALDI se analizan con un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo (TOF, de *time-of-flight*). Los iones vuelan por un tubo de vacío de aproximadamente 1 m de longitud y se mide su tiempo de trayectoria típico, más o menos una millonésima de segundo. Previamente, los iones de las proteínas aún se aceleran mediante un campo eléctrico. Las proteínas con igual carga pero diferente masa vuelan con distinta velocidad. Un ion de una proteína de masa más pequeña vuela más rápidamente que uno que tenga una masa mayor, y un ion de proteína con dos cargas se mueve el doble de rápido que la misma proteína con una sola carga. Así que los tiempos de vuelo se correlacionan con la relación masa/carga (m/z)de las proteínas, y estos tiempos de vuelo los mide un analizador. Un buen espectrómetro de masas MALDI-TOF determina la masa de una proteína con una precisión de hasta un 0,01‰.

Por consiguiente, un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo funciona como una electroforesis en gel con SDS rápida y exacta: en ambos casos se determinan recorridos o tiempos de marcha de moléculas cargadas. Los espectrómetros de masas son un complemento ideal del enfoque isoeléctrico; no obstante, estos aparatos son caros.

El segundo método para generar iones de moléculas mayores es el ESI (*Electrospray Ionization*).

10.28 Aptámeros y chips de proteína

Los *microarrays* de proteínas se fabrican de modo análogo a los *arrays* de DNA (Fig. 10.49). Los *arrays* contienen agentes especiales de captura, por ejemplo anticuerpos. Pueden leerse con los espectróme-

tros de masas (como MALDI-TOF) o con marcadores fluorescentes. Sin embargo, los chips de proteínas aún no están ni remotamente al nivel de los chips de DNA, entre los que se encuentran chips con 100 000 y más puntos que indican la presencia y la cantidad relativa de RNA en el extracto celular.

El bioquímico especialista en proteínas Hubert Rehm, redactor del popular *Laborjournal* de Freiburg, comenta: «Incluso al bioquímico especialista en proteínas le gustaría tener un juguete así; lo ideal sería tener un chip en el cual simplemente introdujese extracto celular y, al cabo de media hora, le informase de la cantidad, el tipo, la modificación y la concentración de cada proteína en la salsa. Los más osados incluso exigirían chips que determinaran adicionalmente la concentración de metabolitos como la glucosa, el lactato, etc., y la de oligosacáridos y polisacáridos [...]. Sin embargo, para chips de proteínas se necesitan unos cientos de miles de diferentes anticuerpos monoclonales...». En conclusión: ¡en realidad no es viable!

Pero también hay otras ideas: los **aptámeros**. Los aptámeros son oligonucleótidos de DNA o RNA (15 a 60 nucleótidos) que se unen a las proteínas de forma específica. Son ligeros, baratos y se pueden fabricar en grandes cantidades en sintetizadores de DNA. Se utilizan cada vez más como sustitutos de los anticuerpos y se fabrican contra iones (como Zn^{2+}) del mismo modo que contra el ATP, péptidos, proteínas y glicoproteínas. Por una parte, son inferiores a los anticuerpos en cuanto a especificidad, pero se pueden utilizar como indicadores de uniones (Fig. 10.53): en el extremo 5' del nucleótido, el aptámero se marca con una sustancia colorante fluorescente, y en el extremo 3' con un *quencher* (una molécula que suprime la fluorescencia). Cuando no está presente el analito, el aptámero forma un bucle y su fluorescencia se suprime. Si, por el contrario, se une al analito, el bucle se anula. ¡El *quencher* se aleja del fluoróforo y el aptámero resplandece fluorescente!

10.29 ¿Finalmente el control a través del genoma humano?

Los pesimistas como **Stephen Hawking** opinan: «En los últimos 10 000 años casi no ha habido cambios significativos en el DNA humano. Sin embargo, pronto podremos aumentar la complejidad de nuestra escritura interna, nuestro DNA, sin tener que esperar al proceso lento de la evolución biológica [...], por ejemplo aumentando nuestro cerebro [...]. A pesar de todo el rigor concebible de las limitaciones legales, alguien en alguna parte mejorará a los seres humanos».

Por el contrario, los optimistas como **James D. Watson** afirman: «La genética en sí nunca puede ser mala. Sólo cuando la utilizamos o hacemos un mal uso de ella entra en juego la moral» (citado según Davies, 2003).

10.30 ¿*Quo vadis* biotecnología?

«En el futuro, los ordenadores [...] quizá pesen sólo una tonelada y media» (Desarrollo de los ordenadores, estudio de 1949).

Con estas perspectivas tan prometedoras a la vista, queremos intentar prever cuidadosamente lo que nos espera. En este caso, el autor se basa concretamente en un análisis de **Oliver Kayser** de la Universidad de Groningen.

La valoración la puede hacer el propio lector. Aquí se han recogido **pronósticos** procedentes de las fuentes más diversas.

- En el caso de la cerveza, el vino, el pan y el queso (Cap. 1), habrá cada vez más microorganismos manipulados por ingeniería genética que realizarán el trabajo. ¡Las cepas "entrañables" se modificarán probablemente sin que el buen sabor se vea afectado, sino todo lo contrario!
- La agricultura (Cap. 7) utilizará claramente menos pesticidas y abonos; los propios agricultores ya no se verán expuestos a tantas sustancias tóxicas. Por otra parte, la diversidad de especies se reducirá de forma drástica. La dependencia de los grandes "consorcios biotecnológicos de pesticidas, abonos y selección de semillas" se verá reforzada; una tendencia del desarrollo económico de la que, por cierto, no tienen la culpa las nuevas tecnologías.
- El bioplástico degradable y los microbios trabajando como "barrenderos" cargarán menos el medio ambiente o lo limpiarán (Cap. 6).
- En el sector farmacéutico (Cap. 4 y Cap. 9), la biotecnología adquirirá una gran influencia. La técnica genética, la producción de vacunas (Cap. 5) y el diagnóstico revolucionarán el tratamiento de enfermedades hasta ahora incurables.
- Aparecerán nuevos medicamentos biotecnológicos: acaba de autorizarse la comercialización de un oligonucleótido antisense para las infecciones oculares por citomegalovirus (CMV) (*Vitravene®*). Antes, los enfermos de sida se quedaban ciegos de forma irreversible por esta causa.
- La *Pharmaceutical Research and Manufacturers of America* (PhRMA) habla de 369 medicamentos en la cartera de proyectos en desarrollo que parece que pueden curar 200 enfermedades: las enfermedades autoinmunitarias, el asma, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple y el cáncer.

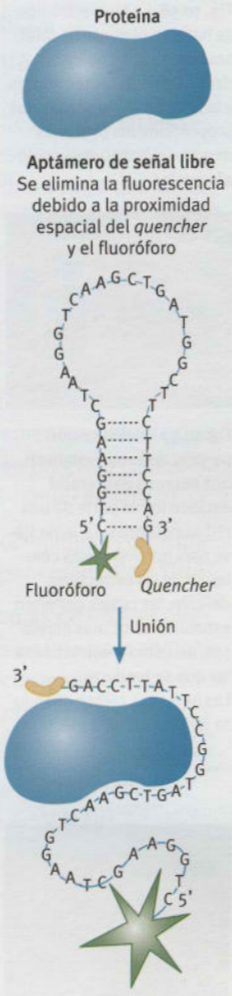


Fig. 10.54 Cómo funcionan los aptámeros.



Fig. 10.55 Cómo se une un aptámero (RNA) a un sustrato (teofilina) (rojo).



Fig. 10.56 La bioelectrónica se halla en el punto de intersección de la tecnología de los chips, la biotecnología y la informática, y será la que proporcione los próximos descubrimientos en tecnología punta.



Fig. 10.57 Investigación puntera de Peter Fromherz: una neurona del caracol del lodo forma parte de una red de neuronas. La jaula sirve para inmovilizar las células sobre las estructuras del chip, las cuales permiten estimular las células nerviosas, así como medir las señales que se producen. Las neuronas crecen cuando se forman sinapsis eléctricas.



Fig. 10.58 Célula nerviosa del cerebro de una rata sobre un chip de silicio. En el centro se pueden reconocer los transistores de efecto de campo, con los que se miden las señales de la neurona.



Fig. 10.59 Nanobiotecnología: ATP sintasa utilizada para un nanopropulsor. Se añadieron tres aminoácidos que contenían azufre para fijar el motor a la base. Al añadir ATP, el propulsor gira (azul).

- En la actualidad, los fármacos biotecnológicos cubren un 5% del enorme mercado farmacéutico mundial. Este valor previsiblemente aumentará, hasta el año 2050, a un 15%.
- Desde 1995, el número de patentes biotecnológicas está creciendo anualmente un 25%.
- Las vacunas contra el sida y la malaria (Cap. 5) serán posibles y efectivas.
- El crecimiento explosivo del diagnóstico genético (Cap. 10) permitirá crear un perfil genético personal en una hora por cien euros.
- Cientos de nuevas pruebas genéticas e inmunológicas aumentarán la seguridad de los productos derivados de la sangre. Tiras de pruebas biológicas y biochips económicos probarán al mismo tiempo varios parámetros en pocos minutos (por ejemplo el riesgo de infarto de miocardio). Las pruebas también las podrán efectuar los profanos en su casa.
- La medicina personalizada y el diagnóstico con biochips adquirirán interés industrial en los próximos diez años.
- La proteómica y la farmacogenómica descubrirán marcadores desconocidos hasta hoy y tratarán enfermedades antes de que se declaren.
- Mediante el xenotrasplante de órganos de animales transgénicos (Cap. 9) se acabará con la falta crónica de órganos de donantes.
- La ingeniería de tejidos (*Tissue egineering*) creará, entre otros, narices nuevas y piel nueva. Los sistemas biohíbridos servirán de soporte a las funciones hepática y renal.
- Las células madre (Cap. 9) se convertirán en una terapia decisiva para las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, la leucemia y los defectos genéticos como la deficiencia de adenosina-desaminasa (ADA) y la fibrosis quística (CF). No obstante, no se espera un avance masivo en los próximos diez años. Continuará la discusión sobre las implicaciones éticas y sociales para convencer a la opinión pública y para sondear los riesgos, en tanto que la utilización pública ciertamente hará que aumente el grado de simpatía de los pacientes hacia la tecnología. Hay que respetar totalmente las serias dudas de todas las partes.
- En la primera década del siglo XXI la biotecnología experimentará un crecimiento explosivo, ya que coincidirán ordenadores más potentes, técnicas de laboratorio automatizadas y conocimientos del genoma, las proteínas (proteoma) y el metabolismo.
- La biotecnología se utilizará cada vez más en los individuos y la sociedad. La biotecnología que salva vidas llegará cada vez a más personas. De este modo aumentará su aceptación.
- Actualmente, los costes de desarrollo de un medicamento ascienden a 880 millones de dólares americanos y se tardan 15 años desde el inicio hasta que llega al mercado. Un 75% de los costes se debe a intentos fallidos. Mediante la tecnología genómica se espera reducir los costes a 500 millones, con un ahorro de tiempo de un 15%.
- En el año 2015 se habrá sustituido el 30% de los medicamentos de bajo peso molecular por medicamentos de ingeniería genética.
- Desde el año 2010 en adelante, las plantas y los animales transgénicos (Cap. 7 y Cap. 8) producirán importantes proteínas humanas con el *GenePharming*.
- Se espera que la ingeniería genética y los nanorrobots lleguen entre 2010 y 2018.

La **nanobiotecnología** es probablemente la interfase más interesante del futuro. Utiliza las biomoléculas para construir máquinas moleculares, por ejemplo nanobiomotores que pueden funcionar con ATP, como los flagelos de las bacterias (Fig. 10.58).

La **bioelectrónica**, con los biosensores para la glucosa, ya tiene los primeros productos en el mercado y ahora hace que crezcan neuronas sobre chips que transmiten las señales a éste (Figs. 10.55 y 10.57).

Epílogo

¿Qué vaticinó Victor Hugo? «No existe en el mundo nada más poderoso que una idea a la que le ha llegado su momento».

¡Ha llegado el momento de la idea de la biotecnología, y todos nosotros experimentaremos desarrollos fantásticos!

Bibliografía utilizada y aplicada:

- El manual de biotecnología más actual de Estados Unidos: Barnum S R (2005) Biotechnology. An Introduction. 2nd ed., Thomson-Brooks/Cole Belmont
- El mejor manual de genómica, pero más bien para expertos: Primrose S B, Twyman R M (2004) Genomics. Applications in Human Biology. Blackwell Publishing, Malden
- Emocionante y fundado, informa sobre el proyecto del genoma humano: Davies K (2003) Die Sequenz. Der Wettlauf um das menschliche Genom. DTV, München
- ¡La visión del futuro sobre el genoma, en inglés, pero es imprescindible leerlo! Collin F, Green E D, Guttmacher A E, Guyer MS (2003) A vision for the future of genomics research. *Nature* 422: 835-845
- La obra estándar para el laboratorio de proteínas; por fin se entiende qué se ha hecho siempre mal: Rehm H (2002) Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Introducción brevísima, didácticamente bueno: Weber T P (2002) Schnellkurs Genforschung. DuMont, Köln
- El fascinante mundo de la genética humana bien explicado: Cummings M R (2003) Human Heredity. Principles and issues. 6th ed., Thomson-Brooks/Cole, Pacific Grove
- De la genial creadora de los gráficos moleculares de este libro: Goodsell D S (2004) Bionanotechnology. Lessons from Nature. Wiley-Liss, Hoboken
- Escrito por el bioeticista más importante de Alemania: Reich J (2003) Es wird ein Mensch gemacht. Möglichkeiten und Grenzen der Gentechnik. Rowohlt, Berlín
- Compendio contra una industria biotecnológica orientada a obtener beneficios: Rifkin J (2000) Das biotechnische Zeitalter. Die Geschäfte mit der Gentechnik. Goldmann, München

Enlaces de web

- Curso de formación sobre la técnica de huellas dactilares de DNA: *www.fbi.gov*
- Buena introducción al FISH en alemán: *www.miszalok.de/Lectures/L13_Fish/Fish_deutsch.htm*
- Animación de la PCR: *www.dnalc.org/shockwave/pcranwhole.html*
- Sobre el proyecto del genoma humano, HUGO: *www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/home.shtml*
- El proyecto alemán del genoma humano: *www.dhgp.de/deutsch/*
- El *National Human Genome Research Institute*: *www.genome.gov/*
- Farmacogenómica: *www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/pharma.shtml*
- Análisis críticos sobre diagnóstico genético: *www.genewatch.org*

Ocho preguntas de autoevaluación

1. ¿Qué enfermedad está en vías de convertirse en la número uno y cómo pueden ayudar los biosensores a identificarla y controlarla?
2. ¿Qué sustancia química detecta una prueba del embarazo? ¿Funciona inmediatamente después de haber fecundado el óvulo?
3. ¿Qué característica del DNA y de sus fragmentos permite que se muevan en un gel al cual se ha aplicado un campo eléctrico?
4. ¿Qué dos posibilidades principales existen para multiplicar DNA?
5. ¿Cuántas copias de DNA se pueden obtener en una hora con una de las técnicas mencionadas en la pregunta cuatro cuando un ciclo dura tres minutos?
6. ¿Qué ocurre con las moléculas de proteína en MALDI?
7. ¿En qué se diferencia el método de "escopeta" del proceso Contig en el proyecto del genoma humano y cuál produjo resultados fiables más rápidamente?
8. ¿Qué se oculta tras los conceptos genómica y proteómica?

Créditos de las ilustraciones

Abreviaturas de los datos de origen:
AKD: Archivo Bernt Karger-Decker
DG: David Goodsell, The Scripps Institute La Jolla
FB: Francesco Bennardo, Italia
KS: Colección Kurt Stüber, BioLib
RR: Reinhard Renneberg, el autor del libro, de quien proceden muchas de las ilustraciones, sólo se menciona junto con otros propietarios de derechos de autor.
UV: Reinhard Renneberg y Archivo Bernt Karger-Decker en: Renneberg R (1990) Bio-Horizonte. Editorial Urania Leipzig

Las ilustraciones que no se mencionan proceden del archivo del autor, de Internet o de otras fuentes para las que no se pudo averiguar quién era el propietario de los derechos de autor.

Capítulo 1
1.1 UV, Museo de la ciudad de Leiden; 1.2 Museo alemán del pan, Ulm; 1.3 de Kruif P (1940) Mikrobenjäger, Orell Füssli, Zürich, Leipzig y RR; 1.4 UV; Cuadro 1.1 UV y de Kruif (1940) Mikrobenjäger; 1.5. FB y RR; 1.6 UV; Cuadro 1.4 modificado según Präve P, Faust U, Sittig W y Sukatsch DA (Hrsg.) (1984) Handbuch der Biotechnologie. Editorial R. Oldenbourg Munich, Viena; 1.13 hasta 1.15 DG y RR; Cuadro 1.5 UV y RR; 1.16 AKD; 1.18 UV; 1.23 hasta 1.26 KS; Cuadro 1.7 P. MacGovern y Palastmuseum Taipeh; 1.27 S. Shimizu, Kyoto University; Cuadro 1.8 UV; 1.29 y 1.30 Saburo Fukui

Capítulo 2
2.1 hasta 2.4 © The Nobel Foundation; 2.5 y 2.6 DG; Cuadro 2.2 © The Nobel Foundation y UV; 2.7 KS; Cuadro 1.3 Institut Pasteur, París; 2.9 David Phillips; 2.13 Saburo Fukui; Cuadro 2.4 UV y David Phillips; 2.14 hasta 2.17 Röhm GmbH/ Degussa; 2.19 KS; 2.20 y 2.21 Röhm GmbH/ Degussa; 2.22 Novozymes, Dinamarca; 2.23 Tanabe Seiyaku; 2.28 Saburo Fukui; 2.29 Kyowa Hakko Kygyo; 2.32 Kyowa Hakko Kogyo Co.; 2.34 Tanabe Seiyaku; 2.38 Christian Wandrey, Forschungszentrum Jülich; 2.40 Kyowa Hakko Kogyo Co.

Capítulo 3
3.1 y 3.2 © The Nobel Foundation; 3.3 y 3.4 DG; 3.5 Forsdyke DR and Mortimer JR, en: Gene (2000), 261 127-137; 3.7 biodidac Ottawa; 3.8 modificado según Felsenfeld G (1984) en: Gruss P, Herrmann R, Klein A y Schaller H (Hrsg.) Industrielle Mikrobiologie. Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft, Heidelberg; 3.9 DG; 3.10 U.S. National Library of Medicine, Oregon State University Library; 3.11 © The Nobel Foundation; 3.12 y 3.13 DG; Cuadro 3.1 AKD, KS y Nature Archive; 3.14 Gesellschaft für Biotechnologische Forschung Braunschweig; 3.15 DG; 3.19 DG; 3.20 © The Nobel Foundation; 3.21 DG; 3. 24 University of California at San Francisco, Public Affairs Office; 3.25 Stanley N. Cohen; 3.26 DG; 3.27 modificado según Piechocki R (1983) Genmanipulation. Frevel oder Fortschritt? Urania, Leipzig; 3.28 © The Nobel Foundation; 3.29 Stanley N. Cohen; 3.30 modificado según Weinberg, R (1986) Scientific American 10; Cuadro 3.2 mapa de pBR322 modificado según Brown TA (2001) Gentechnologie für Einsteiger. 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 3.31 modificado según Piechocki (1983); 3.33 DG; 3.34 modificado según Gilbert W y Villa-Komaroff L (1984) en: Gruss P et al.; 3.35 DG; 3.36 modificado según Berg y Singer (1993) Die Sprache der Gene. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 3.37 modificado según Gilbert W y Villa-Komaroff L (1984) en: Gruss P et al.; 3.38 y 3.39 © The Nobel Foundation; Cuadro 3.3 Mayo Clinic y Hoechst AG; 3.40 modificado según Aharonowitz Y y Cohen G (1984) en: Gruss P et al.; 3.42 Arnold Demain; 3.43 FB; 3.45 modificado según Firmenschrift Hoechst AG; 3.46 DG y RR; Cuadro 3.4 Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge (foto) y DG; 3.47 © The Nobel Foundation; Cuadro 3.5 modificado según Hopwood DA (1984) en: Gruss P et al.; 3.48 Eric Stewart y Stefanie Timmermann, INSERM; 3.49 modificado según Pestka S (1984) en: Gruss P et al.; 3.50 FB; 3.51 modificado según Watson JD et al. (1993) Rekombinierte DNA, 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 3.52 modificado según Dingermann T (1999) Gentechnik, Biotechnik. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 3.54 hasta 3.56 Gesellschaft für Biotechnologische Forschung Braunschweig

Capítulo 4
4.2 DG; 4.3 © The Nobel Foundation; 4.4 Kyoto Encyclopedia of Genomes and Genes (KEGG); 4.6 Wiley-Liss; 4.7 DG y RR; 4.8 DG; 4.9 DG y RR; Cuadro 4.1 KS; 4.10 DG y The Oncologist; 4.11 DG y RR; 4.12 DG; 4.16 FB; 4.17 Kyoto Encyclopedia of Genomes and Genes (KEGG); Cuadro 4.2 FB, RR y WACKER Fine Chemicals, Cartoon: Chow Ming; 4.18 y 4.19 FB; 4.20 Saburo Fukui; 4.21 modificado según Hopwood DA (1984) en: Gruss P et al. (ver Cap. 3), foto: Hermann Sahm, Forschungszentrum Jülich; 4.22 Kyowa Hakko Kogyo; 4.23 Alfred Pühler; 4.25 Catherine Wan; 4.28 Gerhard Gottschalk; 4.29 David Malin; 4.30 Andrea Walther y Jürgen Wendland; 4.31 FB; 4.34 Forschungszentrum Jülich; Cuadro 4.3 Roche Basilea y RR; 4.35 Coca Cola Inc.; 4.38 Fraunhofer Institut für Grenzflächen y Bioverfahrenstechnik Stuttgart y Semartec Ltd.; Cuadro 4.4 DG, The Oncologist y RR; 4.39 akademie spectrum, Berlín; Cuadro 4.5 modificado según Hopwood DA (1984), fotos: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) Braunschweig; 4.40 GBF Braunschweig; Cuadro 4.6 © The Nobel Foundation, The New York Botanical Garden, University of Pennsylvania; 4.41 © The Nobel Foundation; 4.43 Gist-Brocades; 4.44 akademie spectrum, Berlín; Cuadro 4.7 FB; 4.8 Fa.WECK; 4.46 Dept. Agriculture and Agrifood, Government of Canada; 4.47 Goodsell D (2004) Bionanotechnology. Wiley-Liss, Hoboken; 4.48 FB; Cuadro 4.9 Goodsell D (2004) Wiley-Liss y RR; foto: GBF Braunschweig; Cuadro 4.10 modificado según Gaden EL jr. (1984) en: Gruss P et al.; fotos: Roche Penzberg y GBF Braunschweig; 4.50 GBF Braunschweig; 4.51 © The Nobel Foundation; 4.53 Raymond Robert, Université Angers; 4.54 UV; Cuadro 4.12 DG, fotos: Rainer Erb, Stefanie Heiden, Ricardo Gent, Holger Zinke; 4.57 y 4.58 FB; 4.59 Novartis AG, Basel; 4.60 nach Aharonowitz Y y Cohen G (1984) en: Gruss P et al. y FB (Estructura); Cuadro 4.13 Carl Djerassi; 4.61 FB; 4.62 Mayo Clinic, Rochester 4.63 KS; David Ellis, North Adelaide

Capítulo 5
5.3 South China Morning Post, Hong Kong; 5.4 Chow Ming; Cuadro 5.1 Goodsell (2004) y Wiley-Liss ; 5.8 hasta 5.10 Goodsell D (2004) y Wiley-Liss ; Cuadro 5.2 RR y DG, modificado según Breitling F y Dübel S (1997) Rekombinante Antikörper, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 5.12 y 5.13 DG; Cuadro 5.3 © The Nobel Foundation; Cuadro 5.4 RR, Hermann Feldmeier, DG, UV; 5.14 modificado según Brown (2002); 5.15 UV; 5.16 y 5.17 World Health Organization; 5.19 Bayer AG; Cuadro 5.5 modificado según Breitling F y Dübel S (1997); 5.21 Gesellschaft für Biotechnologische Forschung Braunschweig; Cuadro 5.6 © The Nobel Foundation; 5.22 RR y FB; 5.26 DG y UV; 5.27 Manfred Bofinger; 5.28 y 5.29 modificado según Watson et al. (1993); 5.30 George P.Smith; 5.31 Gesellschaft für Biotechnologische Forschung Braunschweig; 5.32 DG; 5.33 Biowa /Kyowa Hakko; 5.34 DG y The Oncologist; 5.36 © The Nobel Foundation (retrato) y Proceedings of the Royal Society. (1900); 5.37 Celltech, Gran Bretaña

Capítulo 6
6.1 © The Nobel Foundation; 6.2 AKD; 6.3 KS; 6.4 AKD, Meinicke I y Bernitz H-M (1996) Der Gemüsegarten Berlins. Catálogo de la exposición. Rangsdorf; 6.9 Bayer Leverkusen, Werk Bürrig; 6.12 United Nations Environmental Program (UNEP); 6.18 Ananda Chakrabarty; 6.19 modificado según Hopwood DA (1984) en: Gruss P et al. (ver Cap. 3); 6.20 Erich Gundlach (www.oil-spill-info.com); Cuadro 6.3 KS y VW do Brazil; 6.22 KS y RR; Cuadro 6.4 AKD; 6.26 KS; 6.29 y 6.30 Kennecott Utah Copper/Minerals Corp.; Cuadro 6.5 RR e Internet; 6.37 DG y RR

Capítulo 7
7.1 Stefanie Goldscheider, Biothemen, Karlsruhe; 7.3 Detlef Grassmeier, Spirulife; Cuadro 7.1 DG y RR; 7.7 Jürgen Polle y Hutt Farm (Australia); 7.10 Imperial Chemical Industries (ICI); Cuadro 7.2 ICI y Petrolchemisches Kombinat

(PCK) Schwedt; 7.12 ICI; 7.13 Marlow Foods; 7.14 modificado según Bourgaize D, Jewell, T R and Buiser RG (2000) Biotechnology. Demystifying the concepts. Addison Wesley Longman, San Francisco; 7.16 Wadim Gratschow; 7.17 KS y Catherine Wan; 7.18 Catherine Wan; 7.20 KS; 7.22 John Stanley; 7.25 Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Colonia (MPIZ); Cuadro 7.3 RR, Inca Lewen-Doerr (GreenTec), Lutz Heide; 7.29 KS; 7.31 RR y Eckard Wellmann, Freiburg; 7.32 Marc van Montagu; 7.33 MPIZ Köln; 7.35 Zeng-Yu Wang y Taylor & Francis, Inc.; Cuadro 7.4 TransGen, bioSicherheit, Monsanto Agrar, Manfred Bofinger; Cuadro 7.5 KS; 7.36 Monsanto Agrar; 7.38 Ilka Renneberg; 7.39 DG y RR; Cuadro 7.6 Monsanto Agrar y KS; 7.41 bioSicherheit / Biologische Bundesanstalt Braunschweig; 7.43 bioSicherheit / Peter Ruth (arriba), Timo Wolf (abajo); 7.44 bioSicherheit / Norbert Lehmann; 7.45 bioSicherheit / Stephan Kühne, BBA Kleinmachnow; 7.46 bioSicherheit / Michael Knoblauch; 7.51 Calgene, Inc. y RR; 7.52 attac Deutschland; 7.53 RR (arriba) y bioSicherheit / BBA-Kleinmachnow (2); Cuadro 7.7 Jörg Knäblein, Schering AG Berlin y Trends in Biotechnology; 7.56 TransGen; 7.57 The Samuel Robert Noble Foundation, Inc.; Cuadro 7.8 RR, Darja Süßbier, Steven Lindow; 7.58 Manfred Bofinger y YorkSnow, Inc.

Capítulo 8

8.3 Roland Friedrich; 8.6 y 8.7 Cincinnati Zoo; 8.9 KS; 8.12 KS; 8.13 Matthias Konrad, 8.14 Roslin Institute, Edinburgh 8.15 Larry Wadsworth; 8.17 Woo-Suk Hwang; 8.18 Larry Wadsworth y RR; Cuadro 8.1 Ralf Brinster; Cuadro 8.2 DG, RR, GloFish,Yorktown Technologies; 8.23 Andrew Miller; 8.26 y 8.27 Norman McLean; 8.28 y 8.29 Choy L.Hew; 8.31 Horst Blüthmann, Roche Center for Medical Genomics; 8.32 Roslin Institute, Edinburgh; 8.35 biodidac, Ottawa; Cuadro 8.3 Eckhard Wolf/Alexander Pfeifer; Cuadro 8.4 © The Nobel Foundation (foto de Paul Berg), Internet (1), Larry Wadsworth (2); 8.36 © by WebCreative, www.webcreative.at y Max Dötzlhofer, www.bienenwelt.at ; 8 38 KS; 8.40 y 8.42 Roslin Institute; 8.43 biodidac Ottawa; 8.44, 8.45 y 8.48 Larry Wadsworth; Cuadro 8.5 modificado según Thieman WJ y Palladino MA (2004) Introduction to Biotechnology. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco; 8.49 Chow Ming; 8.50 y 8.51 KS 8.52 Alex Kwong; 8.53 Eckhard Wolf; 8.54 Jens Reich

Capítulo 9

9.3 DG, modificado según Dingermann T, 1999; DG; 9.8 Paion AG; Cuadro 9.1 DG y Scripps Institute, La Jolla, Uwe Perlitz; columna del márgen pág. 229 DG; Cuadro 9.2 DG; 9.11 DG y The Oncologist ; 9.12 DG; Cuadro 9.3 David C. Powell (foto de la placa), DG , Ray Stanyard y The Florida State University Research en Review Magazin (foto de Holton), FB, Gary Strobel: 9.14 DG; 9.15 DG y The Oncologist ; 9.16 KS; 9.17 DG; Cuadro 9.4 Alex Matter (foto retrato), DG, FB; 9.18 Bayer AG; 9.20 DG y Chow Ming; Cuadro 9.5 Eric Stewart y Stefanie Timmermann, INSERM; 9.22 Woo-Suk Hwang; 9.23 modificado según Thiemann WJ y Palladino MA (2004), ver Cap. 8; Cuadro 9.6 Alex Kwong (foto de embrión), Charles Coutelle (retrato); 9.25 modificado según Schellekens H et al. (1994) Ingenieure des Lebens. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 9.25 modificado según Thieman WJ y Palladino MA (2004); 9.26 Thomas Tuschl; 9.28 Chow Ming

Capítulo 10

10.1 Manfred Bofinger; 10.3 DG; 10.10 Advanced Bioanalytical Technology GmbH München; 10.13 BioSensor Technologie GmbH, Berlin; 10.15 Unipath; 10.16 Jan Glatz (retrato) y rennesens GmbH, Berlin; 10.18 modificado según Campbell NA (2003) Biologie, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Cuadro 10.1 Sir Alec J.Jeffreys; 10.23 modificado según Thieman WJ y Palladino MA (2004), ver Cap. 8; 10.24 Catherine Wan; Cuadro 10.2 modificado según Cellmark Diagnostics, AKD; 10.26 modificado según Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2005) Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, Wiley-VCH, Weinheim; 10.27 Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge; 10.28 modificado según Watson et al. (1993), ver Kap 5; 10.29 Sir Edwin Southern; 10.32 Jens von Holt, www.amberworld.com; 10.33 KS; Cuadro 10.3 RR y © The Nobel Foundation (foto retrato); 10.34 y foto superior 10.35 U.S. Department of Energy Human Genome Program; 10.35 Ilse Chudoba, MetaSystems, Jena; Cuadro 10.4 RR (2 fotos de cicladores PCR) y John Rebers (principio PCR); 10.36 Ministry of Agriculture and Agri-Food, Canadá; Cuadro 10.5 DG, TV-Station Pearl Hong Kong; 10.37 Craig Venter y U.S. Department of Energy Human Genome Program (retrato de Collins); pág. 275 arriba: Roger Pettet, Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge; 10.38 y 10.39 U.S. Department of Energy Human Genome Program, http://www.ornl.gov/hgmis; 10.41 Don Powell (Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge) y U.S. Department of Energy Human Genome Program; 10.42 y 10.43 U.S. Department of Energy Human Genome Program; Cuadro 1.6 Craig Venter (retratos), Internet (secuenciador de DNA); Cuadro 10.7 Affymetrix, Allen Yeoh; 10.44 Monte Pettitt; 10.45 RR y Michael Yang; 10.46 Manfred Bofinger; 10.47 Affymetrix; 10.48 modificado según Thieman WJ y Palladino MA (2004); 10.49 Uwe Klenz; 10.50 modificado según Rehm H (2002) Proteinbiochemie/Proteomics. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; 10.51 Patrick O'Farrell y reproducción de: O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol.Chem. 250: 4007; 10.52 Franz Hillenkamp (foto inferior) y U.S. Department of Energy Human Genome Program; 10.53 modificado según Rehm H (2002); 10.54 DG; 10.55, 10.56 y 10.57 Peter Fromherz; 10.58 DG y Wiley-Liss

ÍNDICE DE NOMBRES PROPIOS

A
Adams, M. 277, Albers, H. 185, Appert, N. 108, Arber, W. 62, Ashworth, D. 260, Avery, T. O. 54

B
Backus, M. 105, Balfour, E. 162, Baltimore, D. 74, Banting, F. G. 69, Barclay, A. S. 234, Beadle, G. W. 51, Behring, E. von 131, Berg, P. 62, 74, 218, 270, Bergerac, C. de 215, Bertalanffy, L. von 84, Bertrand, G. 96, 100, Berzelius, J. J. 28f, Best, C. H. 69, Beyer, P. 198, Birdseye, C. 108, Boccaccio, G. 255, Bond, J. 96, Boyer, H. W. 62, 71, 218, Breitling, F. 129, Brenner, S. 50, 55, 74, 272, 277, Briggs, R. 219, Brinster, R. 208, 211, Brotzu, G. 115, Brown, G. 246, Brown, L. 157, Brown, L. J. 218, Buchdunger, E. 240, Buchner, E. 21, 28, 37, Bückmann, A. F. 46

C
Campbell, K. 218f, Cantell, K. 232, Cape, R. 71, Carroll, L. 95f, Chain, E. B. 104, Chakrabarty, A. 157f, Chang, A. 218, Chang, A. C. Y. 62, Chargaff, E. 50f, 54f, Chibata, I. 40, 43, 46, 101, Chrustschow, N. 176, Cibelli, J. 218, Clark, L. jun. 252, Clinton, B. 272, 273, Cohen, S. N. 61f, 71, 218, Collins, F. 273, 275, 278, Connery, S. 96, Correns, C. E. 54, Coutelle, C. 246, 247, Crick, F. C. 50, 55, Crowfoot-Hodgkin, D. 69, Crutzen, P. 153, 156, Currie, J. N. 88

D
Darwin, C. 218, Davies, K. 272, De Silva, A. 246, Demain, A. 71, Descemet, J.-L. 178,

Diamond, J. 18, 128, Diaz del Castillo, B. 172, Dixon, B. 131, Djerassi, C. 119, Drake, R. 198, Druker, B. 240, Dübel, S. 129, Duclaux, É. 30, Durand, P. 108

E
Edwards, B. 218, Ehrlich, P. 131, 141, 146, Einstein,. A. 162, Erb, R. 117, Ergül, A. 19, Esparza, J. 133, Eyck, G. van 109

F
Farley, P. 71, Feldmeier, H. 133, Feynman, R. 55, Fire, A. 247, Fischer, E. 26f, 33, Fleming, A. 27, 33, 104, 106, Florey, H. 104f, Ford, B. F. 3, Fraley, R. 185, Franke, W. W. 243, Franklin, J. Sir 108, Franklin, R. 55, Friedrich Wilhelm IV. 151, Fromherz, P. 284, Fuchs, D. 138

G
Galenus von Pergamon 255, Gamow, G. 55, Gandhi, M. 154, Gay-Lussac, J. L. 20, Gearhart, J. 243, Gent, R. 117, Ghisalba, O. 167, Gilbert, W. 55, 69, 74, 88, 270, Glaser, D. 71, Glatz, J. F. C. 259, Gore, A. 272, Gram, H. C. J. 115, Greene, A. 236, Griffith, F. 54, Grüssner, A. 96, Guericke, O. von 108, Guillemin, R. 70, 73, Gurdon, J. 219

H
Haeckel, E. 206f, 223, 269, Hakura, A. 71, Haldane, J. B. S. 232, Hatzack, F. 39, Hawking, S. 283, Healy, B. 272, Heatley, N. 105, Heide, L. 183, Heiden, S. 117, Helling, R. B. 62, 218, Hemings, E. und S. 266, Hertwig, O. 218, Hew, C. L. 213f, Hillenkamp, F. 282, Hippokrates 204, Hobrecht, J. Graf 151, Hoffmann, F. 240, Holley, R. W. 58, Holton, R. 236f, 242, Homer 28f, Hooke, R. 3, Horwitz, S. B. 234, Hugo, V. 284, Hunt, M. 105, Hwang, W.-S. 248

I
Ikeda, K. 93f, Isaacs, A. 232

J
Jacob, F. 87f, Jaenisch, R. 218, James, C. 186, Jefferson, T. 266, Jeffreys, A. J. 262, Jenner, E. 131, 134

K
Karube, I. 253, Kayser, O. 195, 283, Kegel, B. 158, Kendall, E. C. 119f, Kendrew, J. C. 33, 86, Kennedy, J. F. 195, Khorana, H. G. 52, 57f, King, T. 219, Kirchhoff, G. S. C. 28, Kitasato, S. 131, Knäblein, J. 195, 197, Köbele, A. 188 Koch, R. 15, 131, 150, Köhler, G. 138, 140, Kornberg, A. 50, Koshland, D. 27, Krebs, H. 10, Kühne, W. F. 28, Kula, M.-R. 46, Kwong, T. 244

L
Lao-tse 211, Lederberg, J. 51, 71, 107, 270, Leeuwenhoek, A. von 2f, Lewen-Dörr, I. 182, Lewinsky, M. 266, Liebig, J. von 20, 90, Lim, H. A. 218, Lindemann, J. 198, 234, Lindow, S. 199, Lindt, A. 262, Lloyd George, D. 162, Loeb, J. 218, Luria, S. 55, Lwoff, A. 87, Lydon, N. 240, Lynen, F. 84

M
MacLeod, C. 54, Macleod, J. J. R. 69, Mann, L. 260, Mao Tsetung 154, Maow-Mallin, A. 134f, Marker, R. 119, Markov, G. 239, Matter, A. 240f, Matthaei, H. 52f, Maurois, A. 104, McCarty, M. 54, McLean, N. 213f, Meister, J. 131, Melchers, G. 182, Mello, C. 249, Mendel, G. 54, Mertz, J. 62, Michal, G. 85, Miescher, J. F. 54, Milstein, C. 138, 140, Minkowski, O. 69, Minot, G. R. 99, Monod, J. 84, 86-88, Montagu, M. W. Lady 131, Montand, Y. 264, Moshammer, R. 262, Moyer, A. J. 105, Müller-Hill, B. 88, Mullis, K. 218, 263, 270, Murphy, W. P. 99, Murray, H. C. 119

N
Napoleon Bonaparte 249, Nathans, D. 62, Nelmes, S. 134, Nirenberg, M. 52f, 58, Nobel, A. 162, Northrop, J. H. 26, 29

O
O'Farrell, P. 282

P
Palme, O. 262, Palmiter, R. 208, Panopoulus, N. 199, Papin, D. 108, Park, J. 107, Pasteur, L. 11, 16, 20, 22, 115, 131, Pauling, L. 55, 98, Payen, A. 28, Perkin, W. 162, Perlitz, U. 229, Persoz, J. F. 28, Perutz, M. F. 33, 86, Peterson, D. H. 119, Pfeifer, A. 214, 217, Phillips, D. 31, 33, Phipps, J. 134, Pincus, G. G. 218, Pitchfork, C. 260, Potier, P. 234, Potrykus, I. 198, Prentis, S. 57, Pryce, M. 104

R
Reese, E. T. 159, Reich, J. 218, 224f, 231, Rehm, H. 283, Reichstein, T. 96, 98, 100, 120, Rempel, R. 109, Rèaumur, A. F. de 28, Röhm, O. 36-38, Rosenkrantz, G. 119, Roses, A. 277, Ruprecht, R. M. 132, Ruzicka, L. 100

S
Sanger, F. 68f, 74, 267f, 272, Schally, A. V. 70, 73, Scheck, B. 260, Scheller, F. W. 255, 257, Schlatter, J. 99, Schreiter, M. 132, Schwann, T. 28, Seppen, J. 244, Signer, R. 54, Simpson, O. J. 261, Sinclair, U. 69, Singer, M. 74, Sinsheimer, R. 270, Slater, R. 239, Smith, G. P. 144, Smith, H. D. 62, Southern, E. 266, Spallanzani, L. 28, 204, Spemann, H. 219, Stauffer, J. F. 105, Stent, G. 55, Stewart, I. 63, Stice, S. 218, Stierle, A. und D. 237, Streptoe, P. 218, Strobel, G. 237, 243, Strominger, J. 107, Sturge, E. und J. 88, Sumner, J. B. 26, 29, Swanson, R. 71, Szent-Györgyi, A. 96, 100

T
Takamine, J. 34, Tanaka, A. 40, Tatum, E. L. 51, Teller, E. 55, Thom, C. 105, Thomson, J. 245, Tosa, T. 40, 46, 101, Trau, D. 272, Traube, M. 21, Turner, A. P. F. 255, Tuschl, T. 125, 249f, Tschermak, E. von 54

V
Varmus, H. 272, Vasella, D. 241, Venter, C. 272f, 277, Victoria von England 232, Villa-Komaroff, L. 69, Virchow, R. 151, Vouillamoz, J. 19, Vries, H. de 54

W
Wakayama, T. 218, Waksman, S. A. 114f, Wall, M. 234, Wallace, A. R. 218, Wong, W. K. 241, Wandrey, C. 46, Wang, Z. 185, Warburg, O. H. 10f, 26, 31, Watanabe, T. 61, Watson, J. D. 50, 55, 272f, 283, Weck, J. 109, Wehmer, C. 90, Weissmann, C. 235, Weizmann, C. 162, Wellmann, E. 184, Whipple, G. H. 99, Wiebe, E. S. 151, Wilhelm IV. 21, 34, Wilkins, M. 55, Willadsen, S. 218f, Wilmut, I. 218f, 221, Wilson, G. 255, Winterhalter, C. 92, Wöhler, F. 28, Wolf, E. 214, 217

Y
Yalow, R. 70, 73

Z
Zimmermann, J. 240, Zinke, H. 117

ÍNDICE ALFABÉTICO

A
Ablandar carnes 38
Abutilon spp. 180
Abzimas 141
Aceite de palmera 195
Aceitunas, acidificación 16
Acetato (sal del ácido acético) 5, 17, 160
Acetobacter suboxydans 6, 17, 96 160
Acetona 160
Aciclovir 126
Acidificar 16
Ácido acético 5, 10, 160
Ácido acetilsalicílico (aspirina) 135, 228, 242
Ácido ascórbico (vitamina C) 31, 98
Ácido aspártico 101
Ácido butírico 12
Ácido cítrico 88, 90f, 160, 162
Ácido desoxirribonucleico, ver DNA
Ácido fumárico 163
Ácido glucónico 27, 160, 163
Ácido láctico 12, 160, 163
Ácido málico 101, 163
Ácido nucleico 54
Ácido pirúvico (piruvato) 10
Ácido propiónico 12
Ácido salicílico 184
Aconitasa 90
Acremonium chrysogenum 115
Actinomicina 115
Activador del plasminógeno tisular (t-PA) 209, 228f, 232
Adenilato ciclasa 90
Adenina 50
Adenosina desaminasa (ADA), deficiencia 248f, 284
Adenosina monofosfato, ver AMP, cAMP
Adenosina trifosfato (ATP) 10, 12, 89f
Adenovirus 125
Adición de fosfatos, pienso para animales 39, 44
Aditivos para la cocción del pan 36
Aeróbicos 11, 22
Aflatoxina 22, 102
Agar 172
Agarosa 258
Agente naranja 157
Agrobacterium spp. 181, 185, 192
Agua, grado de suciedad 150, 256f
Agua de maíz 105, 109
Agua potable 150
Aguamiel 2
Aguardientes 9, 13
Agujero de ozono 156
Ajuste inducido 27
Alanina 57, 73
Albuterol 279-280
Alcaligenes eutrophus (*Ralstonia eutropha*) 164, 168
Alcaloides de bisindol 184
Alce 205
Alcohol 11-13
  destilación 13
  producción 45f
  producción industrial 161, 166
Alcohol deshidrogenasa 11
Aldolasa 12
Alga anguila 174
Algas 172, 174f
Algas marrones 172
Algas rojas 172
Algas verdes 174
Alginato 45, 172
Algodón transgénico 186
Alimentos microbianos 172-178
Alimentos MG 186f, 194f
Almidón 158
Alolactosa 89
Alosterismo 86f
AluI 62
Amanita phalloides 53
α–Amanitina 53
α–Amilasa 36
Amilasas 4, 26, 36f, 167
Amilopectina 194
Aminoácidos 5
  codificación, ver Código genético
  esenciales 42f, 93f
  producción 46, 101
  sintéticos 94f
Aminoácidos esenciales 42f
Aminoacilasa 43
AMP
Ampicilina, resistencia 64
Amycolatopsis orientalis 111
Anabaena azollae 172
Anabolismo 90
Anaerobio 11, 22
Análisis de fibra 264
Análisis de sangre 254, 255-260
Análisis RFLP 262f, 266
Anemia, perniciosa 98
Anfotericina B 111
Angkak (arroz rojo) 15
Animales
  domésticos 19
  quimeras 206f
  transgénicos 196, 207-215, 217
Ansamicina 111
Anteras 180
Antibióticos 115
  clasificación 111
  concepto 114
  efectos 111
  producción 102-107
  resistencias 61, 63-65, 107, 115-117, 260
Antibióticos macrólidos 111
Antibióticos β-lactama 111
Anticoagulantes 226
Anticuerpos 127-129, 197
  biespecíficos 141
  catalíticos (abzimas) 141f
  detectores y captadores 258-261
  monoclonales 136, 138-141, 211
  policlonales 136
  producción 136
  recombinantes 136, 142f
  terapéuticos 145
Anticuerpos biespecíficos 141
Anticuerpos catalíticos 141f
Anticuerpos monoclonales 136, 138-141, 211
Anticuerpos policlonales 136
Anticuerpos recombinantes 136, 142f
Antígenos 128
Antílope bongo 205
Antraciclina 111
Ántrax 131
Apoptosis 130, 236
Aptámero 26, 282f
Arabidopsis thaliana 198
Araña zancuda 34
Arañas de la seda 168
Arbusto Ketemfe 101
Arginina 90
Aromas de carne 92

Aromatizantes 92
Arqueobacterias 154f
Arrak 9
Arroz dorado 198
Arroz transgénico 198
Arthrobacter spp. 62, 94
Artritis 231
Arxula spp. 7, 45, 254
Ashbya gossypii 98
Asilomar, Conferencia de 74f
Asma 231, 277
Aspartamo 99, 101
Aspartato 46, 99
Aspartato quinasa 91
Aspergillus spp. 21, 36, 162
flavus 22
niger 7, 88, 90f, 163
oryzae 8, 15, 22, 34, 43
soyae 15, 22
Aspérula 226
Asperula odorata 228
Aspidisca costata 152
Aspirina (ácido acetilsalicílico) 135, 228, 242
ATP 10, 12, 89f
Atropina 184
Autómatas de secuenciación 270, 277
Autorradiograma 70, 261
Auxina 179, 185
Avispas icneumón 188
Azidotimidina 126
Azolla spp. 172
Aztecas 172
Azúcar 95
efecto edulcorante 40-42
Azúcar de la fruta, ver Fructosa
Azúcar de la leche, ver Lactosa
Azúcar de la uva, ver Glucosa
Azúcar de malta, ver Maltosa
Azúcar de remolacha, ver Sacarosa
Azúcar invertido 41
Azul de Berlín 91

B

Bacillus spp. 36
amyloliquefaciens 62
anthracis 131
globigii 62
licheniformis 37f, 111
subtilis 6, 26, 98
thuringiensis 6, 192
Bacterias 6, 15
anticongelantes 198-200
árbol genealógico 155
conjugación 61
descubrimiento 3
envejecimiento 244
manipuladas genéticamente 69-77
metano 154
ver también Arqueobacterias, Cianobacterias
Bacterias anticongelantes 198-200
Bacterias azules (cianobacterias) 172, 174f
Bacterias de la caries 197
Bacterias del ácido acético (*Acetobacter suboxydans*) 6, 17, 96 160
Bacterias del ácido butírico (*Clostridium butyricum*) 12, 17
Bacterias del ácido láctico (*Lactobacillus spp.*) 6, 8, 12, 16
Bacteriófagos 62, 124
λ 64
M13 64, 144
π 270
T_4 125, 127
Baile de San Vito 263
BamHI 62
Bastón de Esculapio, moderno 276
Batracina 111
Bauhinia spp. 180
Bebé probeta 218
Bebidas energéticas 90
Berlín, evacuación de vertidos 151
BglII 62
Biblioteca de anticuerpos combinatoria 42-144
Bibliotecas de fagos 142, 144
Bioalcohol 156f, 161
Biocatálisis (ver también Enzimas) 25, 27, 84-93, 159f, 187, 254-256
Biochips 254
ver también Chips genéticos, Chips de proteínas
Biodetergentes 37f
Biodiesel 166
Bioelectrónica 284
Biofármacos 196
ver también Biorreactores, Ciclosporina, *Gen-Pharming*, Insulina, Penicilina
Biogás 153-156
Bioinformática 274
Biomasa, materias primas 160, 162f
Bioplástico 165, 168, 283
Biopol 168
Biopulping 160
Biorreactores 110, 112-114, 183, 196
Biorreactores elevados 152
Biosensores 45, 254-257, 284
Biosíntesis de las proteínas 58f
Biotecnología
analítica 254-284
blanca 116
roja 116, 227-251
verde 116, 171-203
Biotecnología analítica 254-282
Biotecnología blanca 116
Biotecnología del medio ambiente 149-168
Biotecnología roja 116, 228-249
Biotecnología verde 116, 171-203
Bioterapia 237
Bleomicina 111
Bos gaurus 205
Bosques tropicales 161
Botox (toxina del botulismo) 241
Brevibacterium spp. 14, 94, 101
Bromelina 32, 38
Bromocianuro (CNBr) 72, 77
Bromuro de etidio 261
BSB5 150, 156, 256f
Bursa fabricii 128
Butanol 12, 160, 162

C

Cabras transgénicas 209, 211
Cacao 18
Cadena alimenticia 189, 196
Caenorhabditis elegans 247, 272, 279
Café 18
Camembert 14
cAMP 90
Campos de aguas residuales 151f
Cáncer 102, 140, 236f
frecuencias 232
Cáncer de colon 232
Cáncer de estómago 249
Cáncer de mama 234, 242, 256f
Cáncer de ovarios 234, 236, 242
Cáncer de piel 232
Cáncer de próstata 234
Cáncer de pulmón 234, 242
Cáncer de testículos 234
Cáncer del cuello del útero 234, 238
Candicidina 115
Candida spp. 175f
krusei 16
maltosa 7
utilis 7
Candidina 115
Caña de azúcar 157, 161
Cañones de nieve 200
CAP 90
Cápside 124
Caracal (*Felis caracal*) 205

Carcinoma 236
Carica papaya 37f
Caries 101
Carragenato 172
Cascada de la coagulación 228
Caseína 16, 19
Catabolismo 90
Catalizadores 35
ver también Enzimas
Catepsina 38
Catharanthus roseus 184
Cebada 2, 4f
Cefalosporina 111, 115
Células 84f
inmovilizadas 45f, 101
Células asesinas 130
Células B 128
Células cúmulo 222
Células de mamífero manipuladas genéticamente 78-80
Células de memoria 128
Células hibridomas 139, 143
Células inmovilizadas 45f, 101, 256 f
Células islote 67
Células madre 244f, 248
Células madre embrionarias (CME) 206f, 244 f
Células madre tisulares 244f
Células plasmáticas 128
Células T cooperadoras 127, 130
Células tumorales 238
Celulasas 36f, 159
Celulosa 158
Centro activo 26
Centro activo, enzima 26, 29, 31f, 35
Cephalosporium acremonium 115
Cerdos transgénicos 214f, 217
Cerveza 2-8, 36
ley de pureza 4, 21, 34
Cerveza pombe 8
Césped "turf" 185
Champán 9
Chip de DNA 278, 280, 283
Chips de proteína 281f
Chips genéticos 12, 276, 278, 280f
Chlamydomonas spp. 174
Chlorella spp. 174
CHO (*Chinese Hamster Ovary*) 229, 233
Chucrut 17
Cianidina 193
Cianobacterias 172, 174f
Cianocobalamina, ver Vitamina B_{12}
Cichlidae 212
Ciclamato 99
Ciclo del ácido cítrico 10, 94
Ciclosporina 111, 117-119
Ciliado 152
Ciliado en forma de trompeta 150
Ciliados 57, 150
Cinturón rosa 126
Cisteína, producción 92, 94
Citocromo oxidasa 10f, 26, 31
Citocromo P450 88f, 102, 280
Citoquinina (citoquina) 127, 179, 185, 236
Citosina 50
Clavacina 115
Claveles transgénicos 193
Clon
esperanza de vida 220f
fenotipo 221f
Clonación, DNA 62-65
Clones 215-224
en humanos 220, 223
en serie 219
historia 218
reproductivos 217
terapéutica 217, 243, 246
Cloranfenicol 111
Clorofila 173
Cloroplastos 11, 173
Clostridium
acetobutylicum 12, 160, 162
butyricum 12, 17
tetani 137
thermocellum 160
Club de la corbata del DNA 55
Coagulación de la sangre 228f
Cobalamina 98
Coccinella spp. 188
Cocos 15
Cócteles 9
Codeína 184
Código genético 51-53, 57
Codón de parada 58, 277
Codones 53, 57
Coenzimas 31f
Cofactores 10, 31f
Colchicina 181
Cólera 137, 150
Cólera de las aves 131
Colesterol 260
Coloración Gram 115
Colza transgénica 166, 186, 189, 195, 198
Combustibles biológicos 155-157, 161
Complejo principal de histocompatibilidad 130
Complejo principal de histocompatibilidad (MHC) 130
Congelación 109, 111
Conjugación, bacterias 61
Conservación 108f, 108-111, 114
Conservación de alimentos 108-111, 114
Consumo de alcohol, constante 89
Contaminación por petróleo 157f
Coñac 9, 13
copy-DNA(DNAc) 66, 277
Cordita 160, 162
Core 124
Corea de Huntington (baile de San Vito) 262
Coriogonadotropina, ver HCG
Coriolus versicolor 159
Corn-steep liquor 105
Corte y empalme 60
Corteza de sauce 184
Cortisona 118, 120
Corynebacterium spp. 6, 97
glutamicum 91, 94f
Cósmidos 64
Creatina quinasa 259
Cría de animales 203-222
ver también Animales transgénicos
Criminalística 263
Crisis del petróleo 155f
Cromatografía de afinidad 76
Cromosoma Filadelfia 240
Cromosomas 27
localización 268
CRP (proteína C reactiva) 260
Cruzamiento 61
Cuajada (leche agria) 16
Cultivo de Emmer 34, 110
Cultivo de meristemos 179f
Cultivo de plantas moderno 178-183
Cultivo de rosas 178
Cultivos celulares vegetales 179-184
Cultivos de anteras 181
Cultivos de Arabidopsis thaliana 198
Cultivos de callos 181, 183
Cultivos haploides 180f
Cultivos sumergidos 34, 110
Cumarina 228

D

Dactiloscopia 261
Dahi 16
Danio rerio 212, 214
Daños por heladas 198-200
Daunus plexippus 191
Dedalera púrpura 183
Defensa contra la infección 127-130, 232f
Degradación de la lactosa 86-89
Delfina 205
Delfinidina 193

Delvirdina 126
Demanda bioquímica de oxígeno, ver DBO5
Depuración de vertidos 150-153, 156
10-Desacetilbacatina III 234
Desechos domésticos, energía de 156
Desmodus rotundus 230
Desmoteplasa 230
Desoxirribosa 50
Despertador ácido 16
Desprendimiento de polen a la atmósfera, maíz-Bt 192
Destilación 13
Detección, bacterias 71f
Detergentes 37
Diabetes 66, 73f, 254f
Diagnóstico de implantación prenatal 205, 223f
Diagnóstico del cáncer 269
Diastasa 28
Didesoxiinosina 126
Difteria 131
Digitalis purpurea 183
Digitoxina 184
Digoxina 184
Dihé 172
Dinamita 162
Dioscorea spp. 119
Diosgenina 118-120, 184
Diseño de proteínas 145
Display de fagos 64, 143-145
Dispositivo de goteo 152
Distrofia muscular de Duchenne 246
DNA 50
  análisis 260-281
  chips 274, 278, 280f
  clonación 62-65
  DNAc 66, 277
  eucariota 59
  hibridación 71, 269, 278
  historia 54f
  ligasa 30, 62, 79
  marcadores 261
  microarrays (chips de DNA) 278, 280, 283
  mitocondrial 57, 221, 262
  polimerasa 50f, 264f
  procariota 59
  replicación 50f
  secuenciación 268-279
  sintetizadores automáticos 66, 71, 75
  sondas 71, 75
  transcripción 53, 56, 58
  virus 124
DNA "junk" 59
DNA eucariota 59
DNA microsatélites 263, 274
DNA mitocondrial 57, 221, 264
DNA procariota 59
DNAc 66, 277
Dolly 216, 218-221
Dopaje 232, 241
Downstream processing 114
Doxorrubicina 111
Drosophila melanogaster 96, 100, 273
Dunaliella spp. 174

E

EcoRI 62-65
Edulcorante dietético 41
Edulcorantes 99, 101
Efecto Crabtree 12
Efecto Pasteur 11
EGF 243
Elaeis guineensis 179f
Electroforesis, ver Electroforesis en gel, Electroforesis capilar, PAGE
Electroforesis capilar 267f
Electroforesis en gel 260f, 267-269
Electroforesis en gel bidimensional 282
Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) 281f
Electroporación 80
Elicitores 185
ELISA 137, 258
Embolia 229f
Embriogénesis 242f
Embriones
  determinación del sexo 204
  ley de protección 223, 228
Emmental 14, 21
Endomycopsis spp. 7
Endonucleasas de restricción 62, 79
Energía de activación 35
Energía solar 11
Enfermedad de Alzheimer 184
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob 243
Enfermedad de la coagulación (hemofilia) 232-234, 246
Enfermedad mano-pie-boca 138
Enolasa 13
Enternecedor 38
Envenenamiento por plomo 19, 108
Enzima coaguladora 14, 16, 19, 32
Enzima inmovilizada 40-46, 255f
Enzimas 25, 27, 84-93, 159f, 187, 254-256
  alostéricas 87
  animales 32
  aprovechamiento industrial 36-46
  centro activo 26, 33, 35
  cofactores 10, 31f
  constitutivas 87f
  descubrimiento 28f
  efecto de proximidad 29
  en alimentos 42-44
  en medios de lavado 37
  en piensos animales 39, 42-44
  enternecedor 38
  especificidad 26-29
  extracelulares 34, 107
  forma de ajuste inducido 27, 33
  inducibles 87f
  inmovilizadas 40-46, 255f
  microbianas 34
  nomenclatura 26, 30
  obtención 32-34
  principio de la llave y la cerradura 26, 33
  productos para curtidos 38
  reutilización 40f, 256
  solubles 44
  vegetales 32
  ver también Anticuerpos catalíticos
Enzimas alostéricas 87
Enzimas pancreáticas 32, 37
Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, ver ELISA
Epidemias 128
EPSP-sintasa 188
Equilibrio de flujos 84
Eremothecium ashbyii 98
Eritromicina 111
Eritropoyesis 234
Erwinia spp. 97, 198
Escarabajo de la patata 192
Escarabajo del maíz 190
Escherichia coli 6, 8, 46, 55, 58, 62, 65, 72, 75-77, 86, 101, 113, 270
Esclerosis múltiple 231
Escorbuto 96
ESI (*Electrospray Ionization*) 282
Especies de animales extinguidas y amenazadas 205, 263, 266
Espectrometría de masas 282
Espectrómetro de masas MALDI-TOF 282
Espidroína 168
Espiramicina 111
Espirilos, *Spirillum spp.* 6, 15
Espirituosos 9, 13
Esporas 6
Esquizomicetos 15
EST (*Expressed Sequence Tag*) 274, 277
Estafilococos 15
Estambres 180
Estaurosporina 238
Esterilidad 217

Esterilización 110f
Esteroide 118
Estigmasterol 118, 120
Estreptococos 15
Estreptomicina 115
Estreptoquinasa 227
Estreptotricina 115
Etanol 11f, 45f, 160
  como combustible 156f, 161
  ver también Alcohol
Eucariotas 2, 8, 53, 60
  expresión genética 58
Exones 52, 57, 59
Explotación del estiércol líquido 155f
Expresión genética 58
Extracción de petróleo 164f
Extremos pegajosos 62
Exxon Valdez 158

F
FABP 259
Factor de coagulación VIII 232-234
Factor de crecimiento de granulocitos y macrófagos 234
Factor de crecimiento epidérmico (EGF) 240, 243
Fagos, ver Bacteriófagos
Farmacogenómica 279f
Fármacos
  eficacia 279f
  ver también Biofármacos
Fecundación artificial 204
Feedback, ver Retroacoplamiento
Felis caracal (caracal) 205
Fenilalanina 53, 93, 99
Fenilaminopirimidinas 241
Fermentación 2, 9, 11f, 17f, 20-22, 28
Fermentador, ver Biorreactores
Fermento 16
Ferroceno 255
Fertilización *in vitro* 218, 223
Festuca spp. 185
Fibrina 228f
Fibrinolíticos 228f, 232
Fibrosis quística (mucoviscidosis) 215, 217, 284
Ficina 32, 38
FISH 270f
Fitasa y fitato 39, 44
Fitohormonas 179, 185
Flavina adenina dinucleótido (FAD) 27, 31, 255
Fomivirsen 126
Fosfinotricina (PPT) 189
Fosfofructo quinasa 12
Fosfoglicerato
  mutasa 13
  quinasa 13
Fosfohexosa isomerasa 12
Fotosíntesis 11, 173
Fradicina 115
Fragmento Fab 129, 142
Fresas 180
Fritillaria spp. 279
Fructano (inulina) 194
Fructosa 16
Fuegos fatuos 153
Fusarium spp. 7
  graminareum 177
  venenatum 177
Fusión de protoplastos 182f

G
β–Galactosidasa 72, 87
Galactósido-acetil-transferasa 87
Gatos clonados 222
Gaur malayo 205
Gel entrapment 40
Gemelos 218
Gene-Pharming 195, 197, 209-211
Genes
  desconexión, ver Ratones *knock out*, RNA de interferencia
  localización 270, 278f
  producción 65f
  recombinación 60f
  secuenciación 267-279
Genes de mosaico 59
Genes estructurales 58
Genes supresores de tumores 239
Genes y ratones *knock out* 214
Gene-targeting 214
Genética, historia 54f
Gen-Food, ver Alimentos MG
Genoma humano 52f, 273 f
Genotipo 60
GFP 193, 197, 207, 212, 214, 217
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa 13
Glicerina (glicerol) 162
Glicólisis 10, 12, 94
Glifosato 188
Glivec (Gleevec) 239-241
GloFish 212
Glucoamilasa 36
Gluconobacter oxydans 96f
Glucosa 5, 11, 16
  degradación 10, 12, 94
  isomerización 42
  obtención 36
Glucosa deshidrogenasa 254
Glucosa isomerasa 40-43
Glucosa oxidasa, ver GOD
Glutamato 15, 94, 172
  producción 93
  sintético 94f
Glutamato deshidrogenasa 94
Glutamato monosódico, ver Glutamato
Glutamina 89f
Glutamina sintetasa 89f
Gluten 36
GOD 27, 30f, 254f
Gonorrea 117
Gota 177
Granja de producción genética 195, 197, 209-211
Granjas de algas 174
Granulocitomatosis 233
Griseína 115
Griseofulvina 111
Grupos prostéticos 27, 31f
Guanilato disódico 93
Guanina 50
Gulonolactona oxidasa 96

H
Habas de soja transgénicas 186, 195
Habitante equivalente 150, 156
Haemophilus influenzae 272, 275
Hansenula spp. 15
HCG (coriogonadotropina humana) 257f
Hemicelulosa 158
Hemoblastos 238
Hemofilia 232-234, 246
Hemoglobina 86
Heparina 226
Hepatitis 138
Hepatitis B 231
  vacuna 79
Hepatitis C 231
Herbicidas 188
  resistencias 188f, 192
Herpes 125f
Hexoquinasa 12, 27, 30
Hibridación 61
  DNA 71
  somática 182f
Hibridación fluorescente *in situ*, ver FISH
Hibridación somática 182f
Hidratos de carbono 11
Hidratos de metano ("hielo de metano") 153
Hidrolasas 30
Hidrólisis de un éster 142
Hilos de araña 168

Hipotálamo 71
Hirudina 78, 228f
Hirudo medicinalis 228f
Histonas 56
Homoserina deshidrogenasa 93
Hongos 7
  degradador de la lignina 159
  ver también Levaduras, Mohos con esporangio
Hongos con micelio tabicado 2
Hongos productores de esporas 5
Hormona
  eritropoyetina 234
  esteroidea 118-120
  hormona del crecimiento 144, 208f, 211-213, 243f
  insulina 66, 71, 73-78, 254
  somatostatina 70-73
Hormona del crecimiento de cerdos 209
Hormona del crecimiento de la trucha 212
Hormona del crecimiento para bovinos 209
Hormonas esteroideas 118-120
Hospitalismo 117
Huella dactilar genética 262f, 261-263
Huperzia y *huperzina A* 184

I
Identificación de alimentos OMG 186f, 193, 195
Imatinibmesilato 240f
Indinavir 126
Inducción 87-89
Induced fit 27
Infarto de miocardio 228f
  pruebas 259f
Infecciones víricas 65
Ingeniería genética 61-80, 185, 198
  riesgos 74-76
Ingeniería tisular 215
Inhibidor de la coagulación 228f
Inhibidor de la fusión 126
Inhibidor de la proteasa 126
Inhibidor de la transcriptasa 126
Inhibidor de proteína quinasa 240f
Inhibidor integrasa 126
Inhibidores 26
Inhibidores de enzimas 26
Iniciador (*primer*) 50, 75
Inmortalidad 231
Inmunización pasiva 131
Inmunoglobulina 128f
Inmunosupresivo 119
Inmunotoxina 145, 237
Inosinato disódico 93
Insecticidas 189-193
Insectos 189
Inseminación artificial 204
Instalaciones depuradoras, ver Depuración de vertidos
Insulina 66-71, 252
  de cerdo 73f
  humana 73f
Insulina de cerdo 73f
Interferón 60, 127f, 233-235, 238
Interleuquina 119, 127, 238
Intolerancia a la lactosa 208
Intoxicaciones alimentarias 22
Intrones 53, 57, 59, 263
Inulina (fructano) 194
Invertasa 41
Investigación del líquido amniótico 268
Iones de proteínas 282
Islotes de Langerhans 67, 74
Isoleucina 93
Isomerasas 30
Isomerización, glucosa 42
Israel, fundación del Estado 162

J
Jarabe de fructosa 41, 40-43

K
Kanamicina, resistencia 63
Kefir 14, 16
Kelp 172
Klebsiella pneumoniae 113
Konbu 93
Kumys 8, 14, 16
Kwass 8

L
β-Lactamasas 117
Lactobacillus spp. 6, 8, 12, 16
  bulgaricus 14
  plantarum 16
Lactoferrina 210f
Lactosa permeasa 87
Laminaria 93, 172
Lamivudina 126
Lates niloticus 212f
Leakage 40
Leche agria (cuajada) 16
Leucemia 232
  crónica mieloide 240f
Leucemia de células vellosas 233, 238
Leucemia mieloide crónica (CML) 240f
Leucina 57, 93
Leuconostoc cremoris 14
Levadura del pan, ver *Saccharomyces cerevisiae*
Levaduras 2, 5, 7, 11
  haploides 61
  inmovilizadas 45
  manipuladas genéticamente 77f
Levaduras de alcano 175f
Ley básica de biogenética 206
Leyes de Mendel 54
Liasas 30
Licopodio 184
Licores 9
Life Cycle Assessment (LCA) 166
Ligasas 30
Lignina y degradación de la lignina 158f
Lignocelulosa 158-160
Limburger 14
Limpieza de los suelos 158
Lince africano 205
Linfocitos 128, 130
Linfocitos B 128, 144, 235
Linfocitos T 130
Linfoma no Hodgkin 141, 146
Linfoquina 127, 130, 236
Liofilización 114
Lipasas 37
Lisina 53, 94
  producción 91, 93
  sintética 94
Lisozima 27-33, 35, 128
Lithospermum erythrorhizon 182f
Lixiviación microbiana del cobre 163f
Lixiviación microbiana del uranio 164
Lombriz de tierra 215
Lubricante rojo 14, 21
Luciferasa 193, 212
Luciferina 193, 212
Lumbricus terrestris 218
Lúpulo 4, 8
Luz UV 102

M
Macrocystis spp. 172
Macrófagos 128
Madera 154, 158f
Madres de alquiler 204
Maduración de la carne 38
Maíz
  transgénico 186, 190-193
  ver también Maíz Bt
Maíz Bt 190-193
Maíz genético, ver Maíz Bt
Major histocompatibility complex (MHC) 130
Malato 163

MALDI 280
Malta 2, 4f, 36
Malta remojada 4f
Maltosa 16
Mamut 205, 263, 266
Manipulación genética 60, 69-80, 247
Mantequilla 16
Mantequilla de nata agria 14
Mapa Contig 275
Mapa metabólico 85
Mapas del genoma
genéticos y físicos 274
Mapeado de haplotipos 276, 278
Marcador tumoral 140
Mariposa monarca 191
Mariquita 188
Mastitis 208
Materia prima de biomasa 160, 162f
Matrix-assisted laser-desorption ionization (MALDI) 280
Mediadores 255
Medicamentos antivirales 126
Medicina basada en la genética 277f, 279f
Medida de grasas sanguíneas 260
Medida de la glucosa 254-256
Medida del azúcar en sangre 27, 254
Medida del lactato 253
Medio de lavado 37f, 91
Melanoma 231
Melaza 16, 108
Metabolismo 11, 84-89
Metabolismo celular 84-89
Metano (biogás) 153-156, 176
Metanobacterias 152, 154
Metanol 175f
Methylophilus 6, 175f
Metionina 72, 93
producción 93
Método de la raíz capilar 263
Método de rotura de la cadena 265f
Métodos biológicos para combatir los parásitos 188
Micoproteína 175-178
Microbacterium spp. 94
Micrococcus spp. 17
Microinyección 80
Microinyección de pronúcleo 207
Microorganismos
cultivo 107-110, 112f
mutado 101-103, 106
Microorganismos mutados 101-103, 106
Microrreproducción 179
Microscopio 3
Microtúbulos 234
Mildiu de la patata 195
Minería 164
Miso 15
Mitocondrias 57, 85, 155, 221, 264
Mohos con esporangio 7, 21
Mohos con esporangio en forma de pincel 7
ver también *Penicillium spp.*
Mohos con esporangio en forma de regadera 7
ver también *Aspergillus spp.*
Monascus purpureus 15
Monelina 101
Monocotiledóneas 185
Mosca del vinagre (*D. melanogaster*) 96, 100, 273
Mosquitos 192
Mucor spp. 7, 15
Mucoviscidosis 215, 249f, 277
Muerte de los peces 150
Multi-Color-Banding 270f
Munumbicina 237
Murciélago vampiro 229f
Mus musculus 208
Mutación puntual 102
ver también SNP
Mutágenos y mutaciones 60, 102

N
NAD, NAD^+, NADH 10, 26, 31
Narciso 198
Narcissus pseudonarcissus 198
Natto 15
Neisseria gonorrhoeae 117
Nelfinavir 126
Neomicina 115
Neopterina 134, 138, 260
Nephila spp. 168
Neumococos 54
Nicotiana tabacum 18
Nieve artificial 200
Nistatina 111
Nocardia spp. 6
mediterranei 111
Northern Blotting 267
Nostoc spp. 174
Nucleína 54
Nucleotide excision repair 102

O
Obtención de energía 154-157
Obtención de la somatostatina 70-73
Oncogenes 237
Ophiostoma piliferum 160
Opina 185
Ordenador de ciclos 257
Orujo 9
Ovarios 181
Ovejas transgénicas 209
Oxidorreductasas 30

P
Pace maker enzyme 87
Paclitaxel 234f, 240f
PAGE 281f
PAGE-SDS 281f
Palmera oleífera 179, 195
Pan 16
Páncreas 66
Papaína 32, 37f
Papaya 37f
Paperas 138
Parálisis infantil 137
Paramecio 8, 152
Paramecium 8, 152
Pasteurella multocida 131
Pasteurizar 16, 20
Patatas transgénicas 194f
PCR 51, 75, 140, 204, 218, 264f, 270
Peces decorativos transgénicos 212
Peces transgénicos 211-214
Pectinasas y pectina 36
Pediococcus 15, 22
Pegamento 36
Pelagra 31
Pelargonidina 193
Penicilina 27, 33, 104-107, 111, 115, 117
efecto 107
resistencia 63, 65
Penicilina acilasa 42
Penicilinasa 70
Penicillium spp. 21
camemberti 14, 105
caseicolum 14
chrysogenum 7, 103, 105f
notatum 104, 106
roqueforti 14, 105
Pepinos, acidificación 16
Pepsina 26, 28, 32
Péptido C 68
Perca multicolor del lago Victoria 212f
Perfiles de expresión genética 281
Petróleo 157f, 176, 164f
Pez cebra 212, 214
Phanerochaete spp. 7, 159
PHB 168, 198
Phytophtora infestans 195
Pichia saitoi 16
Pienso para animales
adición de fosfatos 39, 44

contenido en aminoácidos 91
enzimas 39, 42-44
identificación OMG 187
Pigmentos vegetales 193
Píldora anticonceptiva 119
Píldoras 119
Piral del maíz 190, 192
Piruvato 10
quinasa 13
PLA (ácido poliláctico) 168
Plantas
clonación 179-181
transgénicas 185-198
Plantas curativas 184
Plantas híbridas 179
Plantas ornamentales 179f
Plantas transgénicas 185, 196-198
Plantibodies 197
Plásmido 61-65, 79
pBR322 64
plásmido Ti 185
pSC101 y pSC102 63
Plásticos biodegradables 165, 168
Plegado 243
Point-of-Care-Tests (pruebas POC) 260
Poliacetato (PLA) 168
Poligalacturonidasa 193
Polihidroxibutirato (PHB) 168, 198
Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción, ver RFLP
Polio 137
Pollos transgénicos 211
Ponche 9
Porphyra spp. 172
Postgenómica 274
PPT 189
Prebióticos 194
Precipitación con fosfato cálcico 80
Prednisolona 118
Preproinsulina 68
Primates transgénicos 214
Primer (iniciador) 50, 75
Principio de la supernova 274
Principios activos vegetales 183f
Probióticos 194
Procalcitonina 258
Procariotas 6, 8
expresión genética 58
Procedimiento de clonación Contig 273
Proceso de ensilado 17
Proceso del lodo activado 152f
Producción de insulina 69, 71, 73-78
medidas de seguridad 74-76
Producción de metales 164
Producción de vacunas 134-136
Productores de metano 153
Productos bacterianos 15-18
Productos de leche agria 14
Productos del metabolismo microbianos 114
Progesterona 118
Programa Proalcool 157, 161
Proinsulina 68, 76-78
de ratas 69-71
Prolina 53
Promotor 58
Propionibacterium spp. 6, 12, 98
Proteasas 26
Proteasas alcalinas 37
Proteína activadora de catabolitos (CAP) 90
Proteína de fluorescencia verde (GFP) 193, 197, 207, 212, 217
Proteína de unión de los ácidos grasos (FABP) 259
Proteína represora 58f
Proteína Src 240f
Proteína unicelular 176
Proteínas
anticongelantes 213
de microorganismos 174-178
Proteínas bacterianas 174-176
Proteínas MHC 130
Protein-Engineering 78
Proteoma 279
Proteómica 279f
Proteus vulgaris 62
Protooncogenes 239
Protoplastos 181-183
Proximity effect 29
Proyecto del genoma humano 224, 272-278
Proyecto Gobar 154
Proyecto HapMap 276, 278
Prueba de Galli-Mainini 257
Prueba de la rana (prueba de Galli-Mainini) 257
Prueba de paternidad 266
Prueba de Warburg 254
óptica 31
Prueba del embarazo inmunológica 257f
Pruebas de orina 253, 255f
Pruebas enzimáticas 252
Pseudomonas spp. 6, 157
dacunhae 101
denitrificans 98
enterotoxina 237
putida 88
syringae 199
Pulgones 215
Pullulan 165
Pullularia pullulans 165
Pulque 15
PvuII 62

Q

Quark 16, 19
Queso 14, 18-22
Quesos blandos 21
Quesos duros 21
Quimeras 206f
Quimeras por fusión 206
Quimeras por inyección 206
Quimiopapaína 32, 38
Quimioterapia 237
Quinasas 238
Quinina 184
Quorn 177

R

Rabia 131, 139
Racémicos 94
Radioimmunoassay (RIA) 68, 70
Radioinmunoterapia 239
Raíz de ñame 118-120, 184
Ralstonia eutropha 168, 198
Rana con garras africana 65, 219, 255
Rata Gunn 244
Raticida 226
Ratón gigante 208, 211
Ratones
knock-out 214f
transgénicos 208, 210f
Reacción de Diels-Alder 141f
Reacción de Maillard 92
Reacción de rechazo 215
Reacción en cadena de la polimerasa, ver PCR
Reacción enzimática 35
Reactores de enzima de membrana 44, 46
Reactores de pozo profundo 152
Recombinación 60f
Recuperación de producto 114
Reducción del crecimiento 241
Regeneración del cofactor 44, 46
Regla de Watson-Crick 50
Reglamento sobre nuevos alimentos 186
Reglas de Chargaff 50, 55
Regulación del metabolismo 85-89
Reina de los prados 240
Remolacha transgénica 195
Renina (enzima coaguladora) 14, 16, 19, 32
Replicación, DNA 50f
Represión 89
Represión de catabolitos 90
Reproducción vegetativa 179

Reserpina 184
Resistencia a la insulina 252
Resistencias 117, 208, 213
  antibióticos 61, 63-65, 107
Respiración 10f
Respuesta inmune
  celular 129f
  humoral 127-129
Restrictasas 62
Retinitits por citomegalovirus (CMV) 194, 283
Retroacoplamiento 86f
  acumulativo 90
Retrovirus 51, 66, 124f
  ver también Virus, VIH
Rhizobium spp. 6
Rhizopus spp. 15
  arrhizus 120
  nigricans 163
Riboflavina (vitamina B_2) 31
Ribosa 50, 53
Ribosomas 58, 85
Ribozima 26
Ricino 145, , 237, 239
Ricinus communis 145, 239
Rifampicina 111
Ritnavir 126
Rituximab 145f, 239
RNA 26, 53, 125
  de transferencia 59
  mensajero 53, 56, 58f
  ribosómico 59
  traducción 56, 59
RNA de interferencia (RNAi) 249f
RNA de transferencia (RNAt) 59
RNA mensajero (RNAm) 53, 56, 58f
RNA polimerasa 51, 53, 58
RNAi 249f
RNAm 53, 56, 58f
RNAr 59
RNAt 59
Ron 9
Roquefort 14
Rosa gallica 178
Rubeola 138
RUBISCO 30, 173
Rumiantes 153

S
Sacarina 99
Sacarosa 16
Saccharomyces spp. 22
  carlsbergensis 7
  cerevisiae 4, 7, 9, 15f, 270
  kefir 14
  rouxii 15
Saccharopolyspora erythrea 111
Sake 8, 15, 22
Sal de deshielo 160
Sal de salmuera 17
Sal quitamanchas enzimática 37
Salami 17
Salchicha duradera 17
Sales del suero sanguíneo, amarilla 91
Salix spp. 184, 240
Salmón 213
Salsa de soja 15, 22
Sangre del cordón umbilical 245
Sanguijuela 228f
Saquinavir 126
Sarcoma 236
SARS 124, 140, 269
Sauce 240
Scenedesmus spp. 174
Schizosaccharomyces pombe 8
Screening 103, 106
Secadero 2
Secuenciación de escopeta 275
Sensores microbianos 254f
Sensores para vertidos 256, 257
Seta amanita verde 53
Shigella spp. 61
Shikonina 183f
Sida
  búsqueda de la vacuna 132f, 139
  medicamentos 126
  pruebas 137, 258f
  terapia 238, 248
  ver también Virus, VIH
Siempreviva de Madagascar 184
Síndrome de Crigler-Najar 246
Síndrome de Down 270
Síndrome del restaurante chino 94
Síntesis de los ácidos grasos 84
Síntesis de proteínas 95
Síntesis de Reichstein 96f
Sistema del complemento 129
Sistema inmune 128
Sistemas multienzimáticos 84
Sitosterol 118, 120
Snakevine 235
SNP 263f
Soja 118, 120
Sorbitol 96, 100
Sorbosa 96, 100
Sostenibilidad 166f
Southern Blotting 268f
Spirea ulmaria 240
Spirulina spp. 172, 174
Splicing 56, 60
Staphylococcus spp. 6, 63
Steady state 84
Sticky ends 62
STR (*Short Tandem Repeat*) 263
Streptococcus spp. 6
  cremoris 14
  lactis 14
  mutans 101, 197
  thermophilus 14
Streptomyces spp. 6, 41
  erythreus 111
  venezuelae 111
  verticillus 111
Subtilisina 26, 37f
Sucedáneos de la carne 177
Suero de la mantequilla 14, 16
Sulfato de cobre 164
Superficies de refugio 192
Superovulación 204
Supresor de tumores p53 238f

T
Tabaco 18
Taq-polimerasa 264f, 271
Taumatina 101
Taurotragus oryx 205
Taxol 236f, 242f
Taxomyces andreanae 236
Taxus
  baccata 236
  brevifolia 236, 242f
Taxusina 236
Té 18
Techuilatl 172
Técnica *antisense* 193f, 250, 283
Técnica del hibridoma 136
Tejos 236f, 242
Telomerasa 221, 245
Telómero 221
Tempeh 15, 178
Tequila 15
Terapia contra el cáncer 140f, 145f, 184, 236-243, 249
Terapia del suero sanguíneo 131
Terapia génica 246-249
Termitas 153, 159
Tétanos 137
Tetraciclina 111
  resistencia 63f
Theobroma cacao 18
Thermus aquaticus 34, 51, 264f, 271

Thiobacillus ferrooxidans y *Th. thiooxidans* 164
Tifus 137, 151
Tilapia spp. 213
Tilosina 111
Timina 50
Timo 129
Tiras de prueba 257
Tirosina quinasas 240f
Tofu 15
Tolypocladium inflatum 111, 117f
Tomata, tomatata 182f
Tomates transgénicos 193
Torula kefir 14
Torulopsis spp. 7, 15
Toxina Bt 192
Toxoide 137
t-PA (activador del plasminógeno tisular) 209, 228f, 232
Traducción, RNA 56, 59
Tragelaphus euryceros 205
Transcripción, DNA 53, 56, 58
Transcriptasa inversa 51, 66, 125
Transfección 79f
Transferasas 30
Transferencia embrionaria 204f, 216, 223
Transferencia genética
  biolística 185
  ver también Plantas transgénicas, Animales transgénicos, Clones
Transferencia genética biolística 185
Transferencia mediada por esperma 208
Transferencia nuclear 216, 219, 224
Transformación 54
Transgénesis mediada por retrovirus 207
Transpeptidización 73
Transplante de órganos 215, 217
Treonina 73, 94
  producción 93
Trichoderma viride (*reesei*) 7, 159
Trichogramma spp. 188
Trichosporon cutaneum 7, 254
Trigo 186
Triosafosfato-isomerasa 12, 30
Tripsina 26, 73
Triptófano 93
Trisomía-21 270
Trombolíticos 226f, 230
Tuberculosis 131
Tulipanes 180

U

Undaria spp. 172
Upstream processing 114
Uracilo 53
Ureasa 26
Uroquinasa 229

V

Vacuna de la viruela 131, 134-137
Vacuna tragada 137
Vacunas 79, 131-140
Vacunas vivas 139f
Vainilla 18
Valina 57, 94
Vancomicina 111
Vanilla planifolis 18
Variantes de insulina 78
Vectores 64
Vectores genéticos 64
  ver también Traducción
Vibrio cholerae 150
Vibriones 15
Vinagre 17
Vinagre de vino 17
Vinblastina y vincristina 184, 234
Vino 8f, 19
  transgénico 195
Vino de arroz (sake) 8, 15, 22
Vino de pepsina 32
Vinos espumosos 9
Viruela 131
Viruela vacuna 131, 134
Virus 8, 124-127
  adenovirus 125
  BNYVV 195
  HBV 138
  hepatitis B 257
  virus del mosaico *Abutilon* 180
Virus de la polio 128
Virus del herpes 125
  búsqueda de vacunas 132f, 139
  detección 256f
  HTLV-1 236
  PERV 215
  SIV 132
  SV40 125
  VIH 51, 124-127, 130
  virus de la gripe 125
  virus de la polio 125
  virus de la rubeola 125
  virus de la viruela 125, 134f
  virus del papiloma 125, 238
  virus *Poty* 180
  virus SARS 124
Virus del mosaico del tabaco 51, 125
  ver también bacteriófagos
  virus de la rabia 125, 131
  virus de la viruela vacuna 134
Virus RNA 124
Vitamina 31
  A 198
  B_{12}, producción 98f
  B_2 31
  biotina 94
  C 31, 98
  deficiencia de 198
  K 226
  niacina 31
  producción 96-98, 100
  producción 98
Vitis vinifera sylvestris 19
Vitravene (R) 194
Vodka 9
Volvox spp. 174
Vorticela 150

W

Warfarina 226
Wasabi 15
Western Blotting 269
Whisky 9

X

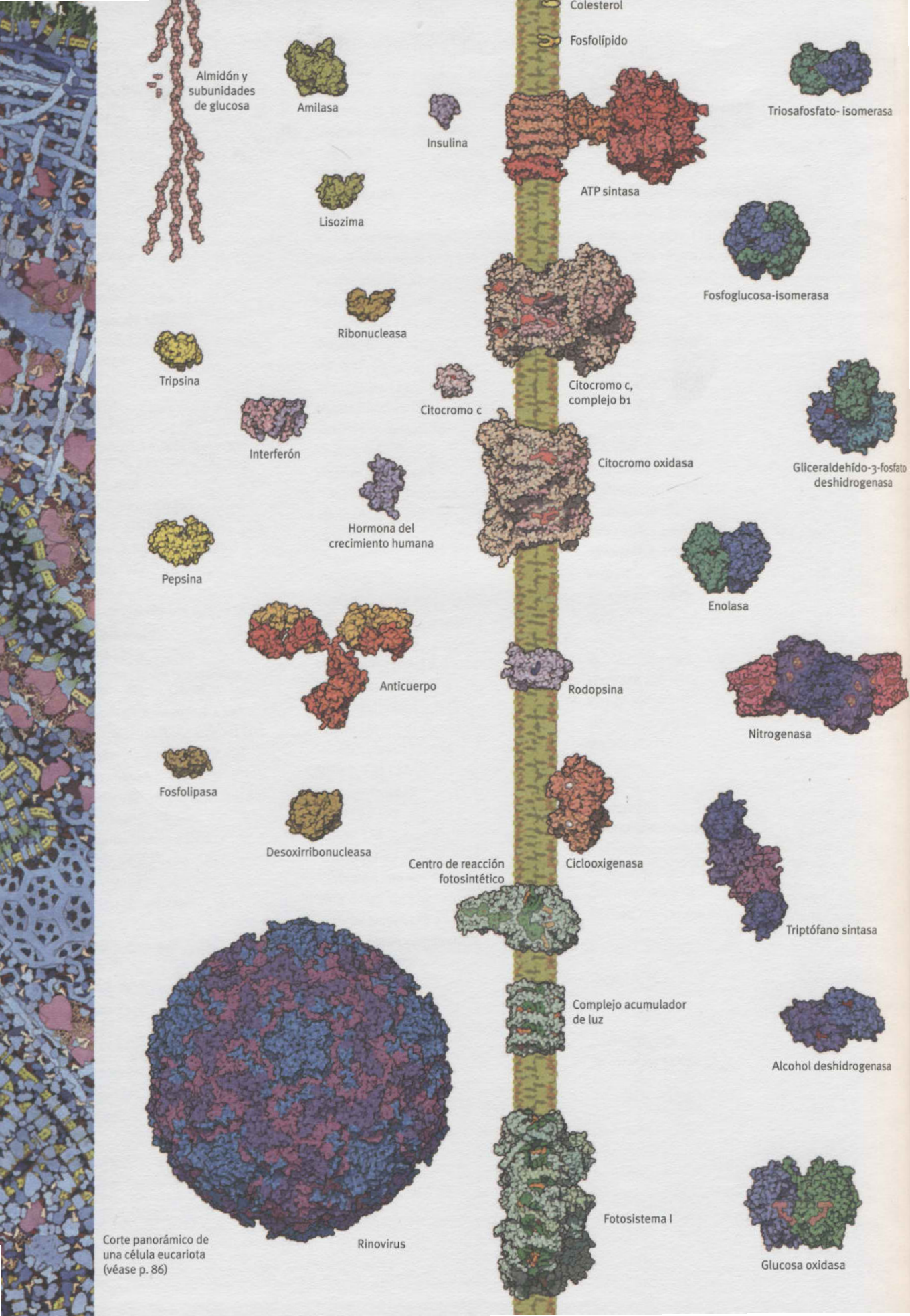
Xantano 165
Xanthomonas campestris 165
Xenopus laevis 65, 219
Xenotransplante 215, 217
Xilosa isomerasa 42
Xilulosa, ver Glucosa isomerasa

Y

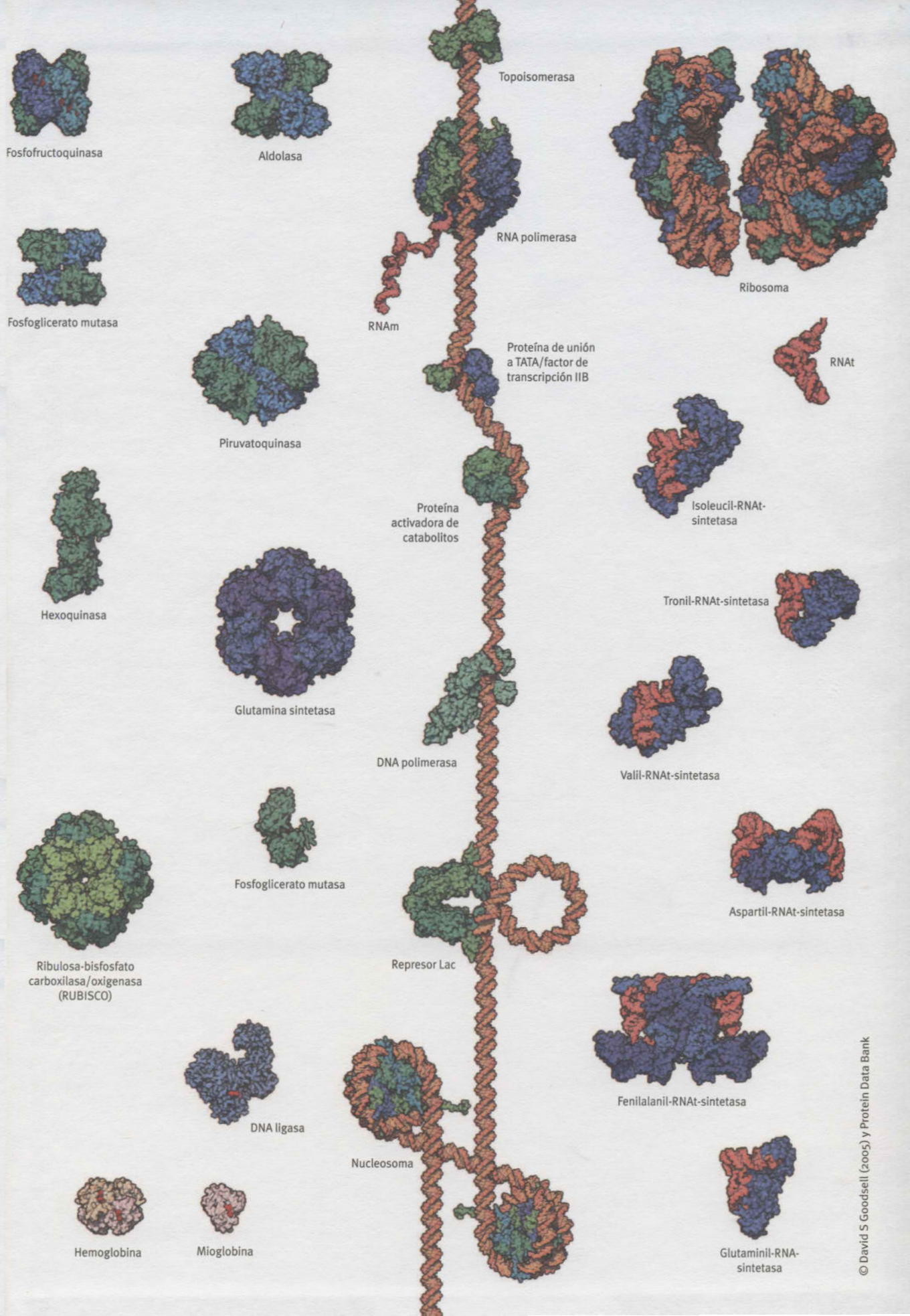
Yogur 14, 16

Z

Zidovudina 126
Zymomonas mobilis 15



Corte panorámico de una célula eucariota (véase p. 86)



© David S Goodsell (2005) y Protein Data Bank



REINHARD RENNEBERG

Biotecnología para principiantes

La biotecnología es una ciencia aplicada que utiliza organismos vivos y sus procesos bioquímicos con la finalidad de obtener, crear o modificar productos para usos específicos. Esta tecnología ha crecido y evolucionado hasta tal punto durante los últimos años que el número de profesionales que trabajan en las distintas áreas relacionadas directamente con ella es cada vez mayor. Este libro, dirigido a profesionales y a estudiantes del ámbito de las Ciencias de la Vida (Genética, Inmunología, Microbiología, Bioquímica, Agronomía, Ciencia de los Alimentos, etc.), es una emocionante y colorida visión general de la biotecnología. Por ello también es un manual útil y entretenido para aquellos lectores que, aun sin tener una sólida base científica, se sientan atraídos por esta interesante rama de la ciencia. Aquí encontrarán los aspectos más importante sobre este tema.

Biotecnología para principiantes cubre todos los aspectos principales de la disciplina, desde la biotecnología de alimentos, las enzimas, la ingeniería genética, los virus, los anticuerpos y vacunas, hasta la biotecnología ambiental, los animales transgénicos, la biotecnología analítica y el genoma humano. Pero, además, el autor plantea las oportunidades y los riesgos de determinadas tecnologías, que ilustra con referencias históricas, y destaca los temas clave que es necesario tener en cuenta. Este estimulante libro es de fácil lectura y comprensión a pesar de la amplitud y complejidad de este campo.

EDITORIAL REVERTÉ