

nuestra condición de salud y nutrición. Las líneas y proyectos se describen a continuación.

LABORATORIO	LINEA	PROYECTO
Ingeniería Genética y Biotecnología	1.—Producción de Proteínas de Importancia Biomédica por Ingeniería Genética	1A) Hormona de crecimiento humana recombinante
		1B) Hormona de crecimiento bovina recombinante
Medicina Molecular	2.—Diagnóstico molecular de enfermedades	2) Errores Innatos del Metabolismo
Manipulación y Expresión de Genes	3.—Genes Fósiles	3) Investigación de la presencia de genes "fósiles" en el genoma humano
	4.—Ingeniería de Genes y Proteínas	4A) Localización de regiones funcionales en la hormona de crecimiento humana 4B) ¿Es el gen humano hPL-1 un pseudogen?

AVANCES Y RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS PROYECTOS

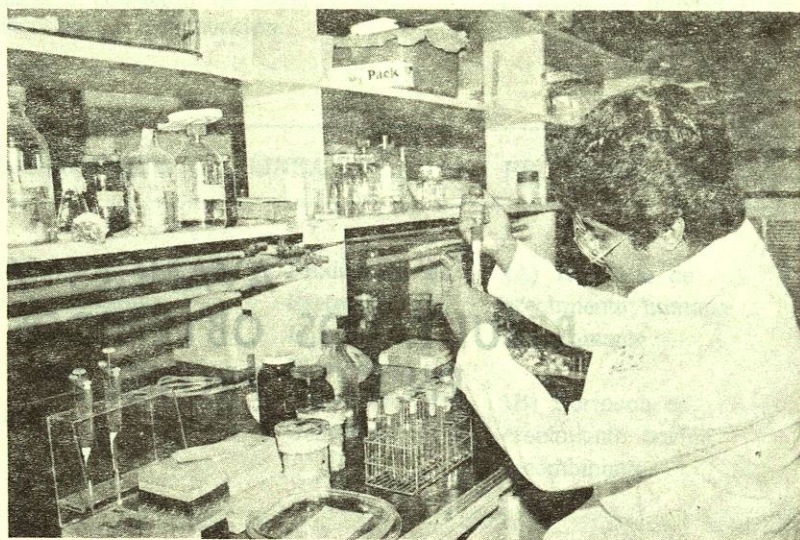
Línea 1: PRODUCCION DE PROTEINAS DE IMPORTANCIA BIOMEDICA POR INGENIERIA GENETICA

Proyectos: 1A) Producción de hormona de crecimiento humana (hGH) recombinante

1B) Producción de hormona de crecimiento bovina (bGH) recombinante

Resumen: Las hormonas de crecimiento de mamíferos son proteínas de alrededor de 191 aminoácidos responsables de su crecimiento corporal. Son sintetizados en el lóbulo anterior de la hipófisis y están involucradas en la regulación de diversos procesos metabólicos que incluyen el metabolismo del nitrógeno, lípidos, minerales y carbohidratos.

El uso de las técnicas de la Ingeniería Genética ha permitido la clonación y expresión de diversos genes eucarióticos en bacterias y con ello se ha logrado la producción, por fermentación bacteriana, de proteínas de interés para la medicina y la agroindustria a menor costo y en abundancia.



Así, se ha logrado la producción por fermentación bacteriana de hormona de crecimiento humana (hGH) y hormona de crecimiento bovina (bGH). A pesar de que las hormonas recombinantes poseen un residuo de metionina extra en su extremo N-terminal, generado por el proceso de ingeniería y clonación, sus actividades biológicas se mantienen normales.

Dada la enorme utilidad e importancia que representan bGH y hGH, los presentes proyectos tienen como metas sintetizar enzimáticamente (con la ayuda de transcriptasa inversa) el DNA complementario (DNAc) al RNA mensajero (RNAm) para cada una de estas hormonas y clonarlos en vectores de expresión bacterianos.

Esta información genética se usará para programar bacterias (*E. coli*) para que, por fermentación, produzcan cantidades abundantes de hGH y bGH recombinantes.

Avances: Hemos estado colectando hipófisis humanas extremando precauciones con el fin de obtener el tejido en el mejor estado posible. Para evitar la degradación de los ácidos ribonucleicos, las hipófisis son recuperadas en el mejor estado posible y se mantienen almacenadas en nitrógeno líquido. Mientras tanto, usando tejido de placenta humana como

modelo, hemos estandarizado los procedimientos para la extracción de RNA total y para la obtención de los RNAs mensajeros, con resultados satisfactorios. Así mismo, con la colaboración del Dr. Hans Matthes, del laboratorio del Profesor Pierre Chambon en Estrasburgo, Francia, se ha sintetizado químicamente un oligonucleótido complementario al extremo 3' del RNAm para hGH. Este oligonucleótido nos servirá de iniciador en la síntesis enzimática específica del DNA complementario al RNAm para hGH, paso crítico previo a la clonación molecular de esta información genética.

Por lo que respecta al proyecto sobre bGH y dada la mayor accesibilidad del tejido hipofisiario bovino, hemos alcanzado las siguientes metas: 1) Se colectaron aproximadamente 40 g de tejido, 2) una vez estandarizadas las técnicas para la purificación de RNA totales, se procesaron aproximadamente 30 g de tejido obteniéndose alrededor de 28 mg de RNA totales, 3) se caracterizó este RNA tanto por técnicas espectrofotométricas de luz ultravioleta como por electroforesis en gel, apreciándose en los resultados el buen estado del mismo, 4) se ha estandarizado la técnica de cromatografía de afinidad para la purificación de los RNA mensajeros, y 5) se han realizado ensayos preliminares de la síntesis enzimática de DNA complementario con buenos resultados, atestiguados tanto por una buena producción ($\sim 30\%$) como por la longitud (1,500 nucleótidos en promedio) del DNAc sintetizado *in vitro*.

Por otra parte, recientemente estuvimos en el Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la U.N.A.M. en la ciudad de Cuernavaca, Morelos para realizar la síntesis química y la purificación de cuatro oligonucleótidos que nos servirán de adaptadores en la clonación molecular del DNAc de bGH.

Finalmente, se está trabajando en la construcción de derivados tanto del plásmido pBR322 como pUC18, con el propósito de generar los vehículos de clonación requeridos para realizar las manipulaciones de ingeniería genética involucradas en la estrategia que hemos diseñado para la clonación molecular y la expresión del DNAc de la bGH madura.



Línea 2: DIAGNOSTICO MOLECULAR DE ENFERMEDADES

Proyecto 2: Errores Innatos del Metabolismo.

Resumen: Los errores innatos del metabolismo, que incluyen a las aminoacidopatías, son enfermedades cuyas características clínicas y bioquímicas se atribuyen a mutaciones genéticas. Estas conducen ya sea a una alteración en la función catalizadora de una enzima específica de la vía metabólica de algún aminoácido, o a cambios en la función de proteínas no ezimáticas. Este tipo de padecimientos a pesar de ser de origen genético y generalmente causantes de retraso mental, se pueden controlar mediante una dieta adecuada. Por ello es importante diagnosticarlas tempranamente para prevenir la aparición de daños irreversibles. Debido a esto y a que se desconoce la incidencia de diversas aminoacidopatías (como son: fenilcetonuria, enfermedad de orina de jarabe de arce, homocistinuria y tirosinemia) en la ciudad de Monterrey, hemos decidido realizar un estudio que abarcará dos

etapas. La primera consistiría en detectar algunas aminoacidopatías en niños hipotróficos. Con los datos que se obtengan de esta primera etapa, se podrá fundamentar y llevar a cabo la segunda etapa que consistirá en realizar un tamizaje de diversas aminoacidopatías en la población general de recién nacidos en el Hospital Universitario "Dr. José E. González". Este estudio nos permitirá consolidar el establecimiento de un centro de referencia para el diagnóstico oportuno de errores innatos del metabolismo en la región noreste de nuestro país. Hemos iniciado la primera etapa de este trabajo tomando muestras de sangre de niños hipotróficos a la semana de nacidos, las cuales analizamos por cromatografía unidimensional. En caso necesario, se ampliarán estos estudios empleando tanto cromatografía uni y bidimensional como pruebas químicas cualitativas con muestras de orina.



Avances: Los resultados obtenidos desde Septiembre 8 de 1986 hasta la fecha son los siguientes:

Se han analizado 137 niños hipotróficos que incluyen tanto de 6 a 8 días de nacidos como de mayor edad (hasta 3 meses).

Del total de niños estudiados, 101 fueron detectados normales a través de la cromatografía unidimensional de sus muestras de sangre. A 18 niños se les tuvo que ampliar su estudio con una muestra de orina la cual se analizó mediante pruebas bioquímicas y cromatografía en capa fina bidimensional. Los resultados de éstos fueron normales.

Nos quedan por confirmar los estudios a 5 niños, ya que al realizar la cromatografía unidimensional de sangre se detectó un aminoácido elevado en ambos casos. Por ello, en estos momentos estamos en proceso de localizarlos en sus domicilios para coleccionar una muestra de orina y poder ampliar su estudio mediante las pruebas bioquímicas empleadas para la detección de algunas aminoacidopatías y la cromatografía en capa fina bidimensional.

Paralelamente a los estudios realizados en niños hipotróficos, se han estado llevando a cabo estudios en niños considerados de alto riesgo, cuyas muestras nos llegan al laboratorio procedentes de Urgencias Pediátricas del Hospital Universitario, así como de otras instituciones (DIF, ISSSTE, consultorios particulares, etc.).

Los resultados obtenidos de estos estudios son los siguientes:

El total de niños de alto riesgo que ha sido sujeto al tamiz metabólico es de 92, de los cuales 88 resultaron normales, uno con resultados sospechosos (al cual se le está localizando para realizarle estudios confirmativos) y tres resultaron estar afectados. De estos últimos tres, uno resultó con prolinemia y los dos restantes con la enfermedad de orina de jarabe de arce.

Línea 3: GENES FOSILES

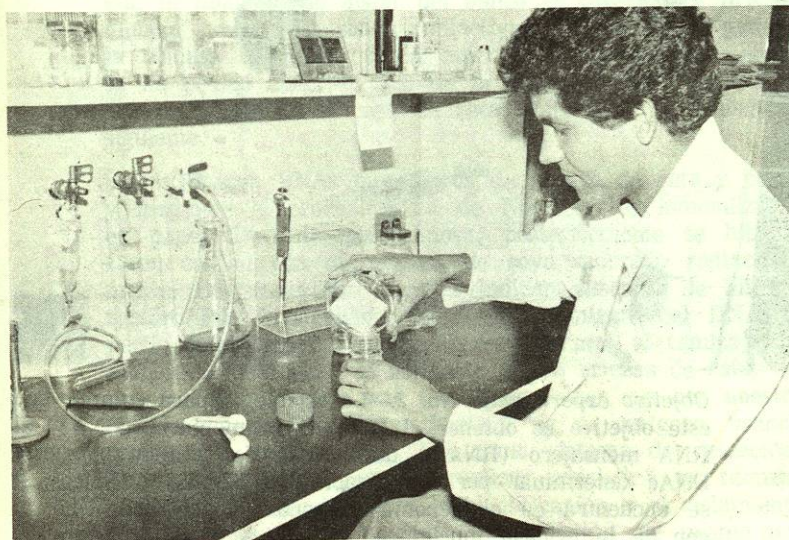
Proyecto 3: Investigación de la presencia de Genes "Fósiles" en el genoma humano.

Resumen: *Planteamiento del problema.*—En la mayoría de los mamíferos, el producto final de la degradación de las purinas es la alantoína, la cual resulta de la acción de la uricasa

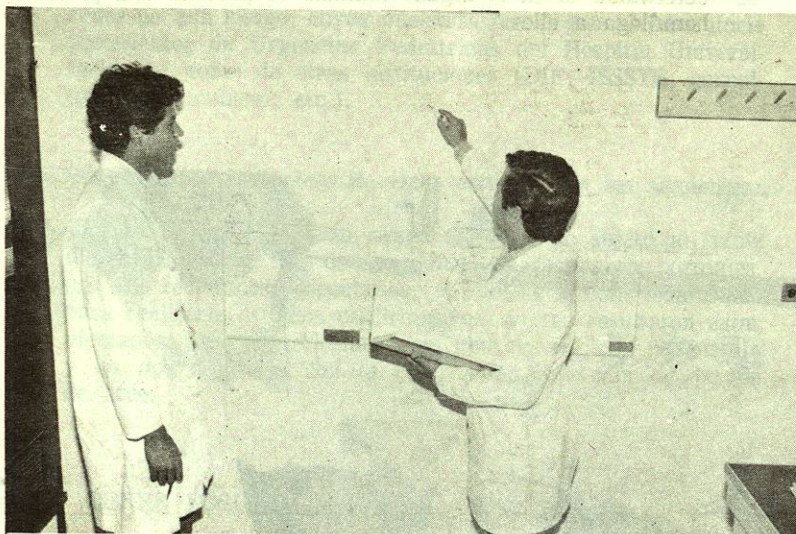
sobre el ácido úrico. Sin embargo, en el humano, debido a la ausencia de actividad de uricasa, el ácido úrico se acumula pudiendo ocasionar padecimientos como la gota.

El propósito de esta investigación es el de establecer las bases moleculares que expliquen la desaparición de la actividad de uricasa en la especie humana (o en el transcurso de la evolución del humano). Para cumplir con este propósito son dos los objetivos experimentales más inmediatos: 1) determinar si en el hígado humano se sintetiza la enzima uricasa en forma inactiva, y 2) determinar si en el genoma humano se conservó una secuencia génica que codifique para uricasa.

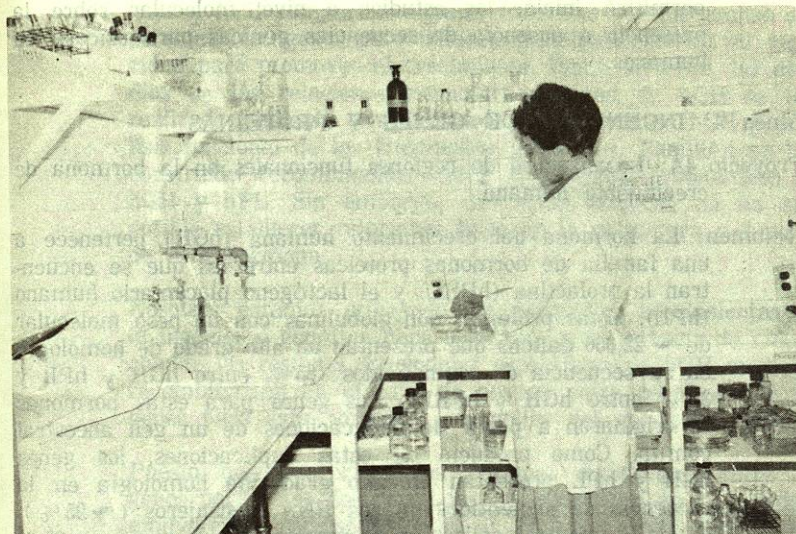
Avances: *Objetivo experimental No. 1.*—La estrategia para cumplir con este objetivo es producir antisuero contra dos uricasas de mamíferos (rata y cerdo) y usarlos como rastreadores para determinar si en el hígado humano se produce una proteína homóloga a ellos.



Se ha logrado producir antisuero mono específico contra la uricasa de cerdo (de la empresa Sigma Chemical Co.) y contra uricasa de rata. Esta última se purificó de acuerdo al procedimiento descrito por Watanabe y Suga en 1977; la proteína obtenida con este procedimiento se sometió a un gel de poli acrilamida-SDS del cual se electroeluyó la banda correspondiente a uricasa. Con ambas uricasas se inmunizaron conejos, determinándoseles la producción de anticuerpos mediante un Ouchterlony. Utilizando el procedimiento del "Western blotting", a los antisueros se les determinó su especificidad haciéndolos reaccionar contra extractos de hígado de rata y cerdo, según correspondiera. Finalmente, con el mismo procedimiento de Western blotting, estos antisueros se reaccionaron contra extractos de hígado humano, rata y cerdo. Los resultados preliminares indican que en el hígado humano se encuentra presente una proteína que pueda ser reconocida por nuestros anticuerpos contra uricasa de cerdo y rata.



Objetivo experimental No. 2.—La estrategia para cumplir con este objetivo es obtener el DNA complementario (DNAc) al RNA mensajero (RNAm) de uricasa de rata, y con este DNAc determinar por hibridización de ácidos nucleicos si se encuentra en el genoma humano un gen homólogo al gen de la uricasa murina.



El DNAc se obtendrá a partir de un banco de expresión conteniendo los DNAs complementarios a los RNAs mensajeros de hígado de rata, clonados en vectores fágicos.

Con la finalidad de aislar del banco el DNAc para uricasa murina usando una sonda radiactiva, se probó si el gen de la uricasa de soya (única especie de donde hasta ahora se ha podido aislar el gen de la uricasa) podría hibridizar con el RNAm de uricasa de rata. Para esto se realizó lo siguiente:

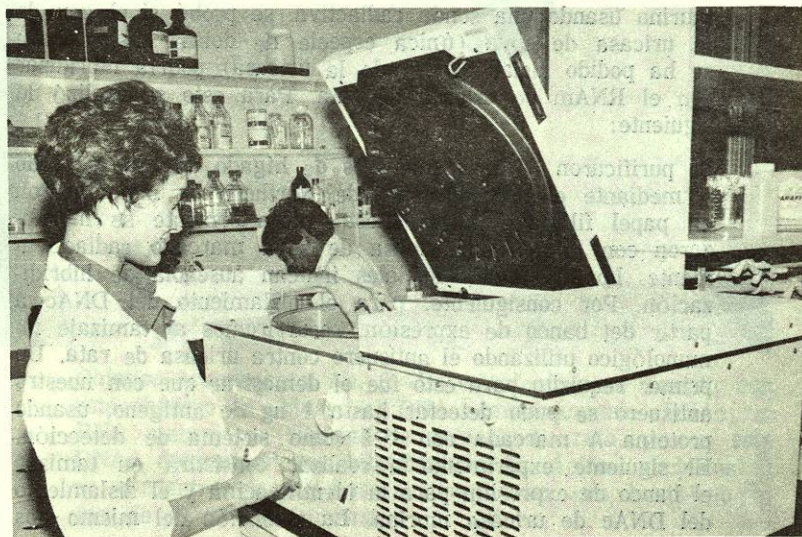
Se purificaron RNAs mensajeros de hígado de rata y cerdo y mediante el procedimiento de Northern se inmovilizaron en papel filtro de nitrocelulosa; posteriormente se hibridizaron con el gen de uricasa de soya marcado radiactivamente. Los resultados iniciales indican ausencia de hibridización. Por consiguiente, para el aislamiento del DNAc a partir del banco de expresión, recurriremos al tamizaje inmunológico utilizando el antisuero contra uricasa de rata. Un primer requisito para esto fue el demostrar que con nuestro antisuero se pudo detectar hasta 1 ng de antígeno, usando proteína A marcada con ^{125}I como sistema de detección. El siguiente experimento a realizar consistirá en tamizar el banco de expresión para la identificación y el aislamiento del DNAc de uricasa murina. La obtención del mismo nos

permitirá iniciar los estudios a nivel molecular sobre la presencia o ausencia de secuencias génicas para uricasa en humanos.

Línea 4: INGENIERÍA DE GENES Y PROTEINAS

Proyecto 4A: Localización de regiones funcionales en la hormona de crecimiento humana.

Resumen: La hormona del crecimiento humana (hGH) pertenece a una familia de hormonas proteicas entre las que se encuentran la prolactina (hPRL) y el lactógeno placentario humano (hPL). Estas proteínas son globulinas con un peso molecular de $\sim 22,000$ daltons que presentan un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos (85% entre hGH y hPL y 35% entre hGH y hPRL). Los genes para estas hormonas se originaron a partir de duplicaciones de un gen ancestral común. Como producto de estas duplicaciones, los genes hGH y hPL presentan un alto grado de homología en la secuencia de nucleótidos de sus RNA mensajeros ($\sim 95\%$), tienen la misma localización cromosomal en la región q 22-24 del cromosoma 17 y presentan una organización similar en sus genes, con cinco exones y cuatro intrones en la misma posición. A pesar de estas similitudes, los genes que codifican para estas hormonas son expresados en diferentes tejidos bajo diferentes mecanismos de control.



hGH y hPL comparten algunas funciones ya que ambas son potentes lactógenos pero difieren principalmente en su capacidad para promover el crecimiento. Hasta la fecha, los estudios de las relaciones estructura-actividad de hGH se han realizado mediante rompimientos proteolíticos de hGH y análisis funcional de los fragmentos generados. También se han construido recombinantes entre fragmentos proteolíticos de hGH y hPL. Sin embargo, con estas técnicas no ha sido posible establecer relaciones finas en la estructura y función de esta hormona.

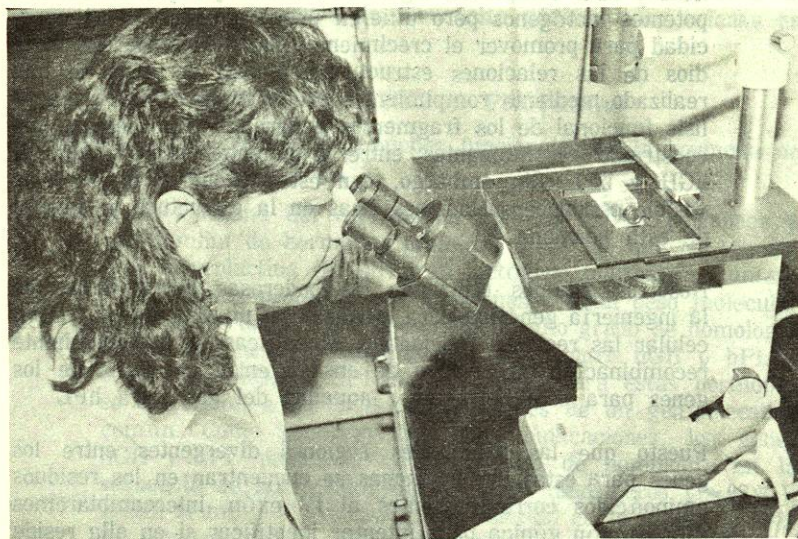
Nosotros estamos utilizando las poderosas herramientas de la ingeniería genética para localizar en un sistema de cultivo celular las regiones funcionales específicas de hGH mediante recombinación en el tubo de ensayo entre porciones de los genes para esta hormona y aquellas del gen para hPL.

Puesto que las principales regiones divergentes entre los genes para estas dos hormonas se encuentran en los residuos aminoácidos correspondientes al IV exón, intercambiaremos esta porción génica para intentar identificar si en ella reside una función que es específica de hGH: su capacidad de inducir la diferenciación de fibroblastos a adipocitos.

Para cumplir con nuestros objetivos diseñamos la siguiente estrategia: 1) Estableceremos las condiciones para la inducción de la diferenciación de fibroblastos a adipocitos en células transfectadas con el DNA de los plásmidos recombinantes portadores de los genes hGH y hPL, 2) Construiremos, mediante técnicas de ingeniería genética, genes recombinantes híbridos entre hGH y hPL con el cuarto exón de ambos genes intercambiado entre sí, y 3) Analizaremos estos plásmidos recombinantes en el modelo de diferenciación de fibroblastos a adipocitos.

Los conocimientos que se deriven de los estudios propuestos en este proyecto nos ayudarán a conocer mejor la biología y evolución moleculares de este importante complejo génico codificante para hGH y hPL, y a elucidar las bases moleculares del proceso de diferenciación de fibroblastos a adipocitos en respuesta a hGH.

Avances: Hasta la fecha caracterizamos y obtuvimos mediante técnicas de ingeniería genética los DNAs de los plásmidos recombinantes que contienen tanto el gen hGH como el hPL. Aunque este sistema génico o vector. (pSVgpt) posee regiones



de control de la transcripción derivados de SV40, los genes hGH y hPL introducidos poseen sus promotores naturales. Introdujimos el DNA de estos plásmidos recombinantes en células HeLa y fibroblastos 3T3, a las 48 h después de la transfección obtuvimos los RNAs totales los separamos en geles de formaldehído-formamida, los transferimos a papel "zetaprobe", los hibridizamos con una sonda radiactiva (DNAc-hPL) y los dejamos exponer en una película de rayos X (autorradiografía). En paralelo, adicionamos los sobrenadantes y extractos de células 3T3 transfectadas con estos plásmidos a cultivos nuevos de fibroblastos 3T3 para intentar así inducir la diferenciación a adipocitos. Los resultados indican que establecimos las condiciones para la detección de RNAs específicos y que falta estandarizar la expresión de los genes transfectados en células eucarióticas, ya que detectamos una banda única solamente en el carril que contenía RNAs aislados de placenta humana (testigo positivo), indicándonos esto que la expresión de los plásmidos recombinantes que contienen los genes hGH y hPL en las células fue muy baja o nula con el sistema utilizado. Por consiguiente, tampoco observamos diferenciación al agregar los sobrenadantes. Debido a lo anterior, estamos iniciando una nueva serie de estudios como los arriba descritos, solo que

en esta ocasión utilizaremos un sistema genético diferente donde la expresión de los genes estará bajo el control del promotor del gen de la mitaloteoneína. De no funcionar este segundo sistema, pensamos recurrir al promotor y secuencias potenciadoras de la transcripción ("enhancer's") del citomegalovirus, recientemente descrito como 10 veces más potente que el sistema basado en vectores derivados del virus oncogénico SV40.

Proyecto 4B: ¿Es el gen hPL-1 un pseudogen?

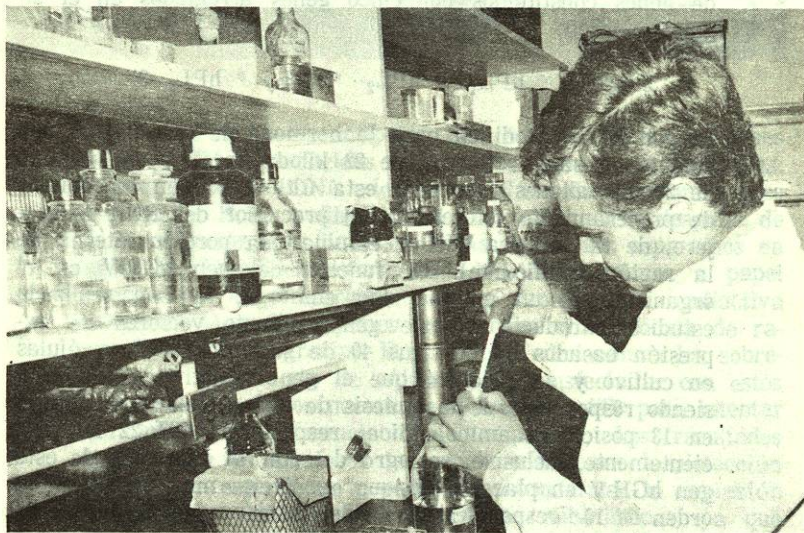
Resumen: Técnicas de Ingeniería Genética nos han permitido analizar a nivel molecular la estructura, expresión y evolución del complejo génico codificante para las hormonas lactogénica placentaria (hPL) y de crecimiento humanas (hGH). Este complejo comprende aproximadamente 50,000 bases en la región q22-24 del cromosoma 17 y consiste de una familia de genes constituidos por cinco genes arreglados en el siguiente orden:

5'-hGH_N * hPL₁ * hPL₂ * hGH_V * hPL₃ -3'

El gen hGH-N codifica para la hormona de crecimiento circulante en sangre (forma de 22 kilodaltones) y su variante de 20 kilodaltones (generada esta última por un mecanismo de procesamiento diferencial del precursor del RNA mensajero, de tal manera que se elimina una porción interna de la región codificante). La función del gen hGH-V en el organismo es un enigma. Sin embargo, se han realizado estudios introduciendo este gen mediante vectores de expresión basados en el virus 40 de simio (SV40), a células en cultivo y se encontró que el gen es activo y funcional siendo responsable de la síntesis de una proteína que difiere en 13 posiciones aminoacídicas respecto a hGH 22 kd. Recientemente, inclusive, se logró detectar la expresión de este gen hGH-V en placenta aunque en niveles muy bajos (en el orden de 10⁻⁴ respecto a los niveles de expresión de los genes para hPL).

Los genes hPL-2 y hPL-3 son los responsables de la síntesis de hPL, hormona que llega a producirse en placenta a término hasta en un gramo por día. Sin embargo, deleciones genéticas que eliminan simultáneamente los genes hPL-2 y hPL-3, así como al gen hGH-V, sugieren que hPL no es una hormona necesaria para el embarazo y crecimiento fetal,

ya que tanto el embarazo como el producto fueron normales en estos pacientes. hPL-1 fue el único gen tipo hPL que no se perdió con la delección de estos pacientes. Sin embargo, datos preliminares sobre la estructura y evidencias indirectas sobre la expresión de este gen indican que posiblemente no se exprese en placenta a término. Con el propósito de determinar la naturaleza del gen hPL-1 para replantear la importancia de hPL en el embarazo y crecimiento fetal, este proyecto tiene como objetivo construir plásmidos recombinantes con los genes hPL-1 y hPL-3 para ser introducidos a células en cultivo y analizar la expresión de estos genes. Con estos estudios pretendemos analizar las propiedades y características del gen hPL-1 y la naturaleza de sus posibles productos génicos.



La estrategia general que diseñamos para obtener información acerca del papel que juega la mutación presente en el sitio donador del procesamiento del intrón II del gen hPL-1 en su expresión, es la siguiente: Primero tener los genes hPL-1 (problema) y hPL-3 (testigo positivo insertos en vectores plasmídicos de expresión en eucariotes, luego intercambiar entre ellos los fragmentos Pvu II-Sac 1 (~115 pb)

dentro de los cuales se localiza la mutación, posteriormente transfectar estos genes tanto originales como recombinantes en un sistema de células en cultivo y analizar por último su expresión a nivel de RNA por medio de la técnica llamada "Northern".

Avances: Hasta el momento hemos progresado en nuestra estrategia, realizando lo siguiente:

I.—Se obtuvieron los plásmidos pSV2gpt con los genes hPL-1 y hPL-3 insertos en su sitio Eco RI.

II.—A partir de estos vectores se construyeron los genes hPL-1 "reparado" (con el segmento Pvu II-Sac I de hPL-3) y hPL-3 "mutado" (con el segmento homólogo de hPL-1).

III.—Después de haber purificado el DNA de los cuatro plásmidos, se procedió a verificar el intercambio de las regiones Pvu II-Sac 1 entre ambos genes. Dicha verificación se realizó por dos maneras:

a) *Digestión con la endonucleasa de restricción Alu 1.*— Se basa en la presencia de un sitio Alu 1 en el fragmento Pvu II-Sac 1 de gen hPL-1, pero que está ausente en el hPL-3.

b) *Secuenciamiento de nucleótidos de la región intercambiada.*— Realizado por el método de Sanger, usando inhibidores de la síntesis de DNA.

IV.—Se han iniciado las primeras transfecciones (16 transfecciones), sin embargo, no ha sido posible detectar ninguna señal. Pensamos que esto se debe a la baja sensibilidad de nuestro sistema por lo que hemos decidido cambiar el tipo de células. Hemos estado usando células HeLa, y creemos conveniente cambiar a células COS, en las cuales se ha demostrado que ocurre duplicación de plásmidos que como los nuestros contienen el origen de replicación de SV40. Esperamos con esto aumentar la cantidad de templado para la transcripción y, por ende, aumentar también la señal proveniente de los transcritos.

FORMACION DE RECURSOS HUMANOS

Paralelamente al desarrollo de nuestros programas de investigación hemos perseguido formar especialistas en los diferentes niveles académicos dándoles una preparación sobre los conocimientos básicos y las fronteras en los estudios de Biología Molecular del genoma eucariote. Así mismo, esta formación teórica ha sido complementada con una instrucción sobre las técnicas básicas de Ingeniería Genética convertidas ya en herramientas muy poderosas para el estudio de la célula.

A.—Cursos de apoyo a otras instituciones.

Los siguientes cursos teórico-prácticos han sido impartidos:

- 1.—Curso de Bioquímica a los estudiantes de la Carrera de Biólogo del Insituto Tecnológico de Cd. Victoria, Tamaulipas.
- 2.—Curso sobre Técnicas de Ingeniería Genética a los estudiantes de la maestría en Biología Celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, en México, D. F.