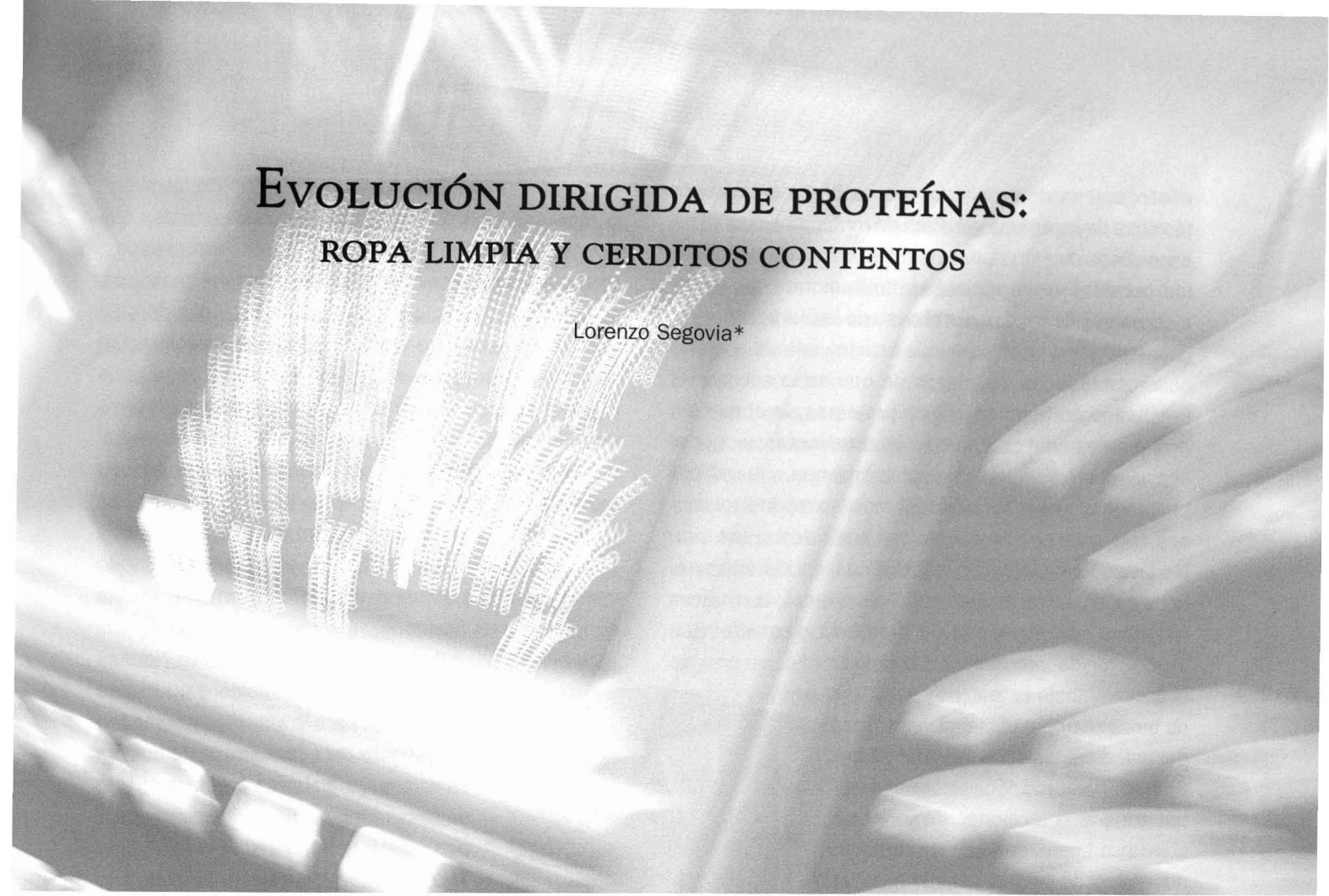




EVOLUCIÓN DIRIGIDA DE PROTEÍNAS: ROPA LIMPIA Y CERDITOS CONTENTOS

Lorenzo Segovia*

Una definición funcional de la biotecnología es el uso de seres vivos, de sus capacidades metabólicas o de sus componentes para la obtención de soluciones novedosas a los grandes retos que enfrentamos. En este sentido la biotecnología es “verde”, ya que busca sustituir procesos contaminantes y caros por sistemas biológicos limpios, más económicos. La especie humana ha utilizado la biotecnología, aunque con otros nombres, desde hace más de 12 mil años, cuando surgió la agricultura. A partir de ese momento empezamos a seleccionar plantas para satisfacer, de la mejor manera, nuestras necesidades tanto a nivel nutricional como por sus características de resistencia a plagas o enfermedades. Estas propiedades fueron seleccionadas a través de cruces entre líneas que llevaran algunas de ellas.

A partir de los años setenta se empezaron a desarrollar algunas técnicas que permitían la manipulación

directa de los genes que conferían propiedades particulares a algún organismo y su transferencia a otro distinto, rompiendo incluso las barreras genéticas de la especie. Estas técnicas, englobadas bajo el nombre genérico de ingeniería genética, dieron a luz a la biotecnología moderna, y fueron las que han permitido los alcances actuales.

Los beneficios de la biotecnología han repercutido en las vertientes más diversas de la actividad humana: desde la producción de insulina humana en células bacterianas hasta la confección de tortillas más suaves y con mayor vida de anaquel, pasando por la producción de anticoagulantes a partir de la saliva de vampiros y por la obtención de organismos genéticamente modificados. Algunas de las aplicaciones más novedosas dependen de la obtención de variantes de enzimas existentes, las cuales adquirieron propiedades distintas a las originales. Esto se ha conseguido, principalmente, a través de dos enfoques: la bioprospección, es decir, la búsqueda de enzimas con la misma actividad catalítica provenientes de organismos distintos,

* Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis-Instituto de Biotecnología de la UNAM

y la ingeniería de proteínas, que es la generación por técnicas de ingeniería genética de mutaciones en sitios específicos de estas proteínas, las cuales les confieren los cambios deseados. Las limitaciones de estos alcances son variadas. En el caso de la bioprospección uno depende de que primero exista la variante que uno busca en la biosfera, y luego de que se la encuentre. En el caso de la ingeniería de proteínas, la obtención de variantes está limitada, en primera instancia, por el conocimiento *a priori* sobre estas enzimas, y luego, por la ignorancia que todavía tenemos sobre las relaciones entre la secuencia de aminoácidos y las propiedades físicoquímicas y catalíticas de las enzimas. Para paliar estas limitaciones se inventó una nueva variante de la ingeniería de proteínas, llamada “evolución dirigida”, la cual no presupone conocimiento de antemano y sólo estaría limitada por la eficiencia intrínseca de la manipulación en el laboratorio. Se han inventado técnicas que permiten generar colecciones de variantes con un número definido de mutaciones al azar en un gen, para tener todos los cambios posibles, hasta de tres aminoácidos, en una proteína promedio. Además, también contamos con sistemas sofisticados que permiten la selección o identificación de las variantes con los más disímiles perfiles de actividad. Al utilizar estos protocolos de generación de variabilidad genética y procesos de selección –como sucede en el proceso de evolución natural–, se han obtenido nuevas enzimas con cambios en propiedades físicoquímicas, imposibles de obtener con las técnicas usuales de ingeniería de proteínas.

ROPA LIMPIA

Todos sabemos que hay algunas manchas en la ropa “imposibles” de quitar, como las manchas de grasa de lápiz labial o para lustrar zapatos, las de aguacate y de cualquier otro ingrediente culinario. Los tratamientos más eficientes consistían en lavar a altas temperaturas –por ejemplo, hirviendo la ropa– y tallar con singular energía; sin embargo, estos tratamientos son incompatibles con algunos tejidos y la mejor receta

para arruinarlos. Para facilitar la acción de los detergentes se empezó a agregar a la mezcla enzimas que ayudaban a quitar la “mugre”. Se añadieron lipasas, celulasas, proteasas y amilasas, principalmente, para degradar grasas, celulosa, proteínas y almidón. La acción de estas proteínas ayuda a la solubilización de los componentes de la “mugre” en el detergente y, por ende, a limpiar. Sin embargo, estas enzimas no resultan tan eficientes, pues también son degradadas y solubilizadas, y no alcanzan a llevar a cabo toda su acción limpiadora. Esto ha sido resuelto, en parte, encapsulando las enzimas, de manera que sólo se liberen al contacto con el agua, y buscando variantes que funcionen más eficientemente en las condiciones de lavado.



La compañía danesa Novo Nordisk es uno de los principales productores de enzimas para la industria y, como tal, fue pionera en el desarrollo de nuevas soluciones a distintos problemas. Uno de sus productos más exitosos es una lipasa extracelular aislada del hongo *Thermomyces lanuginosa*, la cual, bajo el nombre comercial de *Lipolase*, es adicionada a gran cantidad de detergentes para ropa y trastes. Aunque esta enzima es muy eficiente para los fines esperados, se ha visto que su actividad dista

mucho de ser óptima en presencia de detergentes caseros. Para que funcione, se debe abrir y cerrar una tapa que cubre el sitio activo de la enzima. Los detergentes y solventes en que se ha ensayado esta enzima modulan la actividad interfiriendo con la abertura, y se ha mostrado que mutaciones en la enzima, en la zona de la tapa, varían este efecto. Pese a ser muy barata, y a tener un mercado enorme, la *Lipolase* de Novo Nordisk estaba desperdiciada, pues había que agregar más enzima, ya que trabajaba en condiciones menos óptimas en la lavadora.

Los científicos de esta compañía se dieron a la tarea de mejorar su eficiencia. Los primeros enfoques, basados en la ingeniería de proteínas, consistieron en diseñar mutaciones en sitios específicos de esta enzima, pues pensaron que se obtendrían así variantes más activas en presencia del detergente. Después de va-

rios años de ensayo y error (más lo último que lo primero), reconocieron su ignorancia y se aprestaron a utilizar un enfoque de fuerza bruta. Sabían qué querían obtener: una *Lipolase* más activa en el detergente casero. Sabían que los cambios debían ser en nueve posiciones alrededor del sitio activo, pero no sabían cuáles ni cuántas (y no les importaba mucho). El sistema de selección consistió en buscar variantes que se pegaran a un inhibidor en presencia de detergente casero sólo cuando eran activas. Como no conocían las mutaciones necesarias, diseñaron una colección con todas las combinaciones posibles de mutaciones en los nueve sitios identificados. Inicialmente encontraron que la mayoría de los cambios eran deletéreos para la enzima, ya que perdía toda actividad, aunque existían variantes hasta con siete cambios simultáneos, las cuales seguían siendo activas, pero menos que la cepa inicial. Posteriormente se percataron de que tenían demasiadas mutaciones a la vez, y el hecho de tener siempre alguna que era nociva hacía que la actividad no fuera óptima. Al rehacer sus bancos y favorecer la presencia de variantes con pocas mutaciones, encontraron que un solo cambio (el cual no habían predicho ni observado) era suficiente para obtener una mejor actividad en presencia de detergente. Esta mutante se llama ahora *Lipolase Ultra*, y pronto se encontrará en un detergente cerca de usted. Las ventajas que confiere desde el punto de vista económico consisten en obtener el mismo poder limpiador con una menor cantidad de enzima que no cambia casi de precio. Por otro lado, se sabe que algunas de las enzimas que se agregan a estos detergentes pueden ser alergénicas, por lo cual, al disminuir su cantidad, disminuye el riesgo de tener efectos no deseados.



CERDITOS CONTENTOS I

El fósforo es uno de los nutrientes esenciales para todos los organismos, ya que es usado para los procesos básicos de la vida. Como tal, en la forma de fosfato, debe ser parte de la dieta de cualquier organismo para que siga viviendo. Las plantas incorporan el fosfato inorgánico del suelo en distintas moléculas, como el ácido fítico. Idealmente, cuando un animal se come a una

planta, debería incorporar el fosfato proveniente de la misma. Sin embargo, se ha visto que la mayoría de los animales no aprovechan esta fuente, ya que carecen de las enzimas necesarias para degradar el fitato. Así, el ácido fítico sale como entra, y sólo es degradado por enzimas de hongos y otros microorganismos en el estiércol. Cuando esto se multiplica por el número de animales que se encuentran en una granja de ganadería intensiva, la cantidad de fosfato liberado al medio ambiente es muy grande y contamina los ríos y lagos aledaños. El fosfato es, en general, el nutriente limitante para el crecimiento de las algas y plantas acuáticas, por lo que su adición intempestiva en estos cuerpos de agua provoca un sobrecrecimiento. Al morir, estas plantas son degradadas por bacterias que consumen la mayoría del oxígeno disuelto, al grado de que los peces comienzan a morir masivamente. Por lo tanto, tenemos un problema bastante complejo: aunque la comida de animales de granja contiene naturalmente grandes cantidades de fosfatos, no se utiliza eficientemente, por lo que debemos agregar más para que estén sanos y crezcan bien. A su vez, el fosfato sin utilizar provoca un problema de contaminación acuática muy serio.

Una de las primeras acciones para resolver esta paradoja fue la de agregar fitasa, la enzima que degradaba el ácido fítico, a las mezclas de alimento para liberar los fosfatos. Esto funcionaba bien, salvo por un detalle: la comida que se utiliza en las granjas está procesada para formar croquetas, a través de un proceso de calentamiento de la mezcla de alimentos a más de 80°C, y esto desactiva cualquier fitasa natural conocida hasta ahora. Para liberar el fosfato era necesario agregar grandes cantidades de enzima que actuaran antes de que la mezcla se fermentara. Esto era económicamente inviable y técnicamente difícil de controlar; por lo tanto, era imperativo buscar una fitasa termorresistente que sobreviviera al proceso de preparación de la comida. Una manera de obtener enzimas termoestables era buscarlas en organismos que viven a altas temperaturas. Al realizar estas búsquedas resultó que las fitasas sólo se encuentran en organismos que crecen a temperaturas de entre 20 y 40°C. La única alternativa era tomar alguna fitasa y

obtener variantes activas a temperaturas cada vez mayores. Varios grupos de investigación, tanto en el sector académico como en algunas de las compañías más grandes, se abocaron a la tarea; sin embargo, los resultados obtenidos eran magros y no se alcanzaban niveles altos de termorresistencia. Uno de estos grupos, perteneciente a la compañía Roche Vitamins, usó un enfoque totalmente novedoso. Al comparar las secuencias de aminoácidos de fitasas provenientes de varios hongos, se observó que no se podía atribuir ninguna propiedad catalítica ni físicoquímica particular a las diferencias observadas y que eran bastante parecidas. Se decidió sintetizar una proteína con la secuencia consenso de todas estas enzimas. Esta quimera tenía todo lo común a estas fitasas y carecía de los cambios que las individualizaban. La sorpresa fue mayúscula cuando se advirtió que esta quimera era mucho más termoestable y tan activa como cualquiera de las otras. Además, ninguna de sus propiedades catalíticas estaba alterada. Se obtuvieron más secuencias de fitasas y se generó un nuevo consenso, que se volvió a sintetizar. Esta nueva quimera resistía temperaturas cerca de los 100°C, aunque era un poco menos activa. Se generaron mutantes al azar y se encontró una variante que, aunque perdía un poco la capacidad de termorresistencia, adquiría, en cambio, el nivel de actividad enzimática original. Las pruebas realizadas hasta ahora muestran que cuando se agrega esta enzima a la comida, los animales que la ingieren asimilan hasta 60 por ciento más de fosfato y, por ende, producen mucho menos contaminación.

CERDITOS CONTENTOS II

Recientemente otra alternativa para solucionar este problema fue propuesta. Ya que los animales de granja carecían naturalmente de fitasa, había que modificarlos genéticamente, de manera que la produjeran endógenamente. Un grupo de veterinarios daneses y canadienses decidió hacer cerdos transgénicos que produjeran fitasa en la saliva. Sin hacer el cuento largo, utilizó técnicas modernas de ingeniería genética y de generación de transgénicos, y obtuvo 14 lechones que producían fitasa en la saliva en cantidades variables. El análisis de estas líneas mostró que los que producían la mayor cantidad de fitasa eran capaces de aprovechar prácticamente todo el ácido fítico encontrado en su forraje, sin necesitar suplemento adicional, y que además excretaban niveles muy bajos de fosfato. Estos cerdos representan un enfoque totalmente original al problema del control de la nutrición de fosfatos y la contaminación asociada.

Las técnicas actuales de evolución dirigida e ingeniería de proteínas han permitido la obtención de soluciones viables a problemas de lo más diverso. En este momento, una de las limitaciones principales en esta área de investigación es el número de variantes que uno puede generar; uno puede obtener hasta 10^8 (cien millones) de variantes en un experimento utilizando las técnicas estándar de laboratorio. Sin embargo, recientemente se han reportado técnicas que permiten obtener hasta 10^{14} (cien billones) de variantes, lo cual nos permitirá acceder a un nivel mucho mayor de complejidad en nuestra investigación. ☼

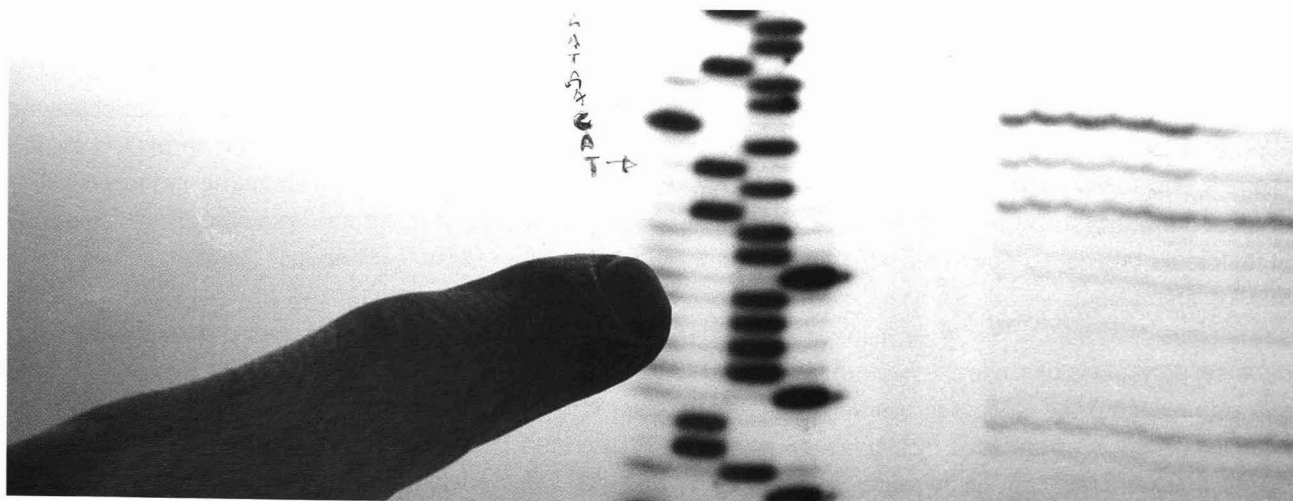


Foto: 3 Ríos