

**Moderador: M.
Fernández Rivas**

Fundación Hospital
Alcorcón. Madrid

B. Bartolomé

BIAL-Arístegui. Departamento
de I+D. Bilbao.

SESIÓN DE ACTUALIDAD

ALIMENTOS TRANSGÉNICOS Y SU IMPLICACIÓN EN ALERGIA

Alimentos transgénicos: por qué y cómo se desarrollan

INTRODUCCIÓN

La permanente necesidad de satisfacer la demanda de alimento, vestido y materias primas, ha sido la causa de que, desde la aparición de la agricultura, la ganadería y la utilización de microorganismos en la producción de alimentos (vino, cerveza, pan, yoghurt, queso) se cultivaran y seleccionaran los organismos vivos de mayor interés. El hombre buscaba en esa mejora biológica obtener variedades que ofrecieran mayor rendimiento, calidad nutritiva, facilidad de cultivo y resistencia a agentes bióticos y abióticos. La mejora biológica actual hunde sus raíces en los experimentos realizados por Gregor Mendel en el siglo XIX, en los que concluyó que los caracteres de los organismos vienen determinados por factores discretos heredables (genes).

La selección de aquellas cepas de microorganismos (bacterias y levaduras) que mejor se adaptaban a los procesos de producción y a los objetivos de calidad nutritiva y organoléptica de los alimentos producidos, se ha mantenido de forma constante desde los albores de la civilización. Esta selección se comenzó a realizar, y se realizó durante mucho tiempo, sobre mutantes naturales aparecidos de forma espontánea en la naturaleza, o sobre mutantes artificiales obtenidos con la ayuda de condiciones físicas especiales o agentes químicos que podían incrementar la tasa de mutación y, por tanto, de aparición de cepas con nuevos caracteres.

El desarrollo de la microbiología alcanzada en los siglos XIX y XX ha permitido el uso de técnicas de mejora de microorganismos basadas en la biología reproductiva y en la genética de tales seres vivos, como la conjugación o la transducción vírica de genes (transferencia de genes entre especies a través de un virus que es capaz de infectar a ambas). Con la llegada de la ingeniería genética y de la biología molecular en los últimos 30 años, otro tipo de estrategias y técnicas están siendo utilizadas para llevar a cabo la mejora genética de las cepas. Un poco más abajo veremos algunos ejemplos de este tipo, aplicados a las cepas utilizadas en la producción de alimentos.

El método tradicional de producción de cultivares mejorados se sustenta en el cruzamiento entre variedades, dentro de la misma especie o especies emparentadas y, por tanto, filogenéticamente muy próximas. Los individuos sobresalientes, híbridos interespecíficos o intergenéricos, se seleccionan, y después de

numerosas tandas de cruzamiento y retrocruzamiento (introgresión), aunadas a laboriosas pruebas de campo, se obtiene una generación portadora de la característica deseada y a la que se reconoce como una nueva variedad. El principal factor limitante del proceso de producción de híbridos vegetales reside en la incompatibilidad sexual entre especies seleccionadas como progenitoras. Si entre ellas media una gran divergencia genética será baja la probabilidad de obtener semillas viables de tal cruzamiento. En el caso de la mejora ganadera, los límites de la producción estable y heredable de nuevos caracteres mediante transferencia génica natural, todavía son más estrechos, al estar restringidos a la reproducción sexual entre individuos pertenecientes a variedades o razas de la misma especie.

La ingeniería genética permite el acceso y manipulación directa de la información contenida en el ADN. Con esta técnica se pueden, literalmente, cortar y sacar genes de su contexto genético natural para llevarlos a otro sitio; pudiéndose incluso crear genes sintéticos. Esta técnica, también conocida como del ADN recombinante, rompe las barreras impuestas por la incompatibilidad sexual y nos deja introducir en plantas y animales genes, y por tanto caracteres o propiedades, provenientes no sólo de otras especies vegetales y animales, muy alejadas desde el punto de vista de la evolución, sino incluso genes de otros reinos biológicos (hongos, virus o bacterias).

En la mejora clásica, en cada cruzamiento, se obtiene una descendencia que combina miles de genes procedentes de los parentales, sin embargo, mediante ingeniería genética se introducen sólo uno o varios genes en cada transformación. Los programas de fitomejoramiento actuales, apoyados en la ingeniería genética, se proponen, igual que los de ayer, aumentar el rendimiento, disminuir las pérdidas ocasionales por plagas y enfermedades y reducir los costos de producción. Pero abrigan intereses más ambiciosos en el ámbito industrial, químico y farmacéutico.

Esta visión de los caracteres y fenotipos de los seres vivos basada casi exclusivamente en los genes, olvidando la influencia del entorno y del contexto genético, en el que se sitúan (genoma del individuo) ha hecho que hoy en día gran parte de los investigadores que trabajan en mejora vegetal, así como la corriente financieramente más importante de la agroeconomía, consideren la obtención de plantas transgénicas (portadoras de un gen ajeno, foráneo o heterólogo) como el medio más versátil, preciso y de mayor potencialidad, para producir variedades vegetales mejoradas. Esta línea de trabajo está siendo ampliamente criticada por algunos sectores del mundo de la biología.

ORGANISMO TRANSGÉNICO Y APLICACIONES. ANIMALES TRANSGÉNICOS

Un organismo transgénico u organismo genéticamente modificado (OGM) es aquel ser vivo obtenido al introducir en una especie biológica, de forma estable y heredable, un gen heterólogo mediante técnicas de ADN recombinante. En cuanto a si el gen foráneo debe ser de una especie diferente a la receptora o puede ser de la misma especie para que sea considerado organismo transgénico, se pueden encontrar todas las versiones, aquí pondremos el peso de la definición en la tecnología y metodología de introducción y no en el origen del gen. De este forma, en este texto, se consideran transgénicos a los organismos obtenidos con esta tecnología, cualquiera que sea el origen del gen. Los métodos utilizados para obtener los distintos organismos transgénicos serán específicos de cada tipo de ser vivo (bacterias, levaduras, plantas o animales), independientemente del fin buscado en la transgenia. La finalidad del proceso de transgenia la determinará el uso que se le dé a la cualidad del carácter introducido con el gen, así habrá transgenias con fines farmacéuticos, medioambientales, fines de mejora agrícola (resistencia herbicidas, resistencia a plagas, tolerancia a condiciones estresantes de crecimiento) y todas ellas, dentro del mismo tipo de organismos, se obtendrán siguiendo un procedimiento o protocolo similar.

Las potencialidades que esta nueva tecnología tiene de modificar los organismos vivos se está aplicando o está en desarrollo su aplicación, en muchos ámbitos de las actividades del hombre distintas al campo de la alimentación. Como ejemplo puede señalarse el uso de organismos modificados por ingeniería genética en el campo del medio ambiente o de la empresa farmacéutica. La biotecnología medioambiental o biorremediación es una tecnología que pretende solucionar problemas medioambientales mediante el uso de organismos vivos. Algunos de estos organismos han sido obtenidos mediante técnicas de ADN recombinante, así es el caso de ciertas variedades vegetales de la familia de las crucíferas, que son utilizadas para absorber metales tóxicos a través de sus raíces, sirviendo de descontaminadores de suelos. Se están haciendo esfuerzos para producir, mediante ingeniería genética, variedades vegetales que presenten unas composiciones y proporciones de polímeros de carbohidratos (almidón, celulosa, etc.) óptimas para, mediante fermentación de los mismos con microorganismos genéticamente modificados, obtener biocombustibles que permitan una producción de energía más limpia y sostenible. En el sector farmacéutico se están utilizando, desde hace tiempo, cultivos de levaduras y bacte-

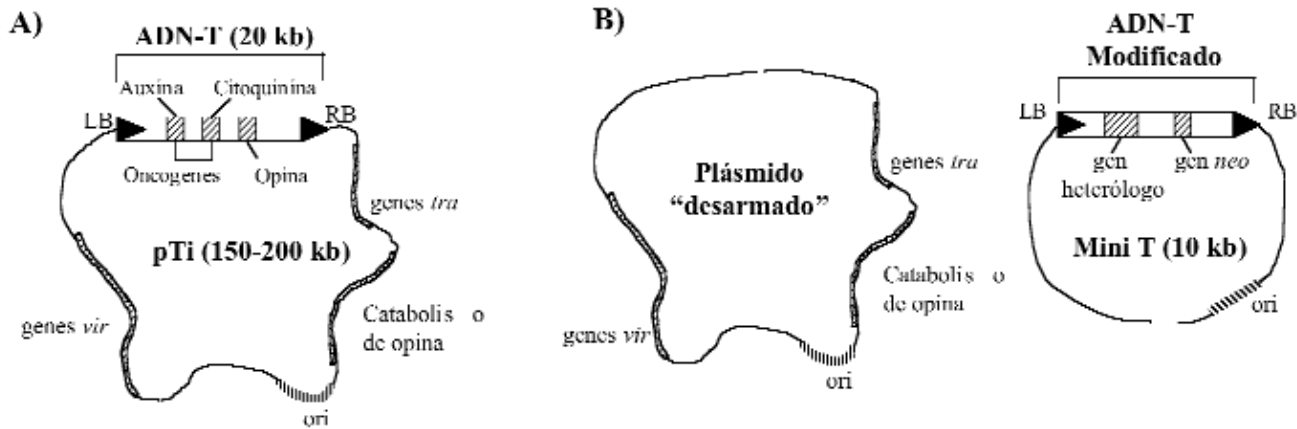


Fig. 1. A) Plásmido Ti natural B) Plásmidos usados en el sistema binario de transgénesis en plantas. LB: Extremo izquierdo "left border". RB: Extremo derecho "right border". ori: origen de replicación del plásmido. genes tra: genes de transferencia. genes vir: genes de virulencia.

rias genéticamente modificadas para la producción de gran cantidad de fármacos, como por ejemplo la producción de insulina y hormona de crecimiento humana en *E. coli* o la producción de vacuna recombinante, basada en la proteína de la cápside del virus de la hepatitis B, en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, la gran esperanza del futuro en este campo es convertir a los organismos superiores (plantas y animales) en fábricas productoras de fármacos, transformando las empresas farmacéuticas en granjas (de ahí el nombre de "Phrama" que se le ha dado).

Algunos logros ya se han conseguido en este sentido, con la obtención de plantas de tabaco en cuyas hojas se produce un anticuerpo monoclonal contra el agente de la caries dental (*Streptococcus mutans*); la obtención por científicos de *Plant Genetic Systems* de plantas transgénicas de colza que contiene el gen que codifica el neuropéptido leuencefalina (consiguen de 10-200 g/hc cultivada, a partir de la semilla de colza); la obtención por científicos holandeses de la compañía Mogen Internacional de plantas transgénicas que contienen el gen de la seroalbúmina humana y producen 0,2 g/kg patata, o la obtención de plantas que en sus hojas expresan la enzima humana glucocerebrosidasa (hGc), aconsejada para tratar la enfermedad cerebral de Goucher. En este punto hay que destacar la posible utilización de los alimentos vegetales como vehículos de vacunas (vacunas comestibles) que comentaremos al final de este texto.

Animales transgénicos

En este mismo campo, pero hablando del reino animal, se ha logrado obtener vacas, ovejas o cabras transgénicas que producen en la leche lactoferrina humana, factor IX antihemofílico humano, o activador tisular de plasminógeno humano respectivamente. De esta forma, una vez obtenido el animal transgénico adecuado (proceso hoy todavía

complicado y de baja eficiencia), la producción y obtención del fármaco será sencilla, barata y libre de los probables riesgos de infección asociados a los fármacos obtenidos por el método convencional a partir de materia prima animal (como la sangre humana en el caso del factor IX de coagulación humana).

Y aquí es donde ponían el objetivo los padres científicos de nuestra famosa oveja clónica "Dolly". El objetivo era una vez obtenido lo más difícil, conseguir una oveja transgénica buena productora del fármaco en la leche, poder clonarla y llenar así el establo de nuestro caserío de clones de la superproductora y crear un rebaño clónico superproductor. Ya tenemos nuestra unidad de producción de fármaco de forma cómoda y, sobre todo, lo más importante, muy barata: a precio del pienso y el mantenimiento del ganado ovino. Así apareció unos meses después de conseguir la primera oveja clónica a partir de núcleos de células somáticas diferenciadas, (la famosa oveja "Dolly" obtenida en febrero de 1997), la segunda famosa "Polly" (clónica y transgénica). Como vemos los intereses económicos hacen funcionar la ciencia y la tecnología a ritmos frenéticos en nuestros días.

Sin embargo, la utilización y comercialización de animales transgénicos para la alimentación, todavía hoy no se ha producido. Por una parte, la mayor complicación técnica del proceso y de organización biológica de los animales ha permitido, hasta la fecha, una muy baja eficiencia en el proceso, pero no debemos olvidar que, muy probablemente, los intentos con tal fin se hayan visto mermados debido a la alta polémica surgida, sobre todo en la sociedad europea, con la comercialización de plantas transgénicas y, por tanto, de alimentos vegetales transgénicos. Asimismo hay que señalar las repercusiones éticas y sociales que la modificación genética de animales entraña. Hasta dónde haya podido llegar el desarrollo de variedades de animales con

fines de alimentación humana o animal, es algo que no es fácil de conocer, pues en el desarrollo de esta tecnología hay mucha investigación que no se publica, al estar protegida por altos intereses económicos (mucho de esta investigación se lleva a cabo en empresas privadas). (Cada noticia sobre ello, en un sentido u otro, hace tambalearse el valor de las acciones de las compañías biotecnológicas, en un mercado de valores Nasdaq cada día más volátil).

De todas maneras es conocida la obtención por científicos de la Universidad de Pensilvania de cerdos transgénicos que portan múltiples copias del gen bovino que codifica la hormona del crecimiento. Estos animales ganan peso más rápido que un cerdo normal, obteniendo un rendimiento mayor de su alimentación y cumpliendo el objetivo que se buscaba al obtenerlos: mejora de crecimiento sin aumentar el consumo de pienso. Sorprendentemente (éste no era el objetivo buscado) presentan una característica de gran interés nutritivo, hay una disminución de la acumulación de grasa subcutánea en el dorso del animal. En otras palabras, son cerdos con un menor contenido en grasa animal y, por tanto, más adecuados para dietas bajas en colesterol. Pero, lamentablemente, estos cerdos transgénicos presentan graves problemas físicos. Al nacer tienen peso inferior y manifiestan poco apetito y letargia, y al llegar a adultos, padecen de artritis, de poca fertilidad y de una alta incidencia de úlceras. Todos estos trastornos pueden ser producidos por el exceso de hormonas en la sangre.

La situación es diferente en peces. Biotecnólogos de la Universidad de Maryland han descrito la creación de carpas transgénicas que portan múltiples copias del gen de la hormona de crecimiento de la trucha y son un 20% más grandes que las carpas normales. Estos animales no presentan ningún problema patológico asociado a la sobreproducción animal, y su carne posee las mismas características organolépticas que las carpas sin transformar. Recientemente científicos de la Universidad de Singapur, el servicio pesquero norteamericano y la compañía canadiense Fisheries and Ocean han obtenido resultados similares trabajando con salmones.

Como todavía hoy en día no se contempla la obtención de animales transgénicos con fines de alimentación, sino más bien para investigación básica (animales *knock-out*, modelos animales de enfermedades humanas), o para la empresa farmacéutica, no vamos a explicar en este texto, de forma específica, cómo se obtienen los animales transgénicos. Nos centraremos en ver cómo se preparan y para qué las levaduras y plantas transgénicas, que sí se están hoy día utilizando en el campo de la alimentación humana. Sólo decir que existen 4 formas básicas de obtener animales transgénicos:

a) Introducción del gen foráneo utilizando vectores derivados de retrovirus naturales que infecten "in vitro" las células del embrión en estado de mórula, y posterior implantación del embrión transfectado en una hembra biológicamente receptiva (nodriza). Como este método, debido al origen de los vectores usados (virus de células eucariotas), puede dar problemas, y como existen otros métodos alternativos, no se suele utilizar para obtener transgénicos con fines comerciales.

b) Microinyección del gen foráneo, en presentación lineal, en el pronúcleo masculino (núcleo del espermatozoide) de un huevo fertilizado y posterior implantación de los huevos transfectados en una hembra nodriza. (En los mamíferos después de que entra el espermatozoide al óvulo, en la fertilización, tanto el núcleo del óvulo como el del espermatozoide (pronúcleo masculino) permanecen separados. Sólo después de que el núcleo femenino ha completado la meiosis, y llega al estado de pronúcleo femenino, se produce la fusión de núcleos o cariogamia.

c) Introducción, por transfección, del gen foráneo en células troncales totipotentes del blastocisto (embrioblastos, blastómeros) en cultivo, posterior introducción de las células transfectadas en un blastocisto receptor y finalmente implantación en el útero de una hembra nodriza.

d) Introducción, por transfección con liposomas, del gen heterólogo en células fetales (p.ej. fibroblastos) y posterior transferencia del núcleo de las células transfectadas a oocitos desnucleados (oocitos sin núcleo). (La introducción de un núcleo al oocito desnucleado, es la técnica que se utilizó para obtener a "Dolly").

OBTENCIÓN Y APLICACIÓN DE LEVADURAS TRANSGÉNICAS EN ALIMENTACIÓN

Obtención de levaduras transgénicas

Para estudiar cómo se utiliza la ingeniería genética para obtener levaduras transgénicas, tomaremos el ejemplo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, por ser éste el organismo más estudiado entre las levaduras, y ser el que cuenta, actualmente, con más posibilidades para ser modificado.

Al trabajar con levaduras, tenemos la ventaja de que en su biología se ha encontrado la existencia de plásmidos naturales, los cuales nos servirán para construir vectores plasmídicos, que utilizaremos en los procesos de incorporación de nuevos genes en estos organismos (incorporando la nueva

Tabla I. Métodos para introducir ADN a células vegetales

MÉTODOS	COMENTARIOS
Transferencia mediante el plásmido Ti	Método excelente y de alta eficiencia que está indicado principalmente para plantas dicotiledóneas.
Biobalística (Bombardeo con microproyectiles)	Usado con un amplio rango de plantas y tejidos. Sencillo y barato, pero ineficiente en obtener integraciones estables.
Vectores víricos	Actualmente no es un método efectivo de introducir ADN en plantas
Transferencia directa del gen a protoplastos vegetales (Electroporación, Fusión con liposomas)	Sólo es posible usarlo con aquellas plantas que se puedan regenerar a partir de protoplastos.
Microinyección	Tiene una utilidad limitada ya que sólo se puede inyectar una célula en cada experimento. Requiere la intervención de personal altamente especializado.

actividad biológica a la cepa). Así, en el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, se ha aislado un plásmido natural circular de 6,3 kb de 2 μ m de circunferencia, que se conoce como el plásmido "círculo de 2 micrómetros" y que constituye la base para la construcción de distintos vectores de clonaje.

En primer lugar, se elige uno de esos vectores y en él se clona y prepara "in vitro", mediante el uso de enzimas que actúan sobre el ADN (enzimas de restricción, fosfatasas, polimerasas, ligasas, etc.), la construcción adecuada a introducir en la levadura. Esta construcción debe estar organizada para que el gen foráneo, que puede ser de organismos pertenecientes a otro reino biológico, se exprese en *Saccharomyces cerevisiae*, por tanto, habrá que rodear al gen del entorno genético adecuado (secuencias promotoras de levaduras, secuencias terminadoras de levaduras, secuencias activadoras de levaduras, etc.). A continuación se introduce el vector, mediante transformación, al interior de la levadura. El proceso de transformación se lleva a cabo al incubar las levaduras en presencia del vector, en un medio líquido que lleve sales de litio, tratamiento posterior con una solución de PEG 4000 (polietileno-glicol), que favorece la penetración del ADN, y un choque térmico para facilitar la entrada.

Como el proceso de transformación tiene una baja eficiencia, habrá que seleccionar aquellas levaduras que hayan tomado el vector. Para ello se utiliza un gen marcador presente en el mismo, que permitirá que sólo se reproduzcan en un medio selectivo de incubación (p.ej. medio sin leucina), aquellas levaduras que incorporaron el vector. Así, por ejemplo, cuando el gen marcador es el gen LEU 2 (codifica la enzima β -isopropilmalato deshidrogenasa que actúa en la ruta metabólica de síntesis de leucina) y la cepa utilizada es una cepa LEU 2⁻ (auxotrofa para leucina), aquellas

levaduras que crezcan en un medio sin leucina indicará que han revertido su auxotrofia, gracias a la presencia del gen LEU 2 salvaje en su interior (presente en el vector). Se dice que una cepa es auxotrofa para una molécula cuando necesita ésta para vivir pero no es capaz de sintetizarla, por lo tanto es imprescindible que la molécula esté presente en el medio de crecimiento. En nuestro caso la cepa no puede sintetizar el aminoácido leucina por presentar una mutación en su gen LEU 2 y, por tanto, necesita que exista leucina en el medio de cultivo para crecer y reproducirse. De esta forma, el crecimiento en un medio sin leucina nos garantizará la presencia no sólo de alelo LEU 2 salvaje, sino también del gen que nos interesaba introducir, por estar ambos genes en la misma construcción genética (vector).

Según el tipo de vector utilizado en el proceso, el gen marcador y con él, el gen heterólogo a introducir, podrán llevar una vida autónoma, independiente del cromosoma de la levadura, o podrán insertarse en el cromosoma por un proceso de recombinación homóloga. Este proceso se produce a través de las secuencias homólogas del alelo LEU 2 salvaje, presente en el vector, y del alelo LEU 2 mutado, presente en el cromosoma de la levadura. De esta forma el gen foráneo, que permitirá a la levadura realizar la actividad biológica nueva que nos interesaba introducir en esta cepa, se podrá localizar extracromosómicamente o en el interior del cromosoma próximo a la localización del loci del gen LEU 2. En aquellos casos en que el vector de clonaje lleve el segmento de ADN del plásmido 2 μ m, que determina la replicación autónoma del mismo, el vector podrá subsistir extracromosómicamente, en caso contrario, se integrará en el cromosoma (vectores de integración).

Algunos vectores utilizados son quimeras mixtas, que llevan ADN de plásmidos bacterianos de *E. coli* y ADN de

plásmido 2 μm . Estos vectores, denominados vectores lanzadera (shuttle vectors”), podrán, por tanto, ser biológicamente viables y utilizados tanto en *E. coli* (organismo modelo y fácilmente utilizado en ingeniería genética) como en *Saccharomyces cerevisiae*. En este caso la preparación de la construcción genética (la ingeniería genética “fina”: clonaje del gen, colocación de promotor adecuado, terminador adecuado, secuencias de regulación, etc.) se realiza en *E. coli* y después se introduce el vector, una vez preparado, en la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* a transformar. Otros vectores pueden llevar en vez del origen de replicación del plásmido 2 μm , un fragmento de ADN que determine un origen de replicación cromosómico de *Saccharomyces cerevisiae* (ARS: *Autonomously replicating sequence*). Estos vectores no son eficientemente segregados entre las células hijas en el proceso de la mitosis, pudiéndose perder en algunos casos sino se mantiene el medio selectivo. La estabilización de estos vectores ARS se puede lograr por la adición de un centrómero o secuencia CEN (los centrómeros son secuencias de ADN del cromosoma que se necesitan para que se produzca una replicación estable y una segregación adecuada de los cromosomas en la mitosis y meiosis). Una variación de los vectores CEN es el cromosoma artificial de levaduras (YAC: *yeast artificial chromosome*), en el que tras linearizar el vector se le añaden las secuencias de ADN de los extremos de los cromosomas de la levadura (los telómeros de esos cromosomas). La presencia de estas secuencias en el extremo de los YAC permite que se repliquen igual que si fuesen cromosomas propios de la levadura.

Levaduras transgénicas y alimentación

A continuación veremos sólo algunos ejemplos de la posible utilización de levaduras transgénicas en alimentación. La fabricación de pan y cerveza se basa en el aprovechamiento industrial de la fermentación alcohólica llevada a cabo por la levadura *Sacharomyces cerevisiae* a partir de los azúcares produciendo etanol y carbónico. Así, en el caso de la cerveza o el vino, la levadura transforma los azúcares del mosto en alcohol, y en el pan produce el gas que hincha la masa primaria y produce la miga.

Mejora genética en la levadura panadera

Cepa más eficiente en la planificación. Para producir pan basta con añadir a la harina de trigo o centeno proteasas, amilasas, y la levadura panadera. La levadura se inocular en la harina y la fermenta, produciendo gas carbónico que da el aspecto esponjoso al pan. En realidad es un proceso

complejo, ya que en la harina hay varios azúcares, como la sacarosa, la glucosa, la fructosa, y sobre todo la maltosa, la cual proviene de la degradación del almidón presente en la harina. La levadura panadera consume primero la sacarosa y, después, la glucosa y la fructosa, para, finalmente, asimilar la maltosa. Lo idóneo sería que consumiera desde el principio la maltosa, ya que éste es el azúcar mayoritario. En realidad, cuanto más rápido consume una levadura panadera la maltosa antes se produce el pan.

Para consumir la maltosa la levadura precisa dos enzimas: una maltosa permeasa que toma la maltosa de la harina y la introduce dentro de la célula, y una maltasa que la escinde. Cuando la levadura tiene un azúcar más sencillo del que alimentarse, como, por ejemplo, la glucosa, la síntesis de estas dos enzimas está reprimida. A nivel molecular, esa represión se ejerce en los promotores de los genes que codifican estas dos enzimas. Cuando al principio de la fermentación panadera hay glucosa, los promotores de los genes que codifican la maltosa permeasa y la maltasa están bloqueados y, como resultado, no hay producción de estas enzimas. Cuando la glucosa se consume y bajan sus niveles, los promotores se desbloquean, se sintetizan las dos enzimas y comienza el consumo de maltosa. Los científicos de la compañía holandesa Gist-Brocades construyeron una levadura panadera que consume la maltosa desde el principio de la fermentación panaria. Para ello cambiaron los promotores de los genes que codifican la maltosa permeasa y la maltasa por otros promotores provenientes de genes que funcionaban con glucosa. Cambiaron las reglas del juego de la regulación y construyeron una levadura panadera transgénica capaz de consumir maltosa desde el inicio del proceso industrial. El resultado es un aumento de la capacidad fermentativa y de la producción de gas y, por lo tanto, una reducción del tiempo de fermentación. Esta levadura panadera recombinante, denominada levadura MAL, fue el primer fermento para alimentos que obtuvo el permiso de comercialización en Europa, concretamente en el Reino Unido.

Proceso de panificación sin problemas de alergia ocupacional. Antes indicábamos que durante el proceso de planificación, a la masa panadera se le añade la enzima amilasa con la intención de favorecer la liberación de maltosa. Evidentemente, es necesario hacerlo, porque la levadura panadera no produce esta enzima. Este aditivo se añade en forma de polvo que ataca las zonas húmedas de la piel y las mucosas de los profesionales del sector, produciendo irritaciones y procesos alérgicos. Es un problema de salud laboral frecuente, que puede dar lugar a bajas laborales permanentes. Recientemente, un grupo de biotecnólogos del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA)

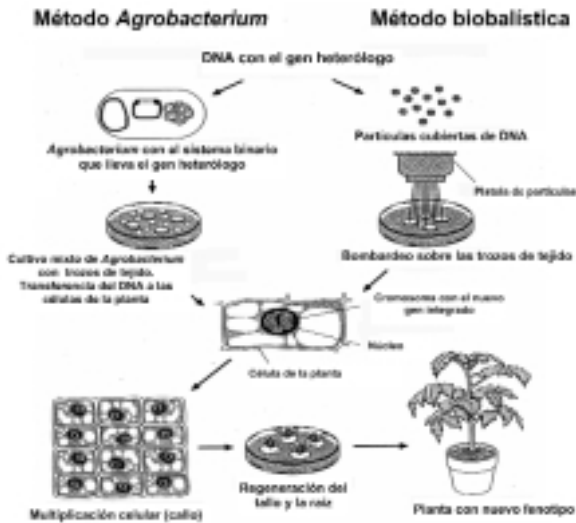


Fig. 2. Representación esquemática de los métodos más utilizados para obtener plantas transgénicas.

del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, en Valencia, ha construido una levadura panadera recombinante capaz de solventar este problema. Para ello han tomado un gen de *Aspergillus oryzae* que codifica una α -amilasa y lo han introducido en el genoma de una levadura panadera industrial. La nueva levadura es capaz de secretar directamente la enzima a la harina, produciendo un pan con excelentes características organolépticas. De esta forma, se obvia la adición del enzima y, con ello, los problemas de salud laboral.

Mejora genética en la levadura cervecera

La cerveza se produce por el crecimiento de la levadura sobre un mosto obtenido a partir de granos de cebada. Las compañías cerveceras se han distinguido por su grado de innovación. De hecho, y en comparación con otros procesos industriales de producción de alimentos fermentados, hacer cerveza es un proceso muy controlado desde el punto de vista tecnológico. Existen algunos aspectos oscuros que la nueva biotecnología de alimentos se está encargando de resolver.

Cepa que facilita la producción. El mosto de cerveza contiene unos polímeros lineales de glucosa denominados β -glucanos que provienen del grano de la cebada. Al final del proceso de fabricación se debe llevar a cabo una filtración industrial que, a menudo, se dificulta por problemas de colmatación producidos por los β -glucanos. Las pérdidas económicas que este proceso conlleva son numerosas. Se puede evitar añadiendo a los fermentadores una enzima denominada β -glucanasas que rompe estos polímeros. Esta enzima se obtiene a partir de hongos filamentosos y se comercializa en forma de preparados que

suelen contener impurezas y presentan una composición variable entre los distintos lotes. La adición exógena del enzima es, por lo tanto, una solución relativa. Para llegar a una solución final un equipo de científicos finlandeses del Instituto VTT en Espoo y un equipo de biotecnólogos del IATA en Valencia, utilizando genes de una β -glucanasa de *Trichoderma reesei* o *Trichoderma longibrachiatum* respectivamente, han diseñado levaduras cerveceras capaces de secretar la β -glucanasa al mosto, sin ninguna otra enzima contaminante. El resultado es perfecto: se produce una cerveza libre de β -glucanos y con las mismas características organolépticas que las fabricadas con la levadura cervecera convencional.

Producción de cerveza "light". Los responsables del alto contenido calórico de la cerveza son una gran cantidad de dextrinas y almidón que están presentes en el mosto original y no son asimilados por la levadura cervecera. Al no eliminarse durante la fermentación permanecen en la cerveza añadiendo a ésta una gran cantidad de calorías. La tendencia actual en la alimentación es el consumo de productos con bajo contenido calórico, por lo que a los industriales cerveceros les interesa producir cervezas de esta características. Para ello añaden a los tanques de fermentación una enzima denominada glucosamilasa, que rompe el almidón y las dextrinas, produciendo azúcares más sencillos, que son asimilados por la levadura cervecera. Como en el caso anterior, la adición de este enzima conlleva impurezas, variabilidad, posibles alergias ocupacionales y, por supuesto, inversión económica. Los biotecnólogos de la cervecera Bass, en el Reino Unido, han diseñado una levadura cervecera transgénica que porta un gen proveniente de la levadura *Saccharomyces diastaticus*, que codifica una glucoamilasa. Mediante su uso, se produce una cerveza indistinguible de la original, pero con bajo contenido calórico. De forma similar, y en el mismo país, los científicos de la compañía BRL International han añadido al genoma de una levadura cervecera un gen proveniente de un hongo filamentosos que codifica una glucoamilasa. En este último caso, ya se ha obtenido el permiso de comercialización por parte de la autoridades inglesas.

OBTENCIÓN Y APLICACIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Obtención de plantas transgénicas

Los métodos para producir plantas transgénicas están sustentados en la naturaleza totipotente de las células somáti-

cas vegetales y en el desarrollo de técnicas de regeneración de plantas a partir de cultivos de tejidos, células y protoplastos.

Cuando pequeños trozos de tejidos de plantas se colocan en medio sólido de cultivo estéril, las células proliferan formando un callo, si además en el medio se encuentran presentes, en proporciones adecuadas, las hormonas vegetales auxina y citoquinina, se desarrollará un brote. Éste se desarrolla a partir de células del callo que se dividen rápidamente. Asimismo, cuando a una célula vegetal se la aísla del tejido, se le puede inducir a que comience su división y a que todos sus genes se expresen en la correcta secuencia temporal para producir un organismo completo. Esta capacidad es a lo que se denomina totipotencia y es fundamental en los métodos desarrollados para producir plantas transgénicas. En ciertas ocasiones, para determinadas especies vegetales, será precisamente la falta de un método de regeneración de la planta entera a partir de una sola célula lo que limitará la posibilidad de obtener una planta transgénica.

Los métodos desarrollados para obtener una célula vegetal transformada se pueden dividir en 2 grupos principales:

a) *Métodos de transferencia de ADN mediante vectores.* Hablando de células vegetales, hasta la fecha, no se han podido obtener eficientes vectores víricos para transferirles genes. El único método a incluir en este grupo es el método que primero y más ampliamente se ha utilizado: método basado en el uso de vectores plasmídicos derivados del plásmido Ti (inductor de tumores "tumor induction") de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

b) *Métodos de transferencia directa de ADN.* Entre éstos encontramos la biobalística, la transformación de protoplastos por métodos químicos y/o eléctricos o fusión con liposomas, y la microinyección de ADN directamente a la célula.

Transferencia de ADN basado en vectores derivados del plásmido Ti

Biología del Plásmido Ti. La bacteria Gram-negativa del suelo *A. tumefaciens* es un fitopatógeno oportunista que puede infectar más de 330 géneros de plantas dicotiledóneas. Cuando esta bacteria infecta a través de una herida o incisión, generalmente en el tallo en un lugar próximo al suelo, tal infección distorsiona el proceso normal de reparación de la herida. Así, en vez de formar un callo que cubra la herida, las células de la zona proliferan hasta formar un tumor. Este tumor se origina como consecuencia de la transferencia de genes de la bacteria a la

planta. Estos genes, algunos de los cuales sintetizan enzimas para la biosíntesis de hormonas vegetales, quedarán establemente integrados en el cromosoma de la célula vegetal y, por tanto, heredadas por todas las células descendientes de ésta. Esta transferencia de genes "transforma" la célula de la planta (esta célula está transformada en sentido doble, por una parte, en el argot del biólogo molecular, se dice transformada por haber integrado un gen nuevo en su cromosoma y, por otra, está biológicamente transformada por haberse convertido en célula tumoral). Las células así transformadas sintetizan grandes cantidades de auxina y citoquinina, produciendo un crecimiento descontrolado que da lugar a la formación de una agalla (tumor de la corona).

Al igual que otras bacterias, *A. tumefaciens* lleva la mayor parte de sus genes en un cromosoma circular, pero algunas cepas tienen además cierta dotación genética en un plásmido, llamado plásmido Ti o plásmido inductor de tumores. La transferencia de ADN ocurre sólo después de que la bacteria se ha aproximado por quimiotaxis a la zona de la herida y se ha adherido a la superficie de la célula vegetal. Parece ser que en la zona de la herida la planta libera al medio unos compuestos fenólicos que activan ciertos genes bacterianos presentes en el plásmido Ti (genes vir), los cuales sintetizarán las enzimas necesarias para cortar un fragmento de ADN del plásmido Ti (T-ADN "ADN que se transfiere") que será transferido e integrado en el cromosoma de la célula vegetal. El T-ADN está flanqueado por 2 secuencias de ADN características: extremo derecho y extremo izquierdo, que son imprescindibles para que se produzca la transferencia del ADN que se encuentre comprendido entre ellas en el plásmido Ti, y están constituidas por 2 secuencias repetidas imperfectas de 25 pares de bases. En este T-ADN se encuentran tanto los genes productores del tumor (antes comentados), como unos genes responsables de la síntesis de opinas. Las opinas son unas moléculas particulares e inusuales que sintetizará, a partir de ahora, la célula vegetal transformada y sus descendientes, en el interior del tumor, para luego secretarlas. Se pueden utilizar como fuente de carbono y de nitrógeno por cualquier célula de *A. tumefaciens* que lleve los genes para el catabolismo de estas moléculas. Dichos genes suelen ir alojados en el plásmido Ti, fuera de la zona T-ADN. La mayor parte de los otros organismos presentes en el suelo que han sido estudiados hasta la fecha, no son capaces de utilizar las opinas como fuente de carbono. De esta forma *A. Tumefaciens* consigue, a través de transgénesis, y produciendo un tumor a la planta (grupo de células que ha perdido su función habitual

Tabla II. Caracteres interesantes modificados por ingeniería genética en las plantas de uso agrícola

Mejora en la lucha contra las plagas y malas hierbas

Resistencia a virus
 Resistencia a bacterias
 Resistencia a hongos
 Resistencia a nemátodos
 Resistencia a insectos
 Tolerancia a herbicidas

Mejora en propiedades Agronómicas

Mejora en la tolerancia al estrés hídrico
 Mejora en la tolerancia a la salinidad del terreno
 Tolerancia a bajas temperaturas

Mejora de las cualidades post-cosecha

Retraso en la maduración de frutos
 Retraso en la senescencia de flores
 Vegetales más dulces
 Tomates con tejidos más resistentes
 Patatas con mayor contenido en almidón

Mejora en la calidad nutritiva

Semillas con proteínas con un mayor contenido de lisina y metionina
 Forraje con proteínas con alto contenido en aminoácidos con azufre.

Mejoras con otras finalidades

Vacunas comestibles
 Alimentos "vitaminados"
 Alimentos "hipoalérgicos"

y que se reproducen de una forma desmedida y desregulada), convertir una zona de la planta en una fábrica de opinas, compuestos que sólo ella puede utilizar. Este es un fenómeno de transgénesis natural, similar a la transgénesis artificial que, como veremos más adelante, está basada precisamente en ella. Así, la bacteria acaba de convertir la planta en su fábrica de alimento, como el hombre la convierte en su fábrica de fármacos (anticuerpo monoclonal, albumina humana, etc.). Ya vemos que antes que nosotros, algún otro ser "menos evolucionado" había ideado la forma de poner a la planta a trabajar para él, mediante un mecanismo, a nuestro parecer, realmente sofisticado. Este es un ejemplo más de los muchos que uno puede encontrar estudiando la vida en el planeta, en los que se demuestra que hablando de biología es difícil "inventar" algo que funcione y no haya sido diseñado anteriormente por la evolución.

Transgénesis con vectores derivados del plásmido Ti. ¿De qué forma se puede utilizar el sistema natural, arriba descrito, para transferir a la planta un gen heterólogo de interés antropocéntrico?

Existen 2 sistemas de transferencia, uno de ellos es el sistema binario por estar compuesto por 2 plásmidos y el otro es el sistema de cointegrados. Aquí comentaremos el binario por ser el más utilizado actualmente. En el sistema binario, al ser el plásmido Ti muy grande y poco manejable, se divide en 2 plásmidos menores: uno de ellos al que le falta el T-ADN y lleva los genes *vir* (plásmido "desarmado"), siendo el otro el verdadero vector para clonar el gen foráneo, y que lleva los extremos del fragmento T-ADN (extremo derecho y extremo izquierdo), que son imprescindibles para que funcione el sistema y exista transferencia (plásmido Mini-T). Por tanto, el plásmido "desarmado" funcionará

como plásmido colaborador (*helper*), que aportará las proteínas de los genes *vir* necesarias para que exista la transferencia (complementación en *trans*). Para que el sistema funcione es imprescindible que ambos plásmidos se encuentren a la vez en el interior de una célula de *A. tumefaciens*.

a) La primera fase implica la manipulación molecular del ADN. Los genes presentes en el fragmento T-ADN, que son inductores del tumor (unos 7 genes), han sido retirados al construir el vector de clonaje derivado del plásmido Ti (plásmido Mini-T), y en su sitio se clonará el gen foráneo que se desee introducir (para ello se utilizan enzimas que actúan sobre el ADN: enzimas de restricción, polimerasas, ligasas, etc).

Entre las secuencias características de los extremos del T-ADN se colocará el gen heterólogo y un gen marcador, que se utilizará como método de selección de las células transformadas. Vamos a suponer que este gen sea un gen que confiere resistencia a antibióticos, por ser éste un sistema muy utilizado (p.ej. el gen *neo* que sintetiza la neomicina fosfotransferasa y confiere resistencia a la kanamicina). Ambos genes deberán contar con sus secuencias promotoras, terminadoras, activadoras, etc, adecuadas, propias de células vegetales, que es donde se pretende que se expresen estos genes. En la actualidad se intenta utilizar un gen marcador que suponga otra característica distinta a la resistencia a los antibióticos, con la finalidad de evitar la posible difusión de este tipo de genes a otros organismos vivos que se desarrollen en proximidad a la planta transgénica (bacterias y hongos del suelo, otras especies de plantas), o a las bacterias presentes en el intestino de organismos consumidores de dichas plantas. Hoy en día no se sabe si la probabilidad de que ocurra esta transferencia genética horizontal es lo suficientemente significativa como

para tener transcendencia en la genética evolutiva de otros organismos, implicando la difusión de los genes utilizados en este proceso (genes de resistencia antibióticos, genes de tolerancia a herbicidas, genes de resistencia a insectos, etc.) a otros seres vivos.

El plásmido Mini-T así preparado, se introducirá en la cepa adecuada de *A. tumefaciens*. que contenga en su interior el plásmido "desarmado" del sistema binario.

b) En la segunda fase, la bacteria *A. tumefaciens* con los dos plásmidos en su interior será cultivada en presencia de pequeños trozos de tejido de hojas o de raíz. La bacteria se aproximará por quimiotaxis a las células vegetales de los bordes de los trozos del tejido, y gracias a la expresión de los genes vir (genes de virulencia), presentes en el plásmido "desarmado", se llevará a cabo la transferencia del ADN comprendido entre los 2 extremos característicos presentes en el otro plásmido (plásmido Mini-T). La transferencia se produce en forma de cadena sencilla de la molécula de ADN inter-extremos, por acción de cortes en una sola hebra, en ambos extremos. Esta molécula de hebra sencilla de ADN se encuentra protegida de la degradación por proteínas (proteínas vir) que la transportan al interior de la célula vegetal, entrando hasta el núcleo de la misma. En algún momento de la transferencia el fragmento se transforma en cadena doble y así se integra, aparentemente al azar, en varios puntos del genoma vegetal. Allí permanecerá y será duplicado cada vez que el genoma se replique y la célula se divida. El plásmido Mini-T, que permanece en *A. tumefaciens*, mientras tanto, habrá reparado el sector de hebra sencilla que le dejó el T-ADN al ser transferido llevando el gen heterólogo y un gen *neo*.

No todos los genes que se insertan de esta forma en el cromosoma se expresan correctamente, se ha observado que en células vegetales existen mecanismos específicos de silenciamiento de genes por metilación (metilación de ADN dependiente de la dosis de ARN) que pueden evitar su expresión. Asimismo, si el gen se inserta en una zona inactiva del cromosoma, esta región inactiva próxima silenciará el gen, por tanto, si buscamos una buena expresión del gen es conveniente que éste se inserte en zonas activas del cromosoma.

A continuación los trozos de tejido se transfieren a un medio de cultivo con 2 antibióticos y con hormonas vegetales de crecimiento. Uno de los antibióticos matará la bacteria *A. tumefaciens*, que ya no la necesitamos, y el otro (p.ej. kanamicina) matará las células vegetales presentes en el tejido que no estén transformadas, al no haber integrado el gen marcador *neo* (ni el gen forágeno de nuestro interés). Las

hormonas permitirán el crecimiento de las células transformadas para dar lugar a la formación de pequeños callos.

c) En la tercera fase, algunos trozos del callo se pueden transferir a un medio que induce la formación de tallos (se consigue con altos niveles de citoquinina) y, a continuación, estos tallos se trasplantarán a un medio preparado hormonalmente para la formación de raíces.

Este método es el que más se ha utilizado y con el que más variedades distintas de plantas se han podido transformar, entre las cuales podemos señalar verduras (lechuga, espárrago, remolacha, rábano, pepino, zanahoria, brócoli), plantas con interés en floricultura (clavel, petunia, crisantemo), frutas (albaricoque, ciruela, cítricos, manzana, melocotón, kiwi, fresa, frambuesa, melón), legumbres (soja), cereales (arroz, maíz, trigo sarraceno) y especias (hinojo, mostaza, apio).

Transferencia directa de ADN

Como el método derivado del plásmido Ti funciona muy bien con plantas dicotiledóneas (legumbres), pero no así con monocotiledóneas -donde se encuentran plantas tan importantes para la alimentación humana y animal como los cereales (arroz, trigo, maíz, centeno)- se desarrollaron métodos alternativos. Así se han desarrollado varios métodos para poder introducir el ADN directamente al interior de la célula vegetal, atravesando la barrera de la pared y la membrana de la célula vegetal, sin la ayuda de vectores biológicos. Como estos métodos son esencialmente artificiales, no presentan restricciones biológicas que limiten su uso a determinadas especies vegetales (No ha sido hasta hace poco -año 96- que se ha conseguido obtener plantas transgénicas monocotiledóneas (arroz, maíz) con vectores Ti, lo que ha llevado a pensar que la incapacidad de lograrlo anteriormente, radicaba más en la dificultad de cultivar células de monocotiledóneas y, por tanto, de seleccionar células transformadas de monocotiledóneas, que en la incompatibilidad biológica del sistema).

Biobalística. Este método es, quizás, el más versátil para introducir el ADN a las células vegetales. En este método el ADN a transferir en forma lineal o más frecuentemente incorporado en un vector de clonaje (gen heterólogo + gen marcador de selección), se precipita sobre unas pequeñas partículas o microproyectiles de tungsteno u oro (1-4 μm de diámetro), de forma que las recubra totalmente. A continuación las partículas se disparan sobre el tejido vegetal, con una pistola de pólvora (inicialmente era así), gas comprimido (helio) o descarga eléctrica, a unas

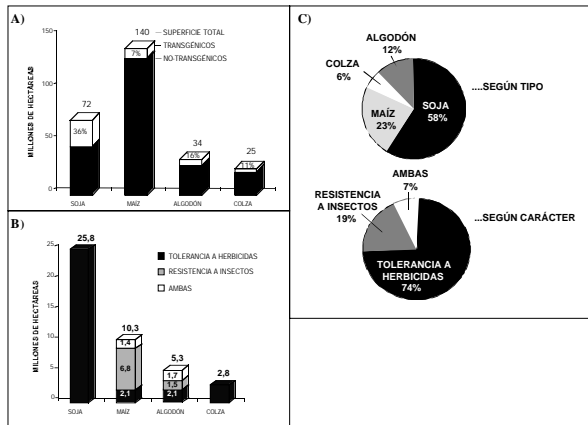


Fig. 3. A) Extensión cultivada de los cultivos transgénicos (TG) más comunes y porcentaje con respecto a la extensión total cultivada de cada especie vegetal. B) Extensión cultivada de cada tipo de transgenia en los cultivos transgénicos más comunes. C) Porcentaje de los principales cultivos transgénicos con respecto a la superficie total de plantas transgénicas cultivadas (Fuente: Clive James, ISAAA Briefs N° 21, Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2000. www.isaaa.org).

velocidades suficientes para penetrar en el interior de la célula atravesando la pared. El material sobre el que se dispara pueden ser protoplastos, tejidos del meristema vegetal (zona de crecimiento de la planta), embriones vegetales o tejidos diferenciados (como trozos de hojas). A continuación habrá que seleccionar la célula transformada en medio selectivo, aprovechando la característica del gen marcador introducido con el gen foráneo, y regenerar la planta entera al cultivar la célula en condiciones adecuadas.

De esta forma se ha podido obtener, no sólo inserción del gen en cromosomas del núcleo, sino también en el cromosoma circular presente en el cloroplasto y en la mitocondria. Con este método se han transformado distintas variedades de cereales y gimnospermas. Entre las plantas transformadas se pueden señalar el álamo, arándano, caña de azúcar, maíz, papaya, soja, tabaco y trigo.

Uso de protoplastos (electroporación, liposomas). Las células vegetales cuentan con una pared vegetal constituida por polímero de carbohidratos (celulosa y hemicelulosa) que rodean la membrana plasmática y que dificultan enormemente la entrada de ADN sin la colaboración de vectores biológicos (plásmidos o virus). Por tanto, para facilitar dicha entrada se preparan células vegetales a las que por tratamiento enzimático (celulasa y pectinasa) se las ha desprovisto de su pared, obteniéndose células vegetales solo con membrana plasmática, que se denominan protoplastos. Los protoplastos, una vez transformados, podrán reconstruir la pared y en condiciones adecuadas de cultivo regenerar una planta entera. La entrada del ADN al

interior del protoplasto se consigue colocando el protoplasto en presencia del ADN a introducir (gen heterólogo + gen marcador en forma lineal; vector Ti o vector bacteriano con gen heterólogo + gen marcador) en un medio con PEG o polivinil-alcohol o calcio y con un alto PH, estas condiciones favorecen la entrada del ADN. También la alta temperatura y descargas eléctricas (electroporación) favorecen considerablemente el proceso.

En ocasiones se logra introducir el ADN mediante la fusión de un protoplasto con un liposoma que lleva encapsulado en su interior el ADN heterólogo, al poner ambas entidades en un medio con PEG, compuesto que favorece la fusión (El liposoma es una vesícula artificial creada por una bicapa de fosfolípidos, similar a la membrana plasmática). Es un método poco usado y de baja eficiencia, pero con él se han conseguido transformar protoplastos de arroz, canola, cítricos, fresa, maíz, tabaco y soja.

En estos métodos, el estado en que se encuentren los protoplastos, tales como la fase de su ciclo celular, también parece tener importancia. Las condiciones óptimas son particulares de cada especie vegetal. La integración en el genoma de la planta parece suceder de forma aleatoria y debido a un mecanismo de recombinación ilegítima (no-homóloga).

Microinyección. En este método se microinyecta el ADN, mediante un capilar de vidrio, al interior de la célula. Si la microinyección es en el núcleo, la eficiencia de transformación es más alta que si se hace en el citoplasma (igual ocurre en células animales). Parece que la transferencia del ADN del citoplasma al núcleo supone una barrera en el proceso de transformación. En este caso el uso de un gen marcador para llevar a cabo la selección de la célula transformada, no es esencial. Este método sólo se puede utilizar con células para las cuales se tengan desarrolladas eficientes métodos de cultivo. Se han conseguido transformar células de canola y arroz.

Plantas transgénicas y alimentación

En el campo de la agricultura con fines de alimentación humana y/o animal, se han obtenido plantas transgénicas con distintos objetivos. Como sabemos, la productividad de cualquier cosecha, así como la calidad de la misma, está muy condicionada por una serie de organismos vivos que conviven y compiten con ella (malas hierbas), y otros que la parasitan (virus, bacterias, hongos, nemátodos, insectos) que en algunas ocasiones se convierten en verdaderas plagas. Para superar estos problemas, se han desarrollado plantas transgénicas que presen-

tan resistencia a dichos parásitos o que toleran ciertos herbicidas constituyendo estos 2 tipos de transgenia, en la actualidad, prácticamente el 99,9% de cultivos transgénicos comerciales (Fig. 3). Poniendo el punto de mira en las características de los frutos y semillas, se han obtenido desde plantas cuyos frutos maduran de forma controlada, hasta semillas con mayor calidad nutritiva (dietética). Finalmente, para ampliar la superficie de terrenos cultivables, se han obtenido plantas que soportan temperaturas más bajas y plantas que crecen en suelos áridos o salinos, superando de esta forma las rigurosidades climáticas y las condiciones edafológicas extremas de los suelos. Todas estas aplicaciones desarrolladas durante los últimos años, han llevado a concluir que los genéticos moleculares deben trabajar codo con codo con los biólogos vegetales que conocen y desarrollan las técnicas de cruzamiento y selección de híbridos, para poder obtener productos con transformaciones estables y comercialmente válidos. Por lo que se supone que estas nuevas tecnologías no van a desplazar, al menos de momento, a las técnicas convencionales, sino más bien a colaborar con ellas.

Las estrategias biológicas utilizadas para lograr los fenotipos adecuados con el uso de esta tecnología son principalmente 3. La primera, que es la más directa, se basaría en el uso de la actividad de la proteína codificada por el gen introducido para lograr el fenotipo buscado. La segunda hace uso del fenómeno de silenciamiento de genes por co-supresión, fenómeno que se da en ciertas ocasiones cuando existen varias copias de un mismo gen en el genoma del organismo. De esta forma se puede lograr la reducción de la síntesis de una proteína en la planta, al introducir a la misma algún gen homólogo al gen que la codifica. Una tercera vía es la llamada ARN "anti-sentido" (antisense RNA), en esta estrategia también se busca la reducción de la síntesis de una determinada proteína y, por tanto, la reducción de la actividad que ésta lleva a cabo. El efecto se logra al introducir en la planta el gen que codifica la proteína cuya síntesis se quiere inhibir pero de forma que se exprese en orientación invertida (en sentido contrario) a la normal. De esta forma, la transcripción del gen introducido origina un ARN mensajero que es complementario al ARN mensajero del gen diana. Ambos ARN mensajeros, al encontrarse en el mismo citoplasma, hibridan, con lo cual el ARN mensajero que codifica la proteína cuya síntesis se quiere inhibir queda capturado en este híbrido, y no puede ser traducido, bajando la síntesis de dicha proteína.

Antes de ver algunos ejemplos de plantas transgénicas,

hay que recordar que siempre que se vaya a transferir un gen para obtener un organismo transgénico, habrá que rodearlo de las secuencias adecuadas (promotores, terminadores, activadores, etc.) reconocidas por el organismo donde se pretenda expresar. Por eso, en el apartado siguiente, se sobreentiende que los genes obtenidos en otros reinos diferentes al de las plantas, se introducen en ellas con las construcciones adecuadas: se retiran sus promotores y terminadores y se ponen estos mismos elementos pero de reconocimiento en plantas. Estos elementos podrán ser obtenidos del genoma de las propias plantas o, muy a menudo, del genoma de virus de plantas, por ser éstos elementos de fuerte actividad, como es el caso del muy utilizado promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

A veces esta tecnología sirve para transferir un gen, y con él el fenotipo que éste suponga, de una variedad salvaje de una especie vegetal, a otra variedad de esa misma especie vegetal, que se haya seleccionado por sus buenas características de crecimiento y productividad, pero que no presente dicho fenotipo. Este gen puede significar un carácter monogénico interesante como resistencia a insectos, tolerancia a la sequía, etc. Esto se hace en mejora clásica mediante cruzamientos, con lo cual puede llevar muchos años conseguirlo, mediante transgénesis se logra en un período de tiempo mucho más breve.

Plantas con resistencia a plagas

Plantas resistentes a microorganismos. Los virus, bacterias y hongos son microorganismos que afectan gravemente la productividad de los cultivos agrícolas. Se han conseguido plantas transgénicas que muestran menos síntomas patológicos por acción de los virus, introduciendo, en el genoma de la planta, genes del propio virus agresor o, en ocasiones, de virus filogenéticamente próximos (protección cruzada). Parece ser que la expresión de la proteína vírica, en unos casos, y la simple presencia de ARN vírico en otros, consigue los efectos comentados. Los mejores resultados se han conseguido introduciendo el gen de la proteína de cápside del virus, así se han logrado plantas tolerantes a virus, entre otras, de las siguientes especies: tabaco, tomate, alfalfa, patatas y arroz. La práctica de introducir regiones del genoma de virus en el genoma de vegetales o animales, que se realiza, entre otras ocasiones: para lograr plantas resistentes a virus, en la utilización de promotores víricos de expresión fuerte (p.ej. promotor 35S CaMV), o en uso de vectores víricos para la transformación de células eucariotas, está siendo criticada, debido a la posible aparición de nuevos patógenos, generados por

procesos de recombinación entre provirus o virus inactivos presentes en el genoma de los organismos eucariotas que se van a modificar y las nuevas regiones víricas introducidas en sus células.

Muchas bacterias fitopatógenas producen toxinas que inhiben rutas del metabolismo primario de la planta causando la muerte celular y produciendo graves pérdidas en importantes cosechas. Se han obtenido plantas transgénicas que expresan unas proteínas de la familia de las defensinas o similares (cercopina B, sarcotoxina, etc.) que se han mostrado resistentes a infecciones por bacterias. Los genes que codifican estas proteínas, de pequeño tamaño, se encuentran en la naturaleza en el genoma tanto de insectos como de animales o vegetales.

En contraste con la situación de los virus, los hongos sí se pueden eliminar con productos químicos, pero esta estrategia puede ocasionar problemas ecológicos. Para proteger a las plantas del ataque de estos organismos la biotecnología potencia los mecanismos de defensa naturales. Así ocurre con la manipulación de la producción de las proteínas denominadas de respuesta a patógenos (proteínas PR: se activa su expresión por el ataque de microorganismos), capaces de afectar al organismo invasor o de activar rutas de transducción de señales responsables de iniciar mecanismos generales de defensa. Se ha logrado obtener plantas resistentes a hongos introduciendo genes de quitinasas y/o glucanasas -enzimas que degradan la pared de la célula del hongo- así como de otras toxinas vegetales (tioquinas y osmotinas), todas ellas proteínas PR procedentes de células de otras plantas o también de bacterias.

Plantas resistentes a insectos. Las plantas pueden verse sometidas a plagas de insectos cuyas larvas son devastadoramente voraces. Todas las plantas presentan mecanismos de defensa, más o menos eficaces, contra los insectos por medio de compuestos propios de su metabolismo secundario.

Las dos estrategias más usadas para proteger a las plantas del ataque de insectos son: utilizar genes de bacterias que codifican toxinas para los insectos o utilizar genes de plantas que codifican inhibidores proteicos de enzimas digestivas de los insectos (proteasas y amilasas). Hoy en día se conocen más de 40 genes de plantas o bacterias que producen toxinas para insectos y algunos de ellos se han introducido en el genoma de plantas cultivadas de interés económico.

Como ejemplo de la primera estrategia vamos a señalar el uso de una toxina de la bacteria aerobia y esporulado-

ra *Bacillus thuringiensis*. Hay docenas de cepas diferentes de dicha bacteria que afectan a grupos de insectos distintos. Todas ellas comparten la característica de que sus esporas contienen cristales de una proteína tóxica para insectos, la proteína parasporal o δ -endotoxina. La ventaja, para nuestros intereses, de estas toxinas de *Bacillus thuringiensis* es que no son tóxicas para mamíferos ni pájaros. Algunas de ellas son bastante específicas y se ha utilizado esta característica para clasificarlas, así la toxina Cry I es específica de lepidópteros, Cry III de coleópteros y Cry IV de dípteros. En todos los casos la toxina cristalina es modificada en el intestino medio de la larva del insecto y de esta forma se transforma en tóxica. Esta proteína, así modificada, se une a las células del epitelio del intestino causando la lisis de dicha células, y destruyendo el epitelio intestinal.

Estas toxinas ya se utilizaban como bio-insecticidas, bien utilizando las esporas enteras o purificando la toxina a partir de ellas. Sin embargo, de esta forma, la acción de la toxina estaba limitada sólo a las superficies de las plantas y no al interior de los tejidos, que muchas ocasiones son atacados por los endoparásitos. Además las condiciones climatológicas limitaban mucho su efecto: podía ser lavada, por efecto de la lluvia, retirándola del lugar de uso o podía ser degradada rápidamente. Esto llevó, en el año 1987, a 3 compañías simultáneamente (Monsanto, Agracetus y Plant Genetic System) a crear plantas transgénicas (tomate, tabaco) que expresaban la pro-toxina o la toxina y eran resistentes a larvas de lepidópteros. Con esta estrategia se han obtenido distintas plantas transgénicas resistentes a insectos, entre ellas: algodón, maíz, arroz, patatas, soja, brócoli y canola. La estrategia resultó tan atractiva que para el año 1992 ya había un buen número de compañías trabajando en el tema, entre ellas: Abbot, Agracetus, Agrigenetics, Boehringer-Mannheim, Ciba-Geigy, DuPont, Ecogen, ICI, Mitsubishi, Monsanto, Mycogen, Plant Genetic System, Sandoz (Ciba-Geigy y Sandoz se fusionaron constituyendo Novartis). Las plantas con este tipo de resistencia se denominan con la terminación BT de *Bacillus thuringiensis*, así maíz-BT, algodón-BT, etc. En España el único cultivo transgénico sembrado con fines comerciales es un maíz-BT. Hay otros cultivos transgénicos sembrados, pero no con fines comerciales, sino con fines de investigación o como pruebas de campo para su posible explotación comercial.

La expresión potente y generalizada (en todos los tejidos de la planta) de este tipo de toxinas, puede provocar la aparición de procesos y mecanismos de protección de los insectos hacia la toxina. Así se conocen insectos que se han

hecho resistentes a algunas de la toxinas, siendo éste un problema a la hora de utilizar dichos compuestos como insecticidas. Es por ello que actualmente se están buscando promotores específicos de tejido, para conseguir una expresión localizada, sólo en aquellos tejidos que sean susceptibles de infección. Se está probando con promotores de floema (donde succionan los áfidos), promotores que se activan por aparición de heridas o promotores propios del polen.

En cuanto al uso de inhibidores de proteasas y α -amilasas, para obtener plantas transgénicas con resistencia a insectos, se han utilizado los genes del inhibidor de tripsina obtenida del guisante (CpTI), de los inhibidores I y II de proteasas obtenidos del tomate y del inhibidor I de proteasas de la patata, obteniéndose plantas de tabaco y arroz resistentes a sus plagas. Asimismo se ha usado el gen del inhibidor de α -amilasa de semillas de alubia (α AI), que inhibe la actividad α -amilasa de insectos y otros animales pero no la de las plantas, para obtener guisantes resistentes a insectos a los cuales eran sensibles.

Plantas tolerantes a herbicidas

Aproximadamente un 10% de la producción agrícola global anual se pierde como consecuencia del crecimiento de malas hierbas en los cultivos, a pesar del enorme gasto (10 mil millones \$) que se realiza en los más de 100 herbicidas químicos que se utilizan. Pero, además del gasto, los herbicidas presentan otras limitaciones: muchos no discriminan las malas hierbas de la cosecha y otros hay que aplicarlos antes de que las malas hierbas aparezcan y mantienen su efecto durante largo tiempo. La obtención de plantas cultivadas tolerantes a herbicidas puede permitirnos superar algunos de estos problemas.

Hay varias maneras de manipular biológicamente a las plantas para convertirlas en tolerantes a herbicidas: a) inhibir la toma del herbicida, b) que la planta superproduzca la proteína diana del herbicida (generalmente una enzima) para que, aun en presencia del mismo, haya moléculas de la proteína diana no afectadas por el herbicida y, por tanto, disponibles para llevar a cabo su acción, c) reducir la afinidad de la proteína diana por el herbicida, d) obtener plantas que degraden el herbicida. Las 3 últimas estrategias han sido utilizadas en transgénesis.

Se han obtenido plantas transgénicas tolerantes al herbicida glifosato utilizando la tercera estrategia. Se eligió el glifosato por ser un herbicida que presenta características adecuadas: amplio espectro de actuación (elimina 76 de las 78 peores malas hierbas conocidas); es degradado por microorganismos del suelo rápidamente, dando lugar a pro-

ductos no tóxicos y además presenta una baja toxicidad para el hombre y su ganadería. Sin embargo, es precisamente su amplio espectro de actuación y, por tanto, su efecto negativo sobre la biodiversidad, lo que está siendo criticado desde algunos sectores. Asimismo, en algunos círculos de investigadores se cuestiona su inocuidad y su carácter no tóxico. El glifosato es un inhibidor de la enzima 5-enolpiruvilsikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) que actúa en la síntesis de aminoácidos aromáticos, tanto en plantas como en bacterias. Se han utilizado alelos del gen que codifican la enzima EPSPS de cepas de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* que resisten al glifosato, para introducirlos en plantas de tabaco, petunia, algodón, patata, tomate, maíz y soja, y obtener plantas tolerantes al herbicida. El glifosato es el conocido herbicida Roundup® comercializado por Monsanto.

En cuanto a la estrategia de destoxificación, tenemos un ejemplo muy común, el del herbicida fosfotricina, que es el comercializado con el nombre de Basta® por Hoescht AG (actual Aventis). Este herbicida, que también es de amplio espectro, actúa inhibiendo la enzima glutamina sintetasa necesaria para la síntesis de aminoácidos y asimilación de nitrógeno en las plantas. La inhibición de dicha enzima conlleva una acumulación de amonio en el interior de la planta, como el amonio es tóxico por encima de ciertos niveles, la planta termina muriendo. Algunas especies de *Streptomyces* llevan un gen, denominado *bar*, que codifica una enzima la cual inactiva la fosfotricina por acetilación. Varios grupos han utilizado el gen *bar* para conseguir, mediante transgénesis, por *Agrobacterim* o por bombardeo de genes, plantas de tabaco, tomate, patata, alfalfa, trigo y arroz, tolerantes al herbicida.

Modificación de las características de frutos y semillas

Maduración controlada de los frutos. Como otros procesos de desarrollo de las plantas, la senescencia está controlada por hormonas. El proceso de maduración de un fruto, como el tomate, se inicia con la producción por sus células de un gas denominado etileno. En los vegetales el etileno es una hormona que produce una serie de respuestas como la síntesis de poligolacturonidasas, la producción de pigmentos rojos o el desarrollo de aromas específicos. La poligolacturonidasa degrada las paredes de las células vegetales produciendo el ablandamiento del tomate. Científicos de Calgene en Davis, California, suprimieron en un 90% la expresión de esta enzima, mediante la estrategia ARN antisentido, obteniendo tomates que se pueden dejar en la planta más tiempo que un tomate normal sin que se ablanden en exceso. Su aspecto es idéntico al de los tomates normales pero, al no

sufrir el ablandamiento, es más resistente a los daños mecánicos producidos durante la recogida en el campo, o en el proceso de embalaje y transporte. A este tomate se le denomina FlavrSavr™, aunque su marca comercial es Mc Gregor, y fue el primer alimento transgénico que obtuvo el permiso de comercialización.

Hay varios tipos de tomates transgénicos en los que se ha reducido la producción de etileno, retardando su proceso de maduración. Los dos últimos pasos de la síntesis de etileno implican la síntesis de ACC (ácido carboxílico 1-aminociclopropano) por la enzima ACC-sintasa y posteriormente su conversión en etileno por acción de ACC-oxidasa. Científicos de la Universidad de Nottingham, en el Reino Unido, y de la Universidad de Berkeley, en California, han conseguido reducir la expresión de ambas enzimas mediante la estrategia de ARN antisentido, logrando una drástica reducción en la producción de etileno acompañada de un retraso en la maduración (de 1 semana a 4 semanas). Biotecnólogos franceses han obtenido melones con una copia antisentido del gen de la ACC sintasa, logrando melones de maduración lenta. Científicos de la empresa Monsanto han conseguido reducir la síntesis de etileno y retraso en la maduración, al introducir en el tomate un gen bacteriano que codifica una enzima que degrada la molécula de ACC, el precursor del etileno. Con estas estrategias se pueden dejar los frutos en la planta más tiempo y se pueden recoger cuando están empezando a tomar el color rojo, de esta forma se pueden transportar y llevar a las verdulerías una semana antes de que se empiecen a ablandar y ponerse rojos. Esto evita el tener que recoger los tomates verdes y tener que tratarlos con etileno para que maduren. Además no necesitan refrigeración en el transporte, ya que el proceso de maduración acontecerá lentamente durante el transporte.

Modificación en la calidad de los alimentos. En los últimos años se han obtenido plantas transgénicas en las que se ha modificado la composición bioquímica de sus frutos o semillas. Se han conseguido modificar, tanto la composición de los ácidos grasos de sus triglicéridos y fosfolípidos, como las características y cantidad de su almidón o sus proteínas.

Modificación de las proteínas. La producción de plantas transgénicas cuyas semillas presenten proteínas de alto valor nutritivo es un objetivo importante en alimentación. El incremento en la proporción de ciertos aminoácidos como la lisina (Lys), la tirosina (Try), la metionina (Met) y la cisteína (Cys) en la composición de las proteínas ingeridas, será beneficioso no sólo para el hombre sino también para animales monogástricos (cerdos, pollos). Los

cereales suelen ser pobres en Lys y Tyr, y las semillas de legumbres pobres en aminoácidos que contengan azufre como la Met y la Cys.

En el hombre, el enriquecimiento de las proteínas en ciertos aminoácidos puede ser especialmente beneficioso para vegetarianos, en riesgo de presentar una dieta pobre en aminoácidos esenciales. También se puede beneficiar la industria de alimentación animal, al no tener que añadir aminoácidos esenciales exógenos para suplementar la dieta del ganado. Tampoco hay que olvidar que la alimentación animal influye en la calidad y cantidad de los productos obtenidos a partir de ellos, así se ha descrito que las ovejas pueden incrementar su producción de lana con una alimentación rica en Met y Cys (hay que recordar que la lana es una proteína animal con alta proporción de aminoácidos con azufre).

Hay tres maneras fundamentales de modificar la calidad de las proteínas presentes en las semillas. Una es conseguir que la planta exprese una proteína nueva en la semilla que sea rica en los aminoácidos de interés (Lys, Tyr, Met, Cys). Otra sería introducir, por sustitución o adición, los aminoácidos de interés en la composición de una proteína que ya existe en la semilla, sin que varíe la biología de la misma. La última posibilidad es incrementar los niveles del aminoácido de interés en estado libre, esperando que conlleve un incremento en la síntesis de las proteínas que contengan ese aminoácido.

La primera estrategia se ha llevado a cabo transfiriendo a plantas de tabaco, soja, canola y alubias el gen de la albúmina 2S de la nuez del Brasil (proteína con alto contenido en Met). Esta proteína es un alérgeno mayor de la nuez del Brasil y al ser expresada en soja se comprobó que mantenía su carácter alérgico. Por tanto su transgénesis en semillas con interés agrícola quedará destinada a la alimentación animal. En el caso que se exprese en semillas para uso en alimentación humana, es de esperar que sea advertido en la etiqueta de presentación del alimento.

La segunda estrategia se ha realizado introduciendo los aminoácidos de interés en zonas hipervariables de una proteína presente en la semilla. Al producirse estas sustituciones de aminoácidos en una zona hipervariable de la proteína, generalmente la proteína no suele modificar su biología ni su localización celular.

Con objetivos puestos en la industria textil, científicos australianos han obtenido variedades de alfalfa y trébol que expresan la albúmina 2S de semillas de girasol (rica en Met). De esta forma aumentan la presencia de aminoácidos ricos en azufre en la dieta de las ovejas para aumentar la productividad de lana de las mismas.

Alimentos con valor añadido

Vacunas comestibles. Las vacunas han hecho milagros en la lucha contra las enfermedades infecciosas. La última generación de vacunas comerciales suelen consistir en preparaciones, compuestas y fundamentalmente, por proteínas antigénicas separadas de los genes del agente infeccioso. Pero estas vacunas son caras (en parte porque se producen en cultivos de bacterias o células animales), hay que purificarlas y deben conservarse refrigeradas. Una posibilidad para evitar estos problemas sería expresar estas proteínas en alimentos que nos sirviesen a modo de vacunas comestibles. Científicos de la Universidad de Loma Linda, en California, han conseguido obtener plantas de tomate y patatas que sintetizan proteínas del virus de Norwalk, de *E. coli* enterotóxica, de *V. cholerae* (organismos todos ellos implicados en diarreas, dando cuenta de unos 3 millones de muertes de niños, sobre todo en países en vías de desarrollo). En 1997 los voluntarios que ingirieron trozos de patatas crudas peladas, que contenían la subunidad B de enterotoxina de *E. coli*, presentaron respuestas inmunitarias sistémicas y en la mucosa. Se ha observado reactividad inmunitaria en 19 de 20 personas que comieron patata con vacuna contra el virus de Norwalk; y 2 de 3 voluntarios que ingirieron lechuga transgénica con un antígeno de hepatitis B presentaron respuesta sistémica.

Alimentos con vitaminas. "Arroz dorado". La deficiencia de vitamina A produce ceguera y trastornos inmunitarios, que contribuyen a la muerte de más de un millón de niños cada año, en países de Asia, África e Iberoamérica. El arroz constituye un medio óptimo para aportar la vitamina requerida. No hay que olvidar que esa gramínea alimenta a un tercio de la población mundial. Pero las variedades naturales carecen de vitamina A. Científicos suizos y alemanes acaban de producir un arroz, modificado genéticamente, que sintetiza beta-caroteno, un pigmento que el organismo convierte en vitamina A. Por la coloración que presenta se le ha denominado "arroz dorado". Se van a comenzar los estudios para introducir los beta-carotenos en especies de arroz populares en zonas deprimidas. Pero el arroz dorado no está todavía listo para su comercialización, quedan pendientes muchas pruebas, incluidos los análisis para comprobar si el organismo humano absorbe bien el β -caroteno de la planta. Se espera que las pruebas duren, por lo menos, hasta el año 2003. Hace unos meses, se informó de la creación de un tomate que contiene un gen capaz de triplicar la cantidad de β -caroteno habitual. Asimismo es de señalar un proyecto

internacional centrado en el incremento del contenido de vitaminas y minerales en el arroz y en otros cuatro vegetales: trigo, maíz, alubias y mandioca. A este tipo de alimentos se les ha llamado "alimentos", debido a su carácter mixto de alimento y medicamento.

Alimentos "hipoalergénicos". Un alérgeno mayor de la semilla de arroz es una albúmina de 16 kDa que pertenece a la familia de los inhibidores de la α -amilasas/tripsina. Científicos japoneses, mediante la estrategia del ARN antisentido, han conseguido producir un arroz que presenta una expresión muy baja de dicha proteína en sus granos, consiguiendo un arroz "hipoalérgico".

Para finalizar veamos algunas cifras que nos indican la rápida expansión que ha tenido esta tecnología en los últimos años. Las primeras pruebas de campo con cultivos transgénicos se realizaron con tabaco hacia 1986 en Francia y Estados Unidos. Desde entonces, se han modificado por ingeniería genética más de 70 especies de plantas; 56 de ellas han pasado ya a los ensayos en campo. Durante 1991 y 1992, en Holanda y Canadá se realizaron más de 10 pruebas de campo con cultivares transgénicos de patata, y existe información sobre cultivares transgénicos de tomate en México en 1986, tabaco en Cuba en 1990 y maíz en Argentina en 1991. El primer cultivo transgénico (tabaco resistente a virus) se comercializó en China a principios de 1993. En 1994, el tomate con retraso en la maduración FavrSavr™ fue el primer alimento transgénico en ser cultivado para destino en alimentación humana, se cultivó en EE.UU. En total, hasta 1997 se habían llevado a cabo en todo el mundo 3.647 pruebas de campo con cultivos transgénicos, principalmente de maíz (28%), canola (18%), patata (10%), tomate (9,5%), soja (7,5%) y algodón (2,5%). Todos ellos han pasado ya la fase de comercialización. Durante 1997 se sembraron ya cultivos transgénicos en más de 1,3 millones de hectáreas en los Estados Unidos, en tanto que el total mundial de área agrícola cubierta por plantas transgénicas superó los 15 millones de hectáreas, llegando a ser más de 44 millones de hectáreas en el año 2000, comparable a la superficie de la España peninsular. Cuatro países se reparten el 94% de la producción mundial de transgénicos: EE.UU. 68%, Argentina 23%, Canadá 7% y China 1%. En el año 2000 los cultivos de soja, maíz, algodón y colza representaron la mayor parte de la superficie total de cultivos transgénicos. Las características introducidas por transgénesis en estos cultivos fueron la resistencia a insectos (plantas-BT) y/o la tolerancia a herbicidas (glifosato o fosfinotricina). Desde 1998 se

está plantando en Europa (España, Francia y Alemania) maíz transgénico BT. En España, el número de ensayos de campo de cultivos transgénicos en 1993 fue de 3, llegando a 144 en 1998. Las comunidades autónomas que más cultivos experimentales realizaron entre 1993-1999 fueron Andalucía (155), Castilla y León (78), Cataluña (48), Castilla-la Mancha (42) y Aragón (42).

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Gen. En genética clásica: unidad física y funcional fundamentalmente de la herencia biológica. En biología molecular se suele utilizar para denominar a una secuencia de ADN compuesta de una región que se transcribirá y unas secuencias reguladoras que harán posible su transcripción (secuencia promotora y terminadora). La transcripción puede dar origen, según el tipo de genes a un ADN mensajero (ARNm), a un ARN transparente (ARNt), o a un ARN ribosómico (ARNr).

Plásmido. Molécula circular extracromosómica de DNA que se suele encontrar de forma natural en bacterias o levaduras, necesita la organización biológica del organismo en el que se encuentra para replicarse y perpetuarse, y su replicación se realiza de forma independiente a la del cromosoma del hospedador. En general los plásmidos llevan en su secuencia genes cuya expresión modifica el fenotipo del organismo hospedador, aportándole alguna ventaja evolutiva en el medio en que dicho organismo se multiplica (resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados, etc.). Algunos plásmidos o partes de ellos se suelen utilizar en ingeniería genética para obtener diferentes tipos de vectores, llamados, en este caso, vectores plasmídicos.

Vector: Construcción química formada por secuencias naturales y artificiales de ADN de distintos orígenes, que se puede perpetuar en el interior de una célula hospedadora (procariota o eucariota) y que se utiliza en ingeniería genética para manipular y manejar de forma cómoda un gen o fragmento de ADN. En general los vectores derivan de entidades genéticas naturales como plásmidos o virus, denominándose vectores plasmídicos o víricos respectivamente. Existen vectores específicos para trabajar en los distintos tipos de seres vivos (bacterias, levaduras, células animales o vegetales). También existen vectores lanzadera ("shuttle vectors"), con los que se puede trabajar en varios organismos, independientemente del nivel de organización de los mismos (procariota o eucariota). Existen vectores específicos, diseñados para realizar distintos cometidos:

vectores para clonar (vectores de clonaje), vectores para expresar proteínas (vectores de expresión), vectores para secuenciar un fragmento de ADN, etc.

Clonar: Insertar un fragmento de ADN, habitualmente un gen, en un vector genético preparado a partir de plásmidos, fagos o virus, y perpetuarlo por replicación, al situarlo en un sistema biológico adecuado y capaz de reproducirse (bacteria o célula eucariota).

Transformación y transfección: Proceso de entrada de un fragmento de ADN foráneo en la célula, que en general supone un cambio en el fenotipo de la misma. Cuando esto ocurre se dice que la célula ha sido transformada o la célula está transformada. Cuando el proceso tiene lugar en una célula animal se suele llamar transfección, para diferenciarlo del significado que tiene la célula transformada en organismos animales (célula tumoral con crecimiento desregulado).

Promotor de un gen: Secuencia de ADN a la cual se une la ARN polimerasa haciendo que ésta inicie la transcripción en el punto adecuado. La RNA polimerasa es una enzima que sintetiza ARN, sea éste mensajero, transferente o ribosómico. La secuencia promotora se suele situar por delante del punto de inicio de la transcripción del gen (se dice en posición "upstream" o 5' del gen).

Terminador de un gen: Secuencia de ADN que provoca el final de la transcripción de un gen y se encuentra al final del mismo (se dice en posición "downstream" o 3' del gen). También se le conoce por terminador de la transcripción.

Los promotores y terminadores no son todos cualitativamente iguales. Hay promotores fuertes que son muy bien reconocidos, como tales, por la ARN polimerasa, por lo que provocarán una gran síntesis de ARN mensajero y, por tanto, si no existe otro mecanismo de regulación, alta producción de proteína. Los hay débiles cuya presencia, en general, ocasiona el efecto contrario, y los hay de carácter intermedio. Hay terminadores fuertes que son muy bien reconocidos, como tales, por el sistema biológico en el que se encuentran, de tal forma que cuando ellos están presentes, casi siempre que la RNA polimerasa llega hasta donde ellos están finaliza la transcripción. Los hay débiles, que muy a menudo, aunque estén presentes, no finaliza la transcripción cuando la RNA polimerasa llega hasta donde ellos están. Y los hay también de carácter intermedio.

Tanto los promotores como los terminadores están diseñados para ser reconocidos por los sistemas biológicos del organismo donde naturalmente se encuentran. En general, estos elementos reguladores de control reproducen su actividad biológica natural tanto más fidedignamente cuanto más parecido sea el entorno biológico donde se les sitúa

al de su entorno natural. De esta manera un promotor que en la naturaleza se encuentra controlando un gen en un procarionta, realizará muy mal su función (promover la transcripción del gen) si lo introducimos en un organismo eucariota o viceversa. Si se quiere expresar adecuadamente un gen procarionta (bacteriano) en una célula eucariota (levadura, animal o vegetal), deberá retirarse su promotor natural y colocar dicho gen bajo el control de un promotor y terminador cuyo entorno de actividad natural sea eucariota y viceversa. Esto supone que se puede hablar a "grosso modo" de promotores y terminadores procariontas, y promotores y terminadores eucariotas (los habrá de levaduras, de plantas y de animales. Los promotores y terminadores de los genes de los organismos parásito (virus eucariotas y bacterifagos o fagos -así llamados a los virus bacterianos) serán reconocidos por el sistema biológico del organismo parasitado, por ser éste su contexto natural de actuación. Por tanto, un promotor o un terminador de un virus eucariota será similar a un promotor y un terminador de un gen de su hospedador y asimismo ocurrirá para el caso de los fagos y las bacterias.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. Recombinant DNA. 2ª edición. 1992.
2. Chispeels MJ, Sadava DE. Plants, genes and agriculture. Jones and Bartlett Publisher 1994.
3. Glick BR, Pasternak JJ. Molecular Biotechnology. Principle and Application of Recombinant DNA. ASM Press 1994.
4. Ramón D. Los genes que comemos. Algar Editorial 1996.
5. Galun E, Beiman A. Transgenic plants. Imperial College Press 1997.
6. VVAA Coord., Durán A, Riechman J. Genes en el laboratorio y en la fábrica. Ed. Trotta 1998.
7. Grace ES. La biotecnología al desnudo. Ed. Anagrama 1998.
8. García Olmedo F. La tercera revolución verde. Ed. Debate 1998.
9. Rifkin J. El siglo de la biotecnología. Ed. Crítica/Marcambo 1999.
10. Izquierdo Rojo M. Ingeniería genética. Ed. Pirámide 2000.
11. Riechman J. Cultivos y alimentos transgénicos. Una gría crítica. Libras la catarata 2000.
12. Mae-Wan Ho. Ingeniería genética ¿Sueño o pesadilla? Ed Gedisa 2001.
13. Anderson L. Transgénicos. Ingeniería genética, alimentos y nuestro medio ambiente. GAIA Proyecto 2050-2001.
14. Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK. Identification of Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. The New England Journal of Medicine 1996 14; 334: 688-692.
15. Tada Y, Nakase M, Adachi T, Nakamura R, Shimada H, Takahashi M, Fujimura T, Matsuda T. Reduction of 14-16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene. FEBS Lett 1996; 12; 391: 341-345.
16. Mikkelsen TR, Hauser TP, Bagger Jorgensen R. La huida de los genes. Mundo Científico. Abril 1997.
17. Ronald PC. Creación de un arroz resistente a las enfermedades. Investigación y Ciencia. Enero 1998.
18. Miller RV. Intercambio de genes bacterianos en la naturaleza. Investigación y Ciencia. Marzo 1998.
19. Nieto-Jacobo M^ªF, Guevara-García A, Herrera-Estrella L. Plantas transgénicas. Investigación y Ciencia. Enero 1999.
20. Dossier OMG Organismos Modificados Genéticamente. Mundo Científico. Marzo 2000.
21. Langridge W.H.R. Vacunas comestibles. Investigación y Ciencia. Nov. 2000.
22. Domingo JL. Gómez M. Riesgos sobre la Salud de los alimentos modificados genéticamente: una revisión bibliográfica. revista Española de Salud Pública 2000;74.
23. Wolfenbarger LL, Phifer PR. The ecological risks and benefits of genetically engineered plants. Science 2000; 15; 290: 2088-2093.
24. Wal JM. OGM y alergias: ¿constatar o predecir? Mundo Científico. Marzo 2001.
25. Taylor SL, Hefle SL. Will genetically modified foods be allergenic? J Allergy Clin Immunol 2001; 107: 765-771.
26. Brown K. Plantas transgénicas y ecosistemas. Investigación y Ciencia. Junio 2001.
27. Hopkin K. Productos transgénicos e ingesta. Investigación y Ciencia. Junio 2001.

C. Bindslev-Jensen

Allergy Center
Odense University Hospital,
University of Southern
Denmark.

Assessment of allergenicity of genetically modified foods. The FAO/WHO 2001 decision tree

Introduction of foreign proteins into foods carry the risk of introducing new -and to the food allergic patient potential dangerous - allergenic proteins into the food in question¹. Already in 1996, a decision tree for assessing potential allergenicity was launched². This decision tree both focused on *in vitro* and *in vivo* assessment (skin Prick test followed by double-blind, placebo-controlled food-challenge (DBPCFC)) with the insert protein. Later that century possible unethi-

Assessment of the Allergenic Potential of Foods Derived From Genetically Modified Crop Plants

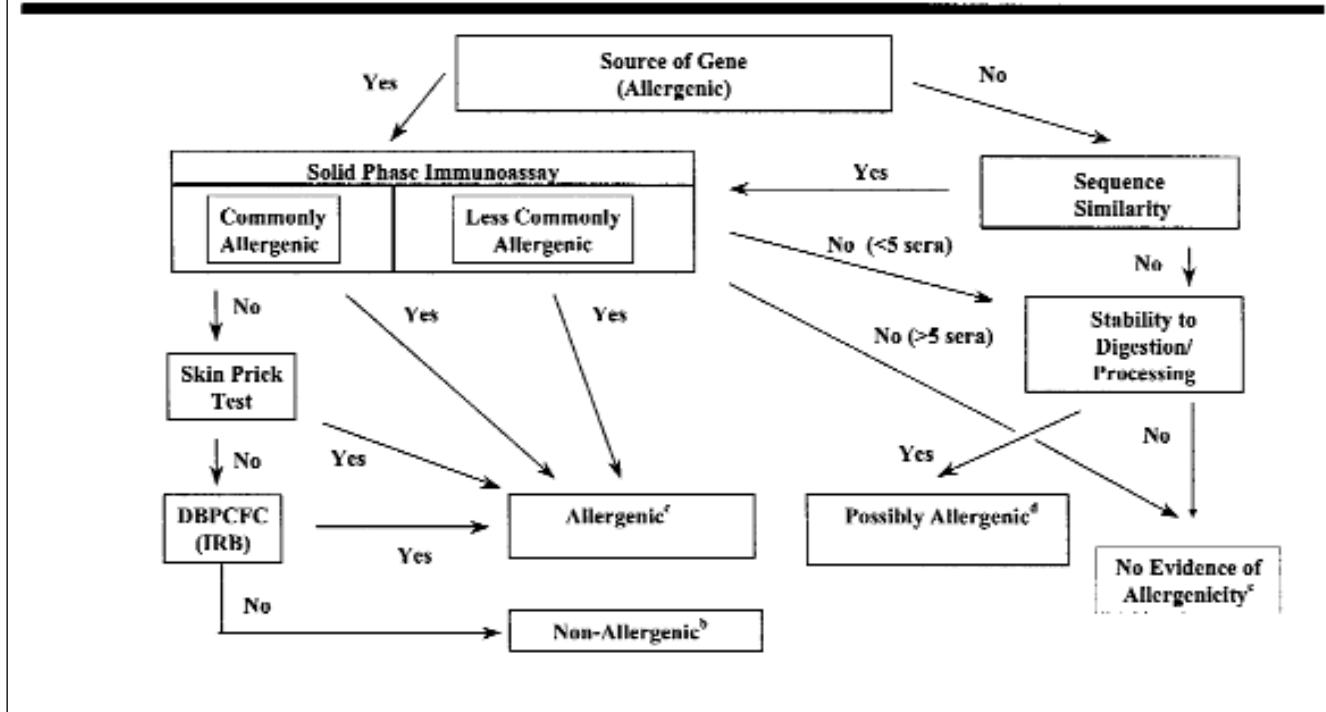


Fig. 1. The 2000 FAO/WHO decision tree.

cal aspects of assessing allergenicity of genetically modified organisms (GMO'S) became increasingly clear to the public and therefore new models for assessment were launched. The European Academy of Allergology and Clinical Immunology Task Force on Risk Assessment of Genetically modified foods were in the progress of developing such a new decision tree when the FAO/WHO decision tree was launched after a joint meeting in Rome, January this year.

The major differences between the original decision tree (modified during a joint FAO/WHO meeting in Rome in the year 2000, fig 1) and the newly developed tree (fig 2) are the following³.

The steps are equal whether or not the protein in question is commonly or less commonly allergenic.

Both proteins from foods known to be allergenic and from foods not known to be allergenic must be assessed for sequence similarity to known allergens. Stability to digestion must be assessed in a standardised manner. No *in vivo* assessment is required in the 2001 decision tree. Development of suitable animal models for risk assessment are encouraged in the 2001 model.

The steps in the 2001 FAO/WHO decision tree (relevant references are given in³):

SEQUENCE HOMOLOGY

The amino acid sequences of all allergens in the protein databases are obtained and thereafter a complete set of 80-amino acid length sequences derived from the expressed protein is prepared. This is followed by a comparison using the FASTA programme.

Cross reactivity is considered if more than 35% identity in the amino acid sequences is found or if identity of 6 contiguous amino acids is obtained.

The above criteria does not imply cross reactivity *per se*.

SPECIFIC SERUM SCREENING

Screening of IgE binding using sera from patients allergic to the source of the gene. Number of sera depends

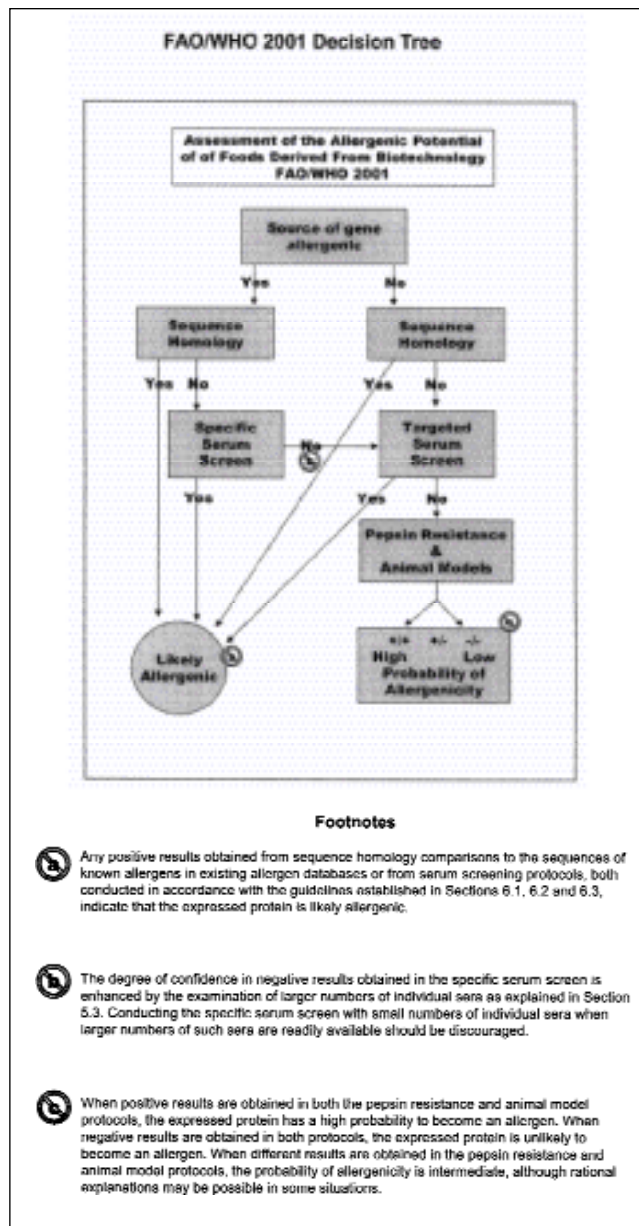


Fig. 2. The 2001 FAO/WHO decision tree.

on availability, the patients are diagnosed according to EAACI guidelines⁴. Specific serum screening is in all cases followed by targeted serum screening.

TARGETED SERUM SCREENING

Random serum screening is discouraged, instead a targeted approach is recommended, where the insert protein is assessed using sera with specific IgE to foods of similar nature and origin as the insert protein (monocot: grass, rice; Dicot: tree pollen, peanut; Mould: *Cladospo-*

rium, *Trichophyton*, *Invertebrae*: mites, shrimp; *Vertebrae*: milk, fish; *Bacteriae*: no known examples).

PEPSIN RESISTANCE

In contrast to previous approaches, a standardised assessment of pepsin stability is now recommended. Purified expressed protein should be subjected to pepsin degradation under Standard Operating Procedures and Good Laboratory Practice.

ANIMAL MODELS

Animal models are currently being developed, none are, however, at their present level of validation suitable for substitution. Therefore, at present animal models provide additional information on potential allergenicity of novel proteins, but they do not reflect all aspects of IgE-mediated food allergies in humans.

EVALUATION OF RESULTS OBTAINED DURING THE VARIOUS STEPS OF THE DECISION TREE

Any positive outcome in sequence homology testing, specific serum screening or targeted serum screening depicts possible allergenicity of the insert protein (absolute allergenicity), whereas the results obtained in the pepsin degradation model and in the animal models depicts the relative probability of allergenicity.

CONCLUSIONS

The newly developed FAO/WHO 2001 decision tree for assessment of allergenicity of genetically modified foods offers several advantages in comparison to the previous models. It is important to emphasize, however, that a test system giving a 100 per cent certainty of lack of allergenicity does not exist at present and also that the present decision tree does not include assessment of e.g. any sensitizing potential of a novel protein.

The new decision tree is, on the other hand, much more feasible and enables fast and efficient assessment provided collaboration between independent researchers and the producers is established.

The European Academy of Allergology and Clinical

Immunology Task Force on Risk Assessment of Genetically Modified Foods are currently preparing a Position paper with comments and suggestions to the FAO/WHO 2001 decision tree.

REFERENCES

1. Metcalfe DD, Astwood JD, Townsend R, Sampson HA, Taylor SL, Fuchs RL. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1996; 36 Suppl: S165-186.
2. Bindslev-Jensen C. Allergy risks of genetically engineered foods. *Allergy* 1998; 53: 58-61.
3. Taylor S, Metcalfe D, Aalberse R, Bindslev-Jensen C, Helm R, Hill D. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of Joint FAO/WHO Expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology 22-24 January 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nation (FAO), Rome, Italy.
<http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/ECONOMIC/ESN/gm/biotec-e.htm>
4. Bruijnzeel-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindslev-Jensen C, Bjorksten B, Moneret-Vautrin D, Wuthrich B. Adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee. *Allergy* 1995; 50(8): 623-635.