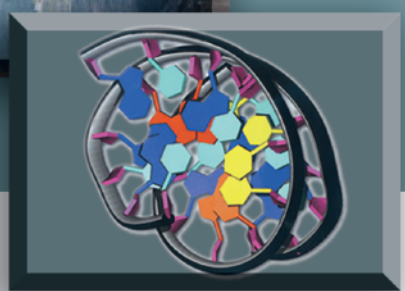


Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna

segunda edición

Francisco G. Bolívar Zapata

Compilador y editor

Academia Mexicana de Ciencias

Instituto de Biotecnología UNAM

El Colegio Nacional

CONACYT

Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados CIBIOGEM • México

FUNDAMENTOS Y CASOS EXITOSOS DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

FUNDAMENTOS Y CASOS EXITOSOS DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

Francisco G. Bolívar Zapata

Compilador y editor

Carlos F. Arias Ortiz • Jorge A. Ascacio Martínez • Hugo A. Barrera Saldaña
Francisco G. Bolívar Zapata • Pedro Bosch Guha • Héctor M. Cárdenas Cota
Mayra de la Torre Martínez • Jordan Golubov Figueroa • Mario M. González Chavira
Guillermo Gosset Lagarda • Adolfo Gracia Gasca • Ramón G. Guevara González
Luis Herrera Estrella • Agustín López-Munguía Canales • Miguel Martínez Trujillo
Gabriela M. Montero Morán • Adalberto Noyola Robles • Irmene Ortiz López
Juan A. Osuna Castro • Gerardo R. Padilla Rivas • Octavio Paredes López
Antonio A. Pérez Maya • Octavio T. Ramírez Reivich • Sergio Revah Moiseev
Iram P. Rodríguez Sánchez • Celia N. Sánchez Domínguez • José A. Serratos Hernández
Jorge Soberón Mainero • Francisco X. Soberón Mainero • Irineo Torres Pacheco
Eduardo Torres Sánchez • Jaime Uribe de la Mora • Gustavo Viniegra González

México, 2007

TP248.2
F85
2007
Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna /
Francisco G. Bolívar Zapata, compilador y editor; [autores]Carlos F. Arias Ortiz ... [et al.] - 2ª . Ed. - - México, D.D. El Colegio Nacional, 2007.
718 p.
ISBN 978-970-640-352-0
Coedición con: Academia Mexicana de Ciencias; UNAM, Instituto de Biotecnología; CONACYT; CIBIOGEM

1. Biotecnología - -México. I.. Bolívar Zapata, Francisco G., comp. II. Arias Ortiz, Carlos F., colab. III. El Colegio Nacional.

Coordinación editorial: Rosa Campos de la Rosa

Primera edición: 2004
Segunda edición: 2007

D. R. © 2007. EL COLEGIO NACIONAL
Luis González Obregón núm. 23, Centro Histórico
C. P. 06020, México D. F.
Tels. 57 02 17 79(fax) y 57 89 43 30

ISBN: 970-640-235-7 (Primera edición)
ISBN: 978-970-640-352-0 (Segunda edición)

Impreso y hecho en México
Printed and made in Mexico

www.colegionacional.org.mx
colnal@mail.internet.com.mx

CONTENIDO

Agradecimientos y aclaraciones 1
Algunos acontecimientos relevantes
para el desarrollo de la biotecnología 5
Introducción general
F. G. Bolívar 9

Sección I

FUNDAMENTOS DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

Capítulo I
Moléculas informacionales de la célula viva. Ácidos nucleicos
y proteínas
F. G. Bolívar 19
La célula viva; componentes y funciones 19
Metabolismo celular 23
Los cromosomas son las estructuras celulares donde reside
el material genético. El concepto de gene 23
La estructura del DNA 26
El DNA; su replicación y la síntesis de RNA y de proteínas 29
Mutación 39
Las proteínas; su estructura y función biológica 39
Regulación de la expresión de los genes 43
Caracterización de los procesos y de las herramientas celulares 53
Bibliografía 54

Capítulo II
Ingeniería genética. Las herramientas moleculares y los métodos
para aislar, caracterizar y manipular el DNA
F. G. Bolívar 57
La manipulación *in vitro* del material genético 57
Las herramientas celulares; enzimología de ácidos nucleicos 58

Técnicas para la generación y separación de fragmentos de DNA 67
Síntesis química de DNA 71
Métodos para determinar la secuencia de nucleótidos del DNA 71
Reacción en cadena de polimerasa o PCR 73
El vehículo molecular; herramienta fundamental para la clonación molecular y expresión de DNA. 74
El diseño y construcción de sistemas de expresión de material genético para la producción de proteínas 80
Bibliografía. 83

Capítulo III
CIENCIA GENÓMICA, PROTEÓMICA Y BIOINFORMÁTICA. EL GENOMA, EL TRANSCRIPTOMA Y EL PROTEOMA HUMANO
F. G. Bolívar 85
Genes interrumpidos en eucariontes; síntesis y procesamiento de RNA . . . 85
El genoma, el transcriptoma y el proteoma del organismo vivo 87
Las bases de datos de información genómica y proteómica. La bioinformática 92
Estudio de la expresión génica y los microarreglos 95
El genoma, el transcriptoma y el proteoma humano 96
El uso e impacto de la información genómica en la salud; el inicio de la medicina molecular 105
Bibliografía 113

Capítulo IV
SURGIMIENTO DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA. MICROORGANISMOS TRANSGÉNICOS Y PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS
F. G. Bolívar. 117
El nacimiento de la biotecnología moderna 117
Producción de proteínas recombinantes heterólogas de uso médico por métodos de DNA recombinante; los primeros ejemplos 122
Vacunas y anticuerpos recombinantes. 126
Animales y plantas transgénicas para la producción de proteínas humanas 128
Bibliografía 129

Capítulo V
MANIPULACIÓN GENÉTICA DE ANIMALES. TRANSGÉNESIS Y CLONACIÓN
H. Barrera. 131
Diseño y construcción de los primeros animales transgénicos 131
Auge de la transgénesis experimental. 134
Metodología para la construcción de animales transgénicos 135
Animales transgénicos con fines de investigación básica y aplicada 141

Ejemplo de transgénesis con fines comerciales . . . 144
Industria biotecnológica de animales transgénicos . . . 151
Clonación animal . . . 152
Métodos de clonación . . . 152
Primeros ejemplos de clonación de animales . . . 153
Aplicaciones de la clonación . . . 157
Reescribiendo la historia natural . . . 159
Bibliografía . . . 160

Capítulo VI
PLANTAS TRANSGÉNICAS
L. Herrera y *M. Martínez* . . . 167
La importancia de las técnicas de fitomejoramiento para incrementar la producción agrícola . . . 167
Métodos de transformación genética de plantas . . . 169
El sistema de *Agrobacterium tumefaciens* . . . 170
Biobalística . . . 173
Aplicaciones de la ingeniería genética de plantas . . . 174
Mejoramiento de la composición y cualidades de semillas y frutos . . . 175
Alteración de la vida de anaquel de frutos . . . 177
Resistencia a virus, bacterias y hongos fitopatógenos . . . 177
Plantas transgénicas resistentes al ataque de insectos . . . 179
Plantas transgénicas con mayor tolerancia a factores ambientales . . . 180
Las plantas como biorreactores . . . 182
Producción de vacunas orales en plantas transgénicas . . . 183
Producción de plásticos biodegradables y nuevas fibras . . . 184
Uso comercial de plantas transgénicas . . . 184
Algunos aspectos de bioseguridad relacionados con la siembra y consumo de productos transgénicos . . . 186
Perspectivas y conclusiones . . . 191
Bibliografía . . . 192

Capítulo VII
INGENIERÍA DE PROTEÍNAS Y EVOLUCIÓN DIRIGIDA
X. Soberón y *G. M. Montero* . . . 195
Las proteínas como herramientas moleculares . . . 195
Biocatálisis y biotecnología moderna . . . 198
Retos a resolver. Mitos y realidades . . . 200
Enfoques . . . 206
Ámbito de oportunidades . . . 215
Bibliografía . . . 217

Capítulo VIII
INGENIERÍA CELULAR MICROBIANA
G. Gosset y *F. G. Bolívar* 219
La producción de bebidas y alimentos por procesos de fermentación; el nacimiento de la biotecnología 219
Fisiología celular microbiana 221
Transporte 221
Metabolismo y redes metabólicas 224
Regulación genética de la red metabólica celular. 233
La importancia del conocimiento del transcriptoma y el proteoma de la célula para la comprensión fina del metabolismo celular. 234
El metaboloma. 235
Análisis de flujos metabólicos 235
Análisis de control metabólico 237
La ingeniería celular y la bioingeniería de procesos 238
Estrategias generales de la ingeniería celular 239
Ingeniería celular para la producción de compuestos aromáticos en *E. coli* 240
Características generales de las vías de síntesis de compuestos aromáticos. 240
Modificación de componentes de la vía común de síntesis de compuestos aromáticos para incrementar el flujo de carbono hacia la biosíntesis de DAHP y corismato 242
Modificación del metabolismo central para canalizar esqueletos de carbono hacia la vía de síntesis de compuestos aromáticos 243
Cepas de *E. coli* productoras del aminoácido fenilalanina. 246
Bibliografía 247

Capítulo IX
INGENIERÍA BIOQUÍMICA
O. T. Ramírez 249
La misión de la ingeniería bioquímica 249
Los orígenes de la ingeniería bioquímica y los bioprocesos. 250
La ingeniería bioquímica moderna 254
El cultivo de microorganismos, células y tejidos para la generación de productos 256
Entendiendo las características y requerimientos de la célula para producir metabolitos 259
Estequiometría del crecimiento celular y producción de metabolitos . . . 260
Cinética del crecimiento celular y producción de metabolitos 264
Funcionamiento y diseño de biorreactores: importancia

del entorno celular 270
Fenómenos de transporte 273
Modos de operación 277
El traslado del laboratorio a la industria 281
Escalamiento ascendente 281
Escalamiento descendente 285
Instrumentación, control y optimización de bioprocesos 288
Bibliografía 296

Capítulo X
BIOTECNOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD
J. Soberón y *J. Golubov* 299
La biodiversidad como riqueza natural estratégica de México 299
Biotecnología y biodiversidad 302
Métodos de la biología molecular aplicados a la conservación y manejo de la biodiversidad 303
Posibles riesgos; la bioseguridad 308
El potencial de la biotecnología y la biodiversidad 309
Acceso a los recursos genéticos 312
Bibliografía 313

Capítulo XI
BIOTECNOLOGÍA AGROECOLÓGICA, BIODIVERSIDAD Y AGRICULTURA SUSTENTABLE, *J. A. Serratos* 317
Biotecnología agroecológica 317
Ecosistemas y agroecosistemas 321
Situación de los agroecosistemas en México 325
Agricultura sustentable y biotecnología agroecológica 341
Bibliografía 348

Sección II

CASOS EXITOSOS DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

LA VACUNA CONTRA LA HEPATITIS B: UN ÉXITO DE LA BIOTECNOLOGÍA
C. F. Arias 355
Introducción 355
Contribución de la biotecnología al campo de la vacunación 355
La vacuna contra la hepatitis B: un éxito de la biotecnología 358
Epidemiología e importancia médica de la hepatitis B 358
Conocimiento de la biología del virus como antecedente necesario

para el desarrollo de la vacuna recombinante 361
Historia del desarrollo de las vacunas contra hepatitis B 364
Impacto de la vacuna recombinante sobre la infección por VHB y el CHC. 366
Esfuerzos en países en desarrollo para producir la vacuna recombinante de VHB 368
Investigación en México sobre vacunas recombinantes 368
Conclusiones y consideraciones generales 369
Bibliografía 370

La producción de hormonas del crecimiento por técnicas de ingeniería genética; su utilización en los sectores de la salud y pecuario
H. A. Barrera, I. P. Rodríguez, C. N. Sánchez, A. A. Pérez, J. A. Ascacio y *G. Padilla* 373
Introducción 373
La familia de la hormona del crecimiento (GH) 374
Hormonas del complejo GH-PL del humano 375
Hormonas del crecimiento de origen animal 378
Potencial biotecnológico de las GHs 381
Sistemas de expresión para las hormonas del crecimiento 383
Hormonas recombinantes del crecimiento: una oportunidad para México. 384
Perspectivas. 386
Bibliografía 386

Biotecnología farmacéutica moderna en México: el caso de Probiomed, S.A. de C.V.
O. T. Ramírez, y *J. Uribe* 391
Introducción 391
Tendencias en biotecnología farmacéutica relevantes para el caso Probiomed. 406
Probiomed S.A. de C.V. 408
Plataformas tecnológicas. 411
Investigación y desarrollo 421
Otras características distintivas del caso Probiomed 422
El éxito de Probiomed 423
Bibliografía 426

Casos exitosos de la tecnología enzimática y la biocatálisis en México
A. López-Munguía 429
Introducción 429
El mercado en México 431

Algunos ejemplos de desarrollos científicos y tecnológicos en la enzimología y la biocatálisis en México en los últimos 25 años . . 432
Producción de leches deslactosadas 433
Producción de fructosa a partir de agave 436
Producción enzimática del ácido 6 aminopenicilánico (6APA) y penicilinas semisintéticas 438
Aditivo enzimático para retrasar el endurecimiento de la tortilla de maíz 440
Enzimas en medios no convencionales 444
Las enzimas y los nuevos antivenenos 446
Conclusiones 447
Bibliografía 448

MEJORAMIENTO DE CARACTERÍSTICAS Y CALIDAD ALIMENTARIAS Y NUTRACÉUTICAS DE PLANTAS MEDIANTE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR; ALGUNOS EJEMPLOS
J. A. Osuna y *O. Paredes* 451
Introducción 451
Biomacromoléculas de interés alimentario 452
Micronutrientes 471
Alergenicidad en cultivos modificados genéticamente 492
Consideraciones finales 497
Bibliografía 498

BIOCONTROL DE PLAGAS AGRÍCOLAS Y ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS
E. Torres, H. M. Cárdenas y *Ma. M. de la Torre* 505
Introducción 505
Biocontrol 506
Biotecnología y biocontrol 507
Biocontrol en México 515
Regulación de agentes para el control biológico en México 518
El caso de Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V. 519
El futuro 525
Bibliografía 526

LAS HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS Y PARA SU MEJORAMIENTO GENÉTICO
I. Torres, M. M. González y *R. G. Guevara* 529
Introducción 529
El diagnóstico 530
Métodos inmunológicos 532
Diagnóstico molecular 538
La detección de patógenos como base del diagnóstico; casos exitosos . . . 541

Experiencia en México en el diagnóstico molecular de virus en agricultura. . . . 543
Alternativas y ventajas del diagnóstico molecular para el manejo de variedades de plantas . . . 545
Genómica y diagnóstico molecular en la agricultura . . . 550
Bibliografía . . . 553

La experiencia del grupo Savia en el campo mexicano
P. Bosch . . . 561
Introducción . . . 561
Grupo Savia . . . 562
Participación en México . . . 567
Esquema conceptual . . . 567
El mercado . . . 569
La tecnología moderna de producción agrícola y la participación del grupo Savia . . . 569
El caso de la micropropagación de agave para la industria del tequila . . . 573
Zonas de cultivo . . . 576
Selección de socios . . . 577
Consideraciones finales . . . 577
Bibliografía . . . 578

Desarrollo y aplicación del proceso Biofermel: una fermentación láctica para el aprovechamiento eficiente de la melaza por el ganado
G. Viniegra . . . 579
Introducción . . . 579
Planteamiento del problema . . . 580
Investigación y desarrollo de la invención . . . 585
Desarrollo comercial del proceso Biofermel . . . 590
Oportunidades futuras para otras fermentaciones ganaderas . . . 593
Reflexiones sobre la estrategia de innovación y transferencia de la tecnología . . . 594
Bibliografía . . . 595

Una experiencia en el desarrollo de tecnología biológica para el tratamiento de aguas residuales
A. Noyola . . . 599
Introducción . . . 599
La vía biotecnológica en el tratamiento de aguas residuales . . . 600
Procesos anaerobios para el tratamiento de aguas residuales . . . 604
Infraestructura de tratamiento de aguas residuales en México . . . 612
Desarrollo y transferencia de una tecnología anaerobia nacional . . . 614

Impacto del proyecto . . . 619
Conclusiones . . . 621
Bibliografía . . . 621

El desarrollo de bioprocesos para el tratamiento de aire contaminado emitido por fuentes fijas
S. Revah e *I. Ortiz* . . . 625
Introducción . . . 625
Técnicas de tratamiento . . . 627
Métodos biotecnológicos . . . 630
Fundamentos de los procesos de tratamiento de aire . . . 635
El modelo de Ottengraf y van Den Oever . . . 639
Un proyecto exitoso Universidad-Industria: el desarrollo de biolavadores para el tratamiento de efluentes gaseosos . . . 643
Desarrollo de un proceso de purificación biológica . . . 645
Relevancia de la investigación en biofiltración . . . 653
Conclusiones . . . 655
Bibliografía . . . 655

Peces transgénicos en acuacultura; el caso del supersalmón
A. Gracia. . . . 659
Introducción . . . 659
Potencial de la biotecnología para el desarrollo de la acuacultura . . . 660
Producción de animales acuáticos transgénicos . . . 662
Selección y construcción de genes recombinantes y métodos de transferencia génica para la producción de peces transgénicos . . . 664
Construcción del "supersalmón" transgénico . . . 667
Bibliografía . . . 672

Anexo: Por un uso responsable de los organismos genéticamente modificados
Comité de Biotecnología. Academia Mexicana de Ciencias . . . 675

Extractos curriculares de los autores . . . 695

Índice de materias . . . 719

AGRADECIMIENTOS Y ACLARACIONES

Este libro fue publicado conjuntamente y gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad para el Manejo de Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), la Academia Mexicana de Ciencias (AMC), el Instituto de Biotecnología, (IBt) de la UNAM, y El Colegio Nacional. Los autores agradecen a estas instituciones y a aquellas en las que laboran, el apoyo otorgado para la realización de esta obra.

Nuestro agradecimiento cordial y profundo a Renata Villalba por su apoyo para la elaboración y la lectura cuidadosa de este libro, a Sonia Caro por su extraordinario apoyo en el proceso de la obra y a Beatriz Palmeros por su ayuda en la elaboración de varias de las figuras.

Francisco G. Bolívar agradece a Ana Gutiérrez la lectura crítica y constructiva de los primeros cuatro capítulos de este libro. Asimismo, agradece el apoyo de María Elena Ávila y Rosa Campos, trabajadoras excelentes de El Colegio Nacional, por su apoyo en la edición de los cuatro primeros capítulos de este libro, que fueron elaborados primariamente con material actualizado y ampliado del tomo IV de sus *Obras Completas*, como miembro de esa institución.

Asimismo, el capítulo VIII de este libro es una versión más detallada del capítulo "Ingeniería celular en microorganismos" publicado en el libro *Fronteras de la biología en los inicios del siglo XXI,* módulo 1 "Genómica, proteómica y bioinformática", publicado en El Colegio Nacional (2003), por Francisco G. Bolívar y Guillermo Gosset. De la misma manera el capítulo VI de este libro está tomado de la misma publicación *Fronteras de la biología en los inicios del siglo XXI* módulo 3, "Biotecnología agrícola" publicado en El Colegio Nacional (2003), por Luis Herrera-Estrella y Miguel Martínez.

Francisco G. Bolívar agradece también a Susana López y Carlos Arias su autorización para utilizar información que se ha incorporado en el capítulo III, en la sección de "Bases de datos de información genómica y proteómica. La bioinformática." Esta información fue obtenida y adap-

tada de su trabajo *Los virus en la era genómica*, publicado en el módulo 1 de "Genómica, proteómica y bioinformática", *Fronteras de la biología en los inicios del siglo XXI,* publicado por El Colegio Nacional (2003).

Los autores agradecen el uso de ciertas figuras que se han incorporado en diferentes capítulos de este libro.

En particular Hugo Barrera agradece a las siguientes personas e instituciones, por el uso de figuras que aparecen en el capítulo V de este libro: a) Thomas Rulicke de Biologisches Zentrallabor, Institut fur Labortierkunde, Suiza, por el uso de la figura V.1; b) Lluis Montolin de España, http://www.cnb.uam.es/montolin, por el uso de la figura V.2; c) Masure Okabe, Genome Information Research Center, Osaka University, Japón, por el uso de la figura V.4; d) John McLaughlin, Universidad de Pennsylvania, EUA, por el uso de la figura V.5; e) T. T. Chen, Universidad de Connecticut, EUA, por el uso de la figura V.6; f) Roslin Institute, Edimburgo, Escocia, roslin.ac.uk.mailto:info@roslin.ac.uk por el uso de la figura V.8; g) Jim Newman, Oregon Health and Science University, EUA, por el uso de la figura V.9. Hugo Barrera agradece también a las siguientes personas e instituciones, por el uso de figuras en el caso exitoso: "La producción de hormonas de crecimiento por técnicas de ingeniería genética": a) J. Ricky Cox (ricky.cox@murraystate.edu), Murray State University, EUA, por el uso de la figura 1; b) Edwina Lamkin, BresaGen Limited, EUA, por el uso de la figura 3. Luis Herrera agradece a Ingo Potrikus por el uso de la figura VI. 3 publicada en el capítulo VI de este libro. Jorge Soberón agradece a Luis Eguiarte y Valeria Souza por el uso de la figura X.3 que aparece en el capítulo X; asimismo reconoce que la figura X.1 fue elaborada con datos tomados de http://www.ncbi. nlm. nih.gov/taxonomy/tax.htlm/. José Antonio Serratos agradece a las siguientes personas e instituciones por el uso de algunas figuras que aparecen en el capítulo XI de este libro: a) Teodoro González de León, miembro de El Colegio Nacional, por el uso de la figura XI.2 tomada del libro *Una visión integradora* (F. Bolívar y P. Rudomín, comps.), El Colegio Nacional (2002), México, D. F.; b) Rodolfo Dirzo, Instituto de Ecología, UNAM, México, por el uso de la figura XI.4, publicada en: "Diversidad florística y estado de conservación de las selvas tropicales de México"; en: *México ante los retos de la biodiversidad* (J. Sarukhán y R. Dirzo comps.), CONABIO (1992), México, D. F. Asímismo, reconoce que se utilizó información publicada por FAO para la elaboración de varias figuras del capítulo X.1. Carlos Arias agradece a Gisèle Laliberté, Copyright Officer, Information Management and Dissemination, WHO HQ, Ginebra, Suiza,

por el uso de la figura 2, en el caso exitoso: “La vacuna contra la hepatitis B: un éxito de la biotecnología”, y a María Antonieta Arias y Susana López por la lectura crítica de este capítulo. Mayra de la Torre agradece a Agrobiológicos del Noroeste S. A. de C. V., el uso de la figura 4, en el caso exitoso: “Biocontrol de plagas agrícolas y enfermedades de las plantas”. Agustín López-Munguía agradece también a la empresa Neolac S. A. de C. V., el uso de la figura 1 publicada en el caso exitoso “Casos exitosos de la tecnología enzimática y la biocatálisis en México”.

En esta segunda edición del libro, se incorporaron algunas modificaciones en los capítulos I y III, con el propósito de actualizar el concepto de gene. Hoy el gene se define como un segmento de DNA que codifica para una molécula de RNA. Hay genes cuyos transcritos de RNA (RNA mensajeros), se traducen en proteínas y hay otros genes cuyos transcritos de RNA no se traducen en proteínas. Algunas de estas moléculas de RNA que no se traducen participan directamente en la síntesis de proteínas a nivel de los ribosomas y otras moléculas de RNA pequeñas que tampoco se traducen, participan en modular la traducción de los RNAs mensajeros, y parecieran tener también otros papeles regulatorios en la estructuración del genoma y en la diferenciación celular.

Finalmente, se incorpora un anexo titulado “Por un Uso Responsable de los Organismos Genéticamente Modificados”. Este texto fue elaborado por los miembros del Comité de Biotecnología de la Academia Mexicana de Ciencias, con el propósito de señalar, por un lado, los beneficios del uso responsable de los transgénicos, y por otro, señalar la necesidad de que la evaluación de los posibles riesgos del uso de OGMs se realice conforme al marco jurídico que dicta la Ley de Bioseguridad de OGMs, aprobada por el Congreso de la Unión en abril de 2005.

ALGUNOS ACONTECIMIENTOS RELEVANTES PARA EL DESARROLLO DE LA BIOTECNOLOGÍA

1796. E. Jensen desarrolla la primera vacuna contra la viruela.

1871. Se describe el ácido desoxirribonucleico (DNA) en el esperma de la trucha.

1880. G. Mendel descubre que existen elementos genéticos discretos (a los que posteriormente se les denomina genes), en donde residen características específicas de los organismos vivos y que son heredados a la progenie.

1885. L. Pasteur desarrolla la vacuna contra la rabia.

1911. Se elaboran por T. Morgan y colaboradores, los primeros mapas genéticos en la mosca de la fruta.

1922. A. Flemming descubre la penicilina.

1944. Se demuestra por O. Avery, C. McLeod y M. McCarthy, que el DNA es la sustancia en donde reside la información genética.

1953. Se describe la estructura conformacional de la doble hélice del DNA por J. Watson y F. Crick.

1958. M. Messelson y F. Stahl, demuestran que la replicación del DNA ocurre a través de la separación de las dos hélices del DNA y del copiado *de novo*, de sus dos hélices para formar dos dobles hélices idénticas a partir de la original.

1960. A. Kornberg aisla la enzima de DNA polimerasa.

1961. S. Brenner y colaboradores descubren el RNA mensajero y demuestran que tiene la información y la capacidad para dirigir la incorporación de aminoácidos en la síntesis de las proteínas.

M. Niremberger y colaboradores, establecen con base en las propuestas de F. Crick el código genético universal.

F. Jacob y colaboradores aislan el primer elemento que regula la expresión y de los genes.

1967. Se aisla la enzima ligasa del DNA, que permite unir fragmentos de DNA de diferentes orígenes.

1970. H. Smith y colaboradores aislan la primera enzima nucleasa de restricción que corta a los DNA en sitios específicos.

1973. S. Cohen y H. Boyer desarrollan el primer organismo transgénico, mediante la inserción de un fragmento de DNA de rana en un plásmido bacteriano, introducido en la bacteria *Escherichia coli.*

1977. R. Maxam y W. Gilbert, y F. Sanger y colaboradores, desarrollan simultáneamente métodos para determinar la secuencia de los nucleótidos del DNA.

Se establece que existen los intrones y los exones en los genes de los organismos superiores.

K. Itakura y colaboradores crean el primer organismo transgénico que permite la síntesis de una hormona humana en bacterias.

1978. Se reporta la secuencia genómica completa de un virus; el de ΦX174.

1979. Se crea la primera compañía en ingeniería genética: Genentech, Inc., en EUA.

1981. Se reporta la secuencia del genoma de la mitocondria humana.

1982. P. Valenzuela y colaboradores desarrollan el primer producto recombinante que se utiliza como vacuna en humanos.

1983. Se diseñan y construyen las primeras plantas transgénicas, por M. Montagu y colaboradores.

1987. K. Mullis y colaboradores desarrollan el sistema de PCR que permite amplificar millones de veces fragmentos específicos de DNA.

1988. Los Institutos Nacionales de Salud en EUA, a iniciativa de J. Watson, establecen la Oficina para la Investigación del Genoma Humano.

1990. Tres grupos desarrollan simultáneamente el método de electroforesis capilar que permite optimizar la automatización de los métodos para la secuenciación del DNA.

1995. Se reporta la secuencia nucleotídica del primer genoma de un organismo vivo, el de la bacteria *H. influenzae*.

1996. Se reporta la secuencia nucleotídica del primer genoma de un eucarionte, el de la levadura *S. cerevisiae*.

1998. Se reporta la secuencia del primer genoma de un animal; el de *C. elegans*.

1999. Se reporta la secuencia nucleotídica del primer cromosoma humano (el 22).

2000. Se reporta la secuencia nucleotídica del primer genoma de una planta; el de *A. thaliana*.

2001. Se reporta por dos grupos en forma simultánea, la secuencia nucleotídica del genoma humano.

2002. Se reportan las secuencias nucleotídicas de los genomas del ratón y del arroz.

INTRODUCCIÓN GENERAL

F. G. Bolívar Zapata

Los experimentos pioneros de Jensen en 1796 y de Pasteur en 1885, que permitieran la producción de las primeras vacunas contra la viruela y la rabia respectivamente, son ejemplos contundentes de la capacidad de las técnicas de la biotecnología para contender con problemas relevantes para la sociedad, en este caso con los organismos patógenos causantes de estas enfermedades.

La biotecnología ha estado presente desde tiempos inmemorables en la solución de muchos problemas importantes, no sólo en el campo de la salud, permitiendo la producción de vacunas y antibióticos, sino también en el de la producción de alimentos a través de procesos de fermentación, tales como el pan o la cerveza.

Sin embargo, hablar hoy de biotecnología ya no remite de manera exclusiva a procesos ligados a la producción de alimentos y bebidas, como ocurría en el pasado reciente. Con la aparición de la biología molecular, en los años cincuenta, se descifra la estructura del material genético, así como los mecanismos celulares que permiten traducir en proteínas la información genética. Por otro lado, en los años setenta surgen las técnicas de la ingeniería genética y con ello la posibilidad de aislar, editar y manipular el material genético, lográndose incluso el transplante de genes entre especies, creándose así los organismos transgénicos. Este conjunto de conocimientos sobre el material genético y las proteínas de la célula viva, así como de las metodologías para manipularlos, constituye una de las plataformas de despegue de la biotecnología moderna.

La segunda circunstancia que caracteriza la emergencia de la biotecnología moderna, se ubica en la transformación conceptual del alcance de la ciencia. La ciencia y la tecnología que de ella se derrama, no se conciben ya como la aplicación del conocimiento a problemas individuales de disciplinas aisladas, a partir de un conjunto determinado de herramientas y métodos particulares de la disciplina en cuestión. La ciencia se

comprende ahora como un tipo de actividad de índole multidisciplinaria, en la que el éxito en la solución de problemas científicos y sociales complejos sólo se podrá vislumbrar con el concurso y la convergencia de múltiples conocimientos, herramientas y estrategias.

La biotecnología moderna se puede definir como una actividad multidisciplinaria, cuyo sustento es el conocimiento de frontera generado en diversas disciplinas (entre otras, la biología molecular, la ingeniería bioquímica, la microbiología, la genómica y la inmunología), que permite el estudio integral y la manipulación de los sistemas biológicos (microbios, plantas y animales). A partir de dicho estudio y de la manipulación de los sistemas biológicos, la biotecnología moderna busca hacer un uso inteligente, respetuoso y sustentable de la biodiversidad, mediante el desarrollo de tecnología eficaz, limpia y competitiva, para facilitar la solución de problemas importantes en sectores tales como el de la salud, el agropecuario, el industrial y del medio ambiente.

El papel que desempeña así la biotecnología moderna en el mundo actual es clave. El nuestro es un mundo contaminado y con ecosistemas destruidos por los impactos de la industrialización. Un mundo con una población en demanda creciente de alimentos, de agua, de recursos energéticos, de servicios de salud y vivienda, cuya satisfacción implicará consolidar, modernizar y adecuar la industria y la producción agropecuaria a condiciones nacionales. Ante esta realidad, si no mantenemos una conciencia crítica y nos movemos hacia la búsqueda de alternativas tecnológicas eficaces, limpias, y respetuosas del medio ambiente iremos irremediablemente hacia escenarios de mayor contaminación y degradación.

La importancia de consolidar y desarrollar la biotecnología moderna forma parte de una estrategia sustentable e inteligente hacia la naturaleza que propicie el uso, la preservación y la recuperación de la biodiversidad y de los ecosistemas de nuestro planeta y que, simultáneamente, satisfaga las necesidades de la sociedad humana.

La biotecnología moderna surge como se ha mencionado, de la capacidad de poder diseñar y construir organismos genéticamente modificados, mediante el uso de las técnicas de ingeniería genética. Para poder comprender los elementos que propician el surgimiento de estas metodologías, y con ello visualizar el amplio potencial de la biotecnología moderna, es necesario recordar con detalle los experimentos y los conceptos fundamentales en el área de la genética y de la biología molecular, que dieron lugar al nacimiento y automatización de estas técnicas de la ingeniería genética y con ello el surgimiento de la biotecnología moderna:

La genética nace hace cerca de 150 años, con los experimentos de Mendel de los cuales deriva el concepto de gene, como la instancia en donde reside la información responsable de caracteres hereditarios específicos. Los trabajos de Mendel son redescubiertos a principios del siglo pasado y sustentan el esfuerzo de experimentos pioneros, particularmente en el caso de la mosca de la fruta *(Drosophila melanogaster)* por Morgan y colaboradores, para el desarrollo de los primeros mapas genéticos que permitieron localizar la posición relativa de los genes en los cromosomas de los seres vivos.

Durante la segunda mitad del siglo pasado fuimos testigos de la aparición y evolución de la biología molecular, de la ingeniería genética y más recientemente, de la genómica. En particular en 1944, Avery, McCleod y McCarty demuestran que la información genética de los seres vivos reside en un tipo de macromolécula biológica llamada ácido desoxirribonucleico, el DNA, por sus siglas en inglés. Nueve años más tarde, Watson y Crick, sustentados en el trabajo de varios físicos y químicos muy notables, entre ellos Franklin, descubren la estructura de la doble hélice del DNA. Los siguientes veinte años son testigos de los esfuerzos que permitieron entender cómo se replica el DNA y cómo la información genética localizada en regiones específicas del DNA, a las que hoy llamamos genes, permite la síntesis de moléculas de ácido ribonucleico (RNA) específicos y de proteínas, que son las herramientas celulares con las que la célula viva realiza sus funciones.

Gracias al conocimiento acumulado hasta ese momento sobre el funcionamiento de la célula viva, fue posible el desarrollo, en la década de los años setenta en el siglo pasado, de las técnicas poderosas de la ingeniería genética o metodología del DNA recombinante, mediante las cuales es posible aislar, modificar y clonar genes y también construir organismos transgénicos en el laboratorio, que han sido de indudable valor para la humanidad. El impacto de esta tecnología se hizo presente inicialmente en las áreas de la salud y de la medicina, cuando se diseñaron y construyeron microorganismos transgénicos productores de proteínas humanas tales como insulina, interferones, hormonas de crecimiento, que hoy se utilizan en el tratamiento de diferentes problemáticas clínicas. Posteriormente, la ingeniería genética alcanzó al sector agropecuario con la presencia de microorganismos, plantas y animales transgénicos que han permitido la producción de mejores cultivares, alimentos y otros satisfactores. El industrial será el tercer sector donde la biotecnología moderna tendrá un impacto mayúsculo, al transformar la industria química en una industria biotecnológica respetuosa del medio ambiente, que no contamine.

Más adelante, a mediados de los ochenta el desarrollo y la automatización de otras técnicas poderosas de la biología molecular, permite avances adicionales muy importantes sobre el conocimiento del material genético, y su utilización para la solución de problemas específicos. En particular destaca la técnica llamada "reacción en cadena de la polimerasa" (polymerase chain reaction, PCR), que permite en unas pocas horas generar millones de copias idénticas a un fragmento original de DNA, constituyéndose así en una herramienta podera para el diagnóstico genético. Asimismo, las técnicas de secuenciación de DNA, permiten determinar la secuencia nucleotídica de todo el material genético de un organismo, y con ello, surge la ciencia genómica. Los primeros organismos cuyo material genético fue completamente secuenciado a fines del siglo pasado, fueron bacterias que tienen sólo entre 3000 y 4000 genes como parte de su genoma. Esfuerzos más recientes permitieron determinar ya la secuencia de organismos más complejos llamados eucariontes. El primer eucarionte secuenciado fue la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y posteriormente se reporta también la secuencia de los genomas del gusano *Caenorhabditis elegans,* de la mosca *Drosophila melanogaster* y de la primera planta *Arabidopsis thaliana.* Finalmente, a principios del año 2001, dos grupos, de manera simultánea e independiente, reportan la secuencia del genoma humano, y posteriormente se reporta la secuencia nucleotídica del genoma del ratón y del arroz. A la fecha hay más de mil genomas secuenciados.

Con la determinación de la secuencia nucleotídica del genoma humano y la de otros muchos organismos con los que compartimos nuestro planeta, nos adentramos, de manera profunda y novedosa, en el conocimiento de la célula y del organismo vivo. Al conocer la secuencia de todos los genes que codifican para proteínas de un organismo, es posible deducir el proteoma de ese organismo, es decir, las secuencias de aminoácidos de todas sus proteínas. Con ello se inicia la ciencia proteómica, la cual busca conocer la función y la interrelación de todas las proteínas de un organismo. Asimismo, con la información que hoy se tiene, es posible empezar el estudio integral y global de la red metabólica celular y conocer la manera como la célula viva regula la expresión genética en diferentes condiciones metabólicas.

Hoy conocemos la secuencia de nuestros genes y de los productos para las que codifican. Al compararlas con las de otros seres vivos, realmente nos damos cuenta, por un lado, de la gran cercanía genética y biológica que existe entre los diferentes organismos vivos, con los que conformamos la biodiversidad, y por otro de las diferencias que se seleccionaron durante la evolución entre los diversos sistemas biológicos.

Sin embargo, este nuevo conocimiento no resulta ser más que una etapa —muy importante, pero finalmente una etapa—, ya que si bien podemos enlistar genes, RNAs y proteínas que pueden sintetizar muchos de los seres vivos —y cuya interacción entre ellas hace posible los procesos de crecimiento y multiplicación de los organismos vivos—, esto no significa que de forma inmediata conoceremos todos los detalles del funcionamiento de la célula viva. Hay, pues, mucho más que conocer para entender el proceso mismo de la vida y para contender con los problemas de las enfermedades de los seres vivos.

Por otro lado, gracias al alcance de las técnicas de DNA recombinante y de técnicas de síntesis química de macromoléculas biológicas y de su caracterización estructural, hemos sido testigos de un avance extraordinario en el conocimiento de la estructura y función de un gran número de genes y proteínas. Con base en este conocimiento, se desarrolla la disciplina denominada ingeniería de proteínas, que tiene como fin la modificación dirigida de la estructura y por tanto de la función biológica de estas macromoléculas informacionales, y más recientemente, las técnicas de evolución dirigida que permiten el diseño y la selección de nuevas propiedades enzimáticas en las proteínas. Otra vía muy importante para aumentar la disponibilidad y variabilidad de enzimas surge del avance de las técnicas de manejo y clonación del DNA de organismos, en particular microorganismos provenientes de muestras y entornos diversos (como agua, lodos y sedimentos y todo tipo de tejidos) que, aunadas a la búsqueda automatizada de actividades enzimáticas, permiten eliminar el paso del cultivo del microorganismo para aislar una nueva actividad. Se ha observado que más del 90% de los microorganismos presentes en una muestra de agua o suelo naturales jamás han sido identificados ni cultivados. Las técnicas mencionadas permiten, en conclusión, tener acceso a un vasto repertorio de biodiversidad previamente inexplotado. Por sí solo, este mayor acceso a la diversidad catalítica natural no es suficiente para contender con las necesidades de la industria moderna. Es de esperarse que, en general, para los compuestos no naturales (que son, desde luego, la inmensa mayoría de los que se utilizan en la actualidad), no existan actividades enzimáticas suficientemente eficaces para su síntesis y por esta razón continuará siendo necesario realizar cambios adecuados a los catalizadores biológicos.

Además, en cuanto a la producción industrial de macromoléculas y metabolitos biológicos ha habido avances muy importantes en el área de la ingeniería bioquímica, orientados a optimizar los procesos de escala-

miento “hacia arriba y hacia abajo”, y en particular en aspectos de fermentación y purificación de metabolitos y macromoléculas, principalmente proteínas.

En los albores del siglo XXI nos encontramos ante un escenario extraordinario en cuanto a las posibilidades existentes para el diseño y desarrollo de organismos modificados genéticamente (microorganismos, plantas y animales), con nuevas propiedades específicas y también en cuanto al diseño, manipulación y orientación de la maquinaria celular en procesos específicos para la producción de moléculas de interés social y comercial y para otro tipo de funciones. Consideramos que, con ello, estamos *de facto* empezando a construir una nueva área a la que podríamos definir como la ingeniería de la célula viva.

Las consideraciones anteriores explican la frecuente mención de la biotecnología como la más importante tecnología de principios del siglo XXI, así como la reorientación de grandes empresas hacia la biotecnología como su base tecnológica fundamental.

En este libro se presenta la evidencia de cómo el conocimiento de las disciplinas que sustentan la biotecnología, tales como la genética, la ingeniería genética, la ciencia genómica, la ingeniería de proteínas, la microbiología, la ecología, la ingeniería bioquímica, ha contribuido a construir este nuevo paradigma del funcionamiento de la célula viva, y de cómo a partir de la utilización de este conocimiento del funcionamiento de la célula y sus componentes, surge como se ha señalado la posibilidad de la modificación dirigida de la célula viva, mediante las técnicas de la ingeniería genética y celular, y con ello el nacimiento de la biotecnología moderna. Para describir en detalle estos asuntos y para señalar posibles horizontes futuros en perspectiva, así como ejemplos de casos exitosos de la biotecnología moderna en el mundo y en nuestro país, resulta pertinente presentar inicialmente, en la primera sección de este libro, un análisis de los aspectos y los elementos fundamentales que han permitido el avance del conocimiento en estas disciplinas que sustentan la biotecnología moderna. Posteriormente, en la segunda sección del libro, se señalan ejemplos de casos exitosos de la biotecnología, la mayor parte de ellos en México.

Conforme a lo anterior, en el primer capítulo de este libro se analizan aquellos experimentos y contribuciones fundamentales, que han permitido alcanzar una visión molecular del funcionamiento celular y en particular una idea bastante clara de cómo las moléculas de DNA, en las que reside la información genética de todos los seres vivos, se organizan, se

replican y se transcriben para sintetizar RNAs. Los RNAs son de varios tipos y entre ellos, los llamados RNA mensajeros permiten la síntesis de las proteínas que son simultáneamente las herramientas celulares y las moléculas en donde reside la información funcional de la célula. En el segundo capítulo se aborda el tema de la ingeniería genética, entendida ésta como un conjunto de metodologías y herramientas que permiten el manejo *in vitro* del material genético. En el tercer capítulo del libro se discuten los conceptos de genoma, transcriptoma y proteoma de la célula viva y se hace énfasis en el análisis del genoma del ser humano. En el cuarto capítulo se analiza cómo a partir de las técnicas de la ingeniería genética se lleva a cabo el surgimiento de la biotecnología moderna y se señalan los primeros ejemplos de la construcción de organismos transgénicos y los impactos que han tenido inicialmente en el sector de la salud y la medicina moderna. En el siguiente capítulo, se lleva a cabo una descripción de la manipulación genética de animales, haciendo énfasis en la transgenosis y en la clonación. En el capítulo sexto se describen las técnicas para la construcción de plantas transgénicas y se reseñan aplicaciones y controversias surgidas por su uso. En el siguiente capítulo se abordan los conceptos de la ingeniería y la evolución dirigida de proteínas con el propósito de optimizar las funciones de este tipo de macromoléculas celulares. En el capítulo octavo se aborda el tema de la ingeniería celular y se describen las estrategias y procesos encaminados a optimizar la maquinaria celular para incrementar la producción de metabolitos y macromoléculas en diferentes procesos. En el capítulo noveno se analiza el tema de la ingeniería bioquímica como el conjunto de conocimientos y métodos con los que se cuenta para optimizar los procesos de fermentación y purificación de células y sus productos, a nivel de las plantas piloto y a nivel industrial. En el siguiente capítulo se aborda el tema de la relación entre la biotecnología y la biodiversidad, señalando la importancia del conocimiento y del uso respetuoso y sustentable de los organismos vivos que habitan el planeta, mediante la biotecnología moderna. En el último capítulo de esta primera sección se discute el tema de la biotecnología agroecológica, como la estrategia y el enfoque más adecuados para contender con muchas de las demandas y problemas de los sistemas agropecuarios particulares de México. En estos dos últimos capítulos al igual que en el sexto, también se presenta un análisis de los posibles riesgos que implica el uso de cultivares transgénicos en particular en México, por ser Centro de origen de muchas especies.

En la segunda sección de este libro, como fuera señalado, se presentan casos exitosos de la biotecnología moderna, que han tenido impacto en diferentes sectores. El primero de ellos, es el desarrollo de una vacuna contra la hepatitis B, como el ejemplo inicial del uso de las técnicas de la ingeniería genética para contender, a este nivel, con enfermedades humanas. El segundo caso exitoso que se presenta es el de la producción de hormonas de crecimiento, también a través de las técnicas del DNA recombinante, y su impacto y utilización en los sectores de la salud humana y pecuario. Posteriormente, se presenta el esfuerzo de la compañía Probiomed, S. A., para integrarse y transformarse en la primera empresa mexicana productora de medicamentos recombinantes. El cuarto ejemplo de los casos exitosos es en realidad un conjunto de logros a nivel nacional englobados en el tema de la tecnología enzimática y la biocatálisis y sus impactos en diferentes sectores industriales, en particular el alimentario y el farmacéutico. El siguiente caso señala ejemplos del uso de la biotecnología moderna para caracterizar y mejorar la calidad alimentaria y nutracéutica de diferentes cultivares. En el sexto caso de éxito se presentan esfuerzos realizados en el área de biocontrol de plagas agrícolas en México y se muestra la labor desarrollada conducente a la creación de una empresa nacional productora de bioinsecticidas. En el siguiente ejemplo se analiza el uso de las herramientas biotecnólogicas para el diagnóstico de enfermedades de plantas en nuestro país y para su mejoramiento genético. En el siguiente caso exitoso, se señala el esfuerzo y la experiencia del grupo Savia en el campo mexicano, con el propósito de buscar una participación sustentada en principios técnicos y concertada con los diferentes actores, para lograr un mejor desarrollo de la agricultura nacional. En el noveno caso de éxito se analiza el desarrollo y aplicación del proceso "biofermel", una fermentación láctica orientada al aprovechamiento eficiente de la melaza como alimento de ganado y uno de los bioprocesos mexicanos patentados más antiguos utilizados en el campo. Los dos siguientes casos exitosos están relacionados con problemas de contaminación a nivel nacional y los esfuerzos implementados para usar tecnología biológica para biorremediarlos. En el primero se analiza la experiencia en el desarrollo de la tecnología para el tratamiento de aguas residuales, y en el segundo, se presenta el desarrollo de bioprocesos para el tratamiento de aire contaminado emitido en fuentes fijas. Finalmente, en el último ejemplo de un caso exitoso se presenta el impacto de la ingeniería genética en el sector acuícola, a través del desarrollo del salmón transgénico, con el objetivo de mejorar la capacidad de producción de alimentos de origen acuícola.

FUNDAMENTOS Y CASOS EXITOSOS DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

1ª Sección

Fundamentos de la biotecnología moderna

Capítulo I

MOLÉCULAS INFORMACIONALES DE LA CÉLULA VIVA
ÁCIDOS NUCLEICOS Y PROTEÍNAS

F. G. Bolívar Zapata

La célula viva; componentes y funciones

Todos los seres vivos estamos integrados por una o más células, que conforman nuestro organismo. Los seres vivos más sencillos, los llamados procariontes, están constituidos por una sola célula, es decir son organismos unicelulares. Los demás, son organismos que se denominan eucariontes. Muchos de los eucariontes, tales como el hombre y las plantas, son organismos pluricelulares, aunque también hay eucariontes unicelulares, como la levadura (1).

Los procariontes, que incluyen a las bacterias y a las arqueas, son organismos sencillos en los cuales su material genético no se encuentra contenido por una membrana nuclear, como es el caso de los eucariontes, y por lo tanto el material genético está en contacto directo con el citoplasma celular. Los cromosomas bacterianos son relativamente sencillos, comparados con los de los ecuariontes, y para su duplicación no requieren de procesos de meiosis y mitosis que sí requieren los cromosomas de los organismos eucariontes (2) (figura I.1).

Las células procariontes están incluidas y delimitadas por membranas resistentes o semirrígidas, que les dan forma (esférica, cilíndrica, elongadas, etc.), les protege del exterior y controla el paso de materiales del exterior de la célula al citoplasma celular y viceversa. Las membranas están compuestas principalmente por lípidos y proteínas, y de hecho están formadas por dos capas, la interna y la externa.

El citoplasma bacteriano es una solución acuosa en el que se llevan a cabo las reacciones bioquímicas de la célula procarionte. Contiene al material genético, en la mayor parte de los casos un solo cromosoma —aun-

que hay procariontes con varios cromosomas—, a los ribosomas, al conjunto de proteínas —y entre ellas, enzimas involucradas en la síntesis del material genético y de las mismas proteínas— a otras macromoléculas biológicas (lípidos y carbohidratos), y al conjunto de moléculas involucradas en el metabolismo de la célula.

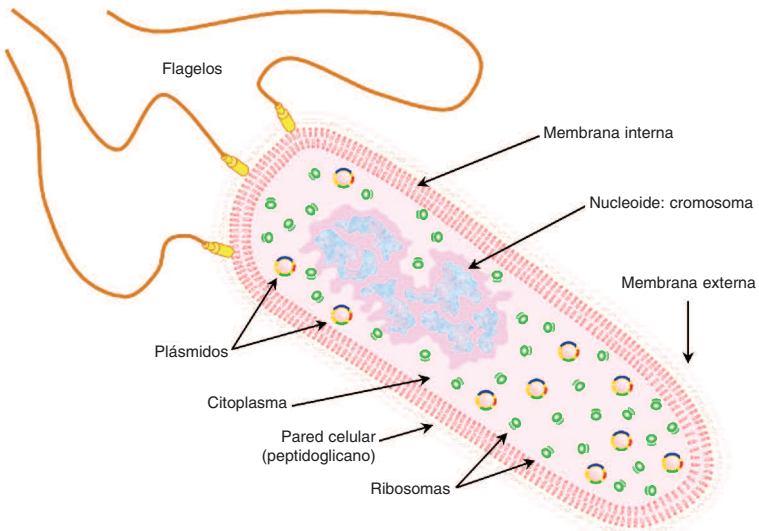


Figura I.1

ESQUEMA DE LA CÉLULA PROCARIONTE

La figura muestra la composición y organización de los elementos que integran la célula de los organismos procariontes.

Los ribosomas son estructuras esféricas compuestas de RNA y proteína, en los cuales se lleva a cabo la síntesis de proteínas, tal y como veremos más adelante. Cada ribosoma está compuesto por dos moléculas grandes de RNA ribosomal —llamadas 70S y 50S—, y varias moléculas más pequeñas de RNA, como el 5S. Además, cada ribosoma tiene del orden de 50 proteínas diferentes. La bacteria tiene varios cientos de ribosomas que se localizan en la parte interna de la membrana celular, para llevar a cabo la función de la síntesis de proteínas.

Las células eucariontes son células que tienen en promedio un tamaño de varios miles de veces mayor al de las células procariontes y cuya estructura, organización y complejidad es también mucho mayor que el de las bacterias (1) (figura I.2).

Las células de los organismos eucariontes tienen una membrana plasmática que las delimita pero que también permite la comunicación con las

otras células del organismo. Al igual que en los procariontes, la membrana está compuesta por lípidos y proteínas e incluye una gran cantidad de subestructuras y organelos celulares entre los que destacan los siguientes:

La mitocondria. Es el organelo celular responsable del proceso de la síntesis biológica del ATP (adenosin trifosfato), que es la molécula que provee la energía para la mayor parte de las recciones de biosíntesis en la célula. El ATP se sintetiza enzimáticamente mediante un proceso conocido con el nombre de fosforilación oxidativa. La mitocondria posee su propio material genético (que es un solo cromosoma), en donde reside la información para sintetizar muchas de las proteínas involucradas en este proceso. Muchos biólogos consideran que la mitocondria tuvo su origen en un procarionte primitivo, que se asoció en algún momento de la evolución, con el precursor de la célula eucarionte que hoy existe. Una célula eucarionte tiene del orden de 150 mitocondrias. Las células de las plantas, además de las mitocondrias, contienen también los cloroplastos, que son organelos involucrados en el proceso de la fotosíntesis. Los cloroplastos también contienen su propio material genético y también se

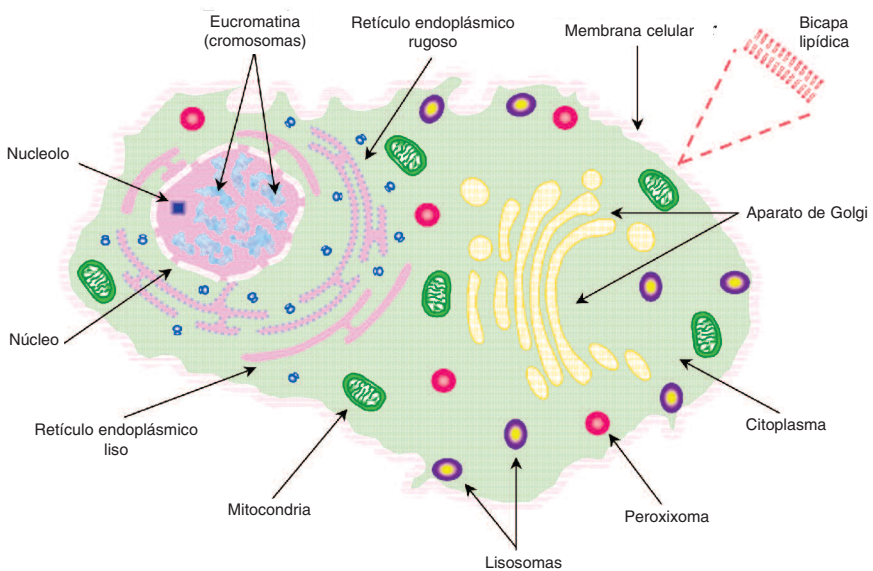


Figura I.2

ESQUEMA DE CÉLULA EUCARIONTE

La figura muestra la composición y la organización de los organelos celulares que integran las células de los eucariontes, que incluye a la especie humana.

cree que tienen un origen procarionte. El proceso de la fotosíntesis es fundamental para la vida en la Tierra, y permite fijar la energía solar a través de un pigmento conocido con el nombre de clorofila (que además es responsable del color de las plantas) y a través de este proceso generar también ATP, como molécula de alta energía, para llevar a cabo las funciones celulares.

El retículo endoplásmico. Es un organelo cuya función primaria es la de asociarse a los ribosomas para servir de soporte en la síntesis de las proteínas. Los ribosomas de las células eucariontes son similares a aquellos de los procariontes, aunque son de mayor tamaño y están asociados formando estructuras de varios cientos de ellos, llamados polirribosomas, donde se sintetizan las proteínas.

El aparato de Golgi. Es un organelo celular ligado al retículo endoplásmico, donde muchas de las proteínas (y otras macromoléculas) sintetizadas en el retículo, son incorporadas en el aparato de Golgi, que también es una estructura de origen membranal, y que permite exportar y procesar las proteínas sintetizadas. Otro tipo de organelo muy importante en la célula cuya función está involucrada en la degradación de los productos proteicos (y de otro tipo de metabolitos), son los llamados lisosomas, que son estructuras membranales que contienen enzimas con la capacidad de degradar macromoléculas biológicas.

El citoesqueleto celular. Es un organelo que está formado por microtúbulos y microfilamentos de proteínas estructurales como la actina, la miosina y la tubulina. Estas estructuras son las responsables de darle forma y organizar el citoplasma de la célula, dependiendo de la función de la célula y del tipo de estructuras celulares involucradas.

La diferencia más importante entre las células de los procariontes y los eucariontes radica en que estos últimos tienen sus cromosomas contenidos o aislados del resto de los organelos celulares, por una membrana nuclear, conformando lo que se conoce con el nombre del núcleo de la célula eucarionte. Como veremos más adelante, los cromosomas son las estructuras u organelos celulares en los que reside la información genética en las moléculas del ácido desoxirribonucleico o DNA. Los cromosomas son estructuras formadas por la asociación de DNA con proteínas y también con moléculas de ácido ribonucleico o RNA. Las proteínas y los RNAs asociados a los cromosomas llevan a cabo funciones reguladoras y estructurales; entre estas proteínas se encuentran las histonas. En el núcleo de la célula tal y como se verá en detalle, se lleva a cabo el proceso de transcripción del DNA en RNA, y el fenómeno del procesamiento del

RNA, para formar moléculas maduras de RNA mensajero, de transferencia y ribosomal. El fenómeno de procesamiento del RNA, adquiere día a día mayor importancia, y es responsable de la formación en muchos casos, de varias moléculas de RNA mensajero diferentes a partir de un solo gene, tal y como se verá más adelante.

Metabolismo celular

La célula viva utiliza o metaboliza diferentes compuestos o moléculas químicas, para llevar a cabo sus funciones. Por ejemplo, usa la glucosa (molécula formada por seis átomos de carbono), como fuente de átomos de carbono y de energía, para sintetizar las diferentes moléculas biológicas.

Para ello requiere degradar o "catabolizar" la glucosa, rompiéndola en diferentes componentes y generando así energía y moléculas de carbono más pequeñas; este proceso recibe el nombre de "catabolismo". A partir de estos productos y utilizando diferentes estrategias y herramientas, la célula sintetiza nuevas moléculas biológicas, tales como aminoácidos, nucleótidos y a partir de ellos macromoléculas biológicas, tales como proteínas y ácidos nucleicos (DNA y RNA); este tipo de proceso se conoce como "anabolismo".

La célula regula genética y enzimáticamente sus procesos de degradación y síntesis de moléculas biológicas. Todo este conjunto de reacciones y procesos de degradación/síntesis de compuestos biológicos, recibe el nombre de metabolismo celular (1), el cual será tratado con mayor amplitud en el capítulo octavo de este libro.

Los cromosomas son las estructuras celulares donde reside el material genético. El concepto de gene

En las células de todo organismo vivo tenemos dos grandes tipos de macromoléculas biológicas en las que reside la información genética y funcional, mediante la cual la célula viva lleva a cabo sus funciones. El primer tipo de macromoléculas informacionales son los ácidos nucleicos: el DNA y el RNA; el otro tipo de macromolécula informacional son las proteínas.

Hoy sabemos que el ácido desoxirribonucleico (el DNA), es la molécula biológica en la que reside la información genética en todos los seres

vivos y que esta molécula se encuentra formando parte de los cromosomas, que a su vez son estructuras que se localizan en el núcleo de las células de animales y vegetales.

En las células del cuerpo humano hay 23 pares de cromosomas. Cada cromosoma humano está formado por una sola molécula de DNA que mide aproximadamente entre dos a seis cm de largo (dependiendo del tamaño del cromosoma), la cual está asociada a muchos miles de moléculas de RNA y de proteínas, principalmente las llamadas histonas, cuya función principal es proporcionarle estructura al cromosoma. En todos y cada uno de nuestros trillones de células existen 23 pares de cromosomas (con excepción de las células gametos: espermatozoides y óvulos donde hay sólo 23 cromosomas); cada juego de 23 cromosomas previene originalmente de cada uno de nuestros padres (figura I.3).

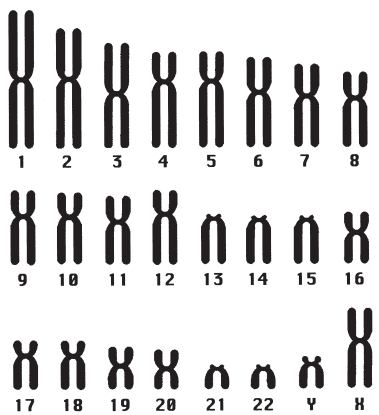


Figura I.3

ESQUEMA DE LOS CROMOSOMAS HUMANOS

La figura muestra los 22 cromosomas somáticos o autosómicos y los dos cromosomas sexuales Y y X humanos. En ellos se localizan entre veinte y veinticinco mil genes y marcadores genéticos humanos.

Gracias a los trabajos pioneros de Mendel (3), a mediados del siglo XIX y de Morgan (4) a principios del siglo pasado, hoy se conoce que en todos los seres vivos los genes son segmentos de la molécula de DNA presente en cada cromosoma y que los genes están organizados de una manera lineal en los cromosomas, análogamente al arreglo de los segmentos de una cinta que codifica para canciones en un casete musical,

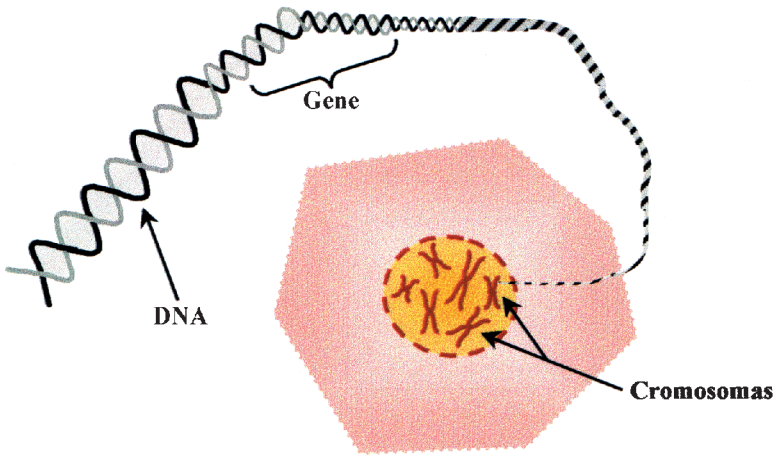


Figura I.4

COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LOS GENES EN LOS CROMOSOMAS

Los cromosomas son estructuras celulares que se encuentran localizados en el núcleo de las células y están formados por proteínas y ácido desoxirribonucleico (DNA). La información genética reside en el DNA y los genes son segmentos específicos de esta cinta genética llamada DNA. Es importante recalcar que cada ser vivo tiene un número específico y diferente de cromosomas, con relación a los demás organismos vivos.

donde cada gene es un segmento de la cinta del DNA que codifica para una molécula específica de proteína o para una molécula específica de RNA que no se traduce en proteína (figura I.4).

Los genes que codifican para proteínas son secuencias del DNA que se transcriben en moléculas específicas de RNA llamadas RNA mensajeros (mRNA). Posteriormente, estos RNA mensajeros, se traducen en los ribosomas de las células y a partir de la secuencia de los nucleótidos del mRNA se sintentiza la proteína específica codificada por ese RNA mensajero que es copia de un gene específico. Los detalles de estos procesos de transcripción y de traducción se explican un poco más adelante.

Un gene, como se ha señalado, puede codificar para un RNA que no se traduce en proteína sino que funciona como RNA directamente. Ejemplos de estos RNAs son los que integran los ribosomas y los RNAs de transferencia que juegan papeles específicos e indispensables en la síntesis de proteínas en la célula. Además, hay un gran número de RNAs de tamaño pequeño (snRNA, microRNA, iRNA y otros) que juegan papeles importantes en otras funciones celulares.

Recapitulando, hay dos tipos de genes: los que sus transcritos de RNA se traducen en proteínas y los que sus transcritos no se traducen en proteínas. Se ha demostrado que los genes son responsables de las características físicas de los individuos y se transmiten como parte de los cromosomas de padres a hijos conforme a reglas predecibles (3, 4 y 5). A lo largo de este libro en general, cuando se habla de genes se habla del tipo de genes que codifican para proteínas, a menos que se señale que son genes que codifican para RNAs que no se traducen.

Más adelante, se comentan con mayor detalle las funciones de los RNAs que no se traducen en proteínas. Sin embargo, antes es importante hablar de la estructura y de la función de la molécula de DNA donde residen los genes y de los mecanismos de transcripción de DNA en RNA y de traducción del RNA mensajero en proteínas.

La estructura del DNA

El trabajo de Griffith en 1928 y posteriormente el de los investigado-

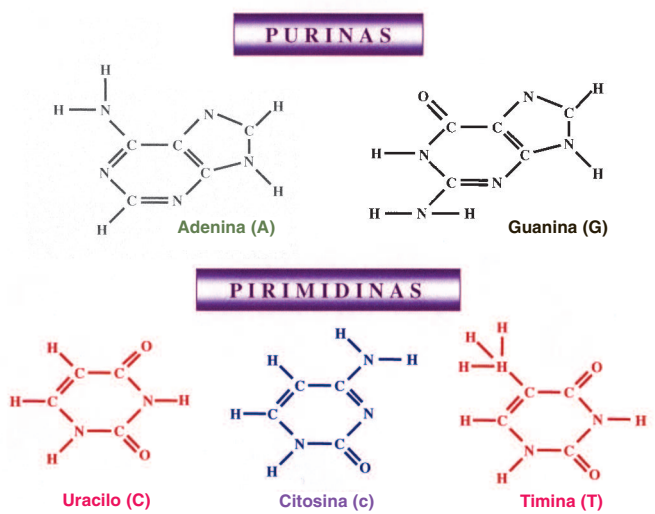


Figura I.5

ESTRUCTURA DEL DNA: LAS BASES O LETRAS GENÉTICAS PRESENTES EN LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Las bases guanina (G), adenina (A) y citosina (C) existen en el DNA y el RNA. La timina (T) sólo se encuentra en el DNA y es sustituida por el uracilo (U) en el RNA. Estas bases, o letras genéticas, están unidas covalentemente al azúcar desoxirribosa, para formar así los nucleótidos o monómeros del DNA (ver figuras I.6 y I.7).

res ingleses Avery, McLeod y MacCarty, a mediados del siglo pasado, permitieron demostrar conclusivamente, que el tipo de molécula biológica en la cual reside la información genética, es el ácido desoxirribonucleico y no las proteínas (6, 7). Esta contribución extraordinaria, dio lugar a que un importante esfuerzo científico se enfocara en ese momento, a determinar la composición y la estructura química de la molécula del DNA. Así, en 1951, el trabajo de Chargaff permitió determinar las cantidades relativas de adenina, timina, guanina y citosina, las cuatro letras del alfabeto genético de todo ser vivo (figura I.5), y demostrar que en cualquier DNA de cualquier organismo la cantidad molar de adenina es siempre igual a la de timina y también que la cantidad de citosina es la misma que de guanina (8), (figura I.6). El reporte de Avery y colaboradores indu-

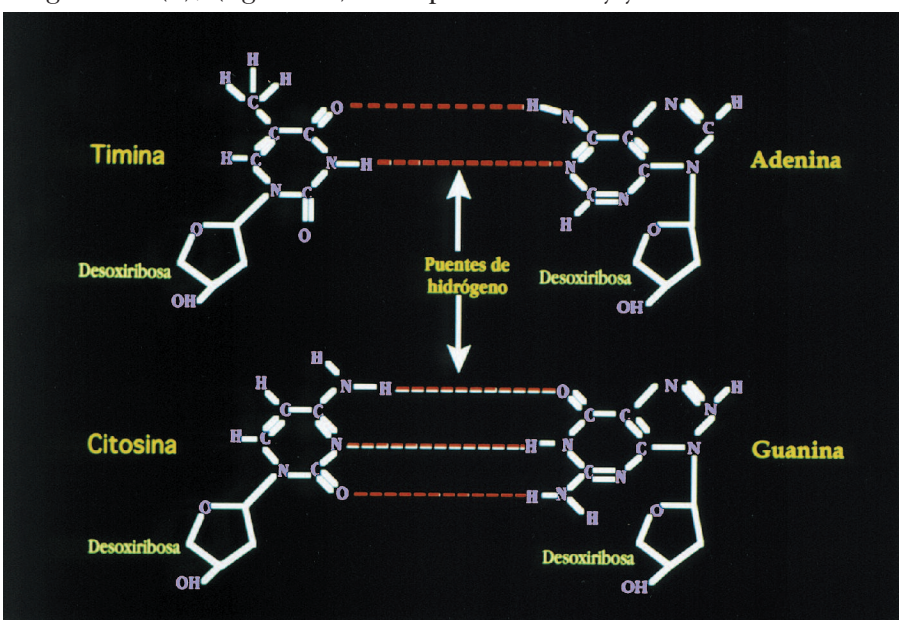


Figura I.6
ESTRUCTURA DEL DNA: APAREAMIENTO ENTRE BASES COMPLEMENTARIAS

El DNA está formado por dos hebras o cadenas complementarias (ver figura 7). Las dos hebras permanecen unidas entre sí a través de las uniones químicas débiles (tipo puente de hidrógeno), que se establecen entre cada dos nucleótidos complementarios. Lo anterior significa que en una molécula de DNA, siempre habrá la misma cantidad de adenina (A) que de timina (T) y la misma de citosina (C) que de guanina (G), tal y como fue demostrado por Chargaff.
En la figura se muestran las uniones tipo puente de hidrógeno que se forman entre los pares de bases complementarios T=A y C≡G.

dablemente fue también el estímulo para que Franklin y Wilkins (9, 10) iniciaran estudios sobre las propiedades físicas del DNA, que permitieron realizar la observación de que el DNA purificado y cristalizado era capaz de generar patrones de difracción de rayos X del tipo de un cristal, donde claramente aparecían ciertos elementos significativos que indicaban características de simetría en la estructura de esta molécula.

Considerando toda esta información, James Watson y Francis Crick realizaron en 1953 una de las contribuciones fundamentales a la biología moderna: el descubrimiento o desciframiento de la estructura molecular del DNA (11, 12) (figura I.7). Indudablemente, la estructura complementaria de la doble hélice del DNA y el descubrimiento de Avery y colaboradores, son los elementos que fundamentalmente demostraron que el DNA es en sí mismo el material genético de la célula viva.

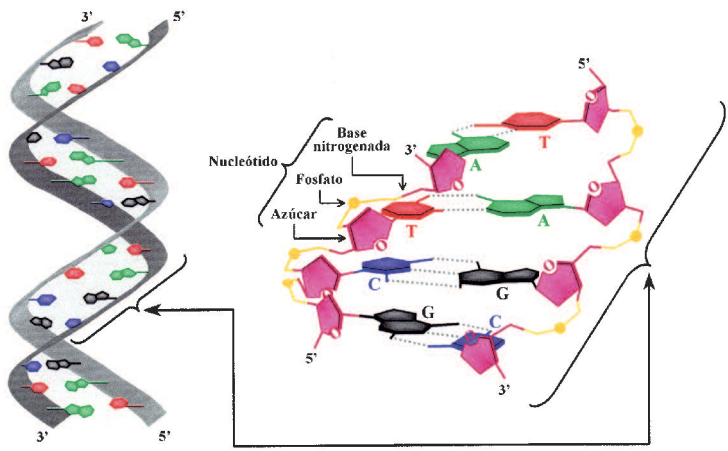


Figura I.7

ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA DEL DNA

El DNA es una doble hélice donde cada una de ellas es un polímero integrado por millones de nucleótidos que son los monómeros del polímero. Cada nucleótido está formado por una molécula de azúcar llamada desoxirribosa, una base púrica o pirimídica y un grupo fosfato. Las dos cadenas de DNA son antiparalelas y se unen entre sí a través de enlaces tipo "puentes de hidrógeno" que se forman entre las bases complementarias (A-T y G-C) entre las dos hebras del DNA. De esta manera se obtiene una estructura tipo doble hélice, donde las bases de los nucleótidos se encuentran orientadas hacia el interior de la doble hélice y los grupos fosfato, y las azúcares desoxirribosas, hacia su exterior, formando los esqueletos fosfodiester de cada hélice. Los pares de nucleótidos se encuentran separados entre sí por 3.4 Aº y cada diez pares de nucleótidos (34 Aº), se alcanza una vuelta de la hélice.

Hoy podemos decir, por lo que conocemos sobre el DNA, que el descubrimiento de su estructura química ha venido a ser uno de los elementos unificadores en la biología moderna ya que no sólo la estructura del DNA es la misma en todos los seres vivos, sino que, además, la organización y regulación de los genes, que son fragmentos o segmentos específicos de esta hélice doble, también tienen en lo general, carácter universal en todos los organismos vivos. Esta característica es lo que posteriormente, en 1973, permitió el nacimiento de la ingeniería genética, metodología mediante la cual es posible "la edición a nivel molecular" de este material, tal y como lo veremos en detalle más adelante en el capítulo IV. Podríamos decir, como analogía con las cintas de videocasete, que el material genético de todos los seres vivos tiene el mismo "formato", y que por ello se pueden "editar molecularmente" en un tubo de ensayo, DNAs de diferentes orígenes. Es relevante insistir en que la estructura general del DNA es exactamente la misma en todos los seres vivos, desde las bacterias hasta nosotros, es decir, el DNA es una doble hélice formada por dos polímeros antiparalelos y complementarios. Cada una de estas dos hélices o polímeros está, a su vez, integrada por miles de millones de nucleótidos, que son como las cuentas (monómeros), en un collar (polímero). Hay sólo cuatro tipos de monómeros o letras genéticas en el DNA de todos los seres vivos, los cuales son llamados nucleótidos y éstos están localizados a 3.4 Aº del siguiente monómero en el polímero que forma cada una de las dos hélices. Además, en todo tipo de DNA, a un nucleótido con la base adenina le corresponde siempre, en el nucleótido de la hebra o hélice complementaria, uno con la base timina, y a todo nucleótido con la base guanina corresponde un nucleótido con la base citosina en la hebra complementaria (figura I.7). Éstas son reglas universales para todos los DNAs en todos los seres vivos. La diferencia fundamental entre todas las moléculas de DNA que forman los diferentes cromosomas de los seres vivos, es la secuencia de los millones de estos cuatro tipos de nucleótidos con sus bases, A, T, G, C en cada molécula de DNA, de la misma manera en que sólo existen 28 letras en el alfabeto para formar todas las palabras, y es la secuencia diferente de estas letras lo que da un significado distinto a cada una de las palabras.

El DNA; su replicación y la síntesis de RNA y de proteínas

Habiéndose descifrado la estructura del DNA en 1953, los esfuerzos se concentran entonces en determinar los mecanismos moleculares que

tiene la célula para contender con tres aspectos biológicos fundamentales: a) la replicación de su material genético y su transferencia a las siguientes generaciones; b) la síntesis de proteínas a partir de la información genética que reside en el DNA y c) la expresión de los genes en los cromosomas.

Para 1975, se tenía claro que el DNA, gracias a su estructura de doble hélice, era capaz de dar lugar, mediante el fenómeno llamado de replicación propuesto también por Watson y Crick, a dos dobles hélices idénticas a partir de la doble hélice original. En este fenómeno, cada una de las cadenas de la hélice doble original sirve de molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria, tal y como fue demostrado por Meselson y Stahl, generándose así dos dobles hélices iguales, una de las cuales se transfiere a la progenie y la otra permanece en el organismo original (13, 14) (figura I.8).

Asimismo, gracias al trabajo pionero de Crick, Brenner, Niremberg y Ochoa entre otros, fue posible describir los mecanismos generales celulares involucrados en la decodificación de la información genética por la célula para dar lugar a la síntesis de proteínas, mediante la propuesta y comprobación de los mecanismos de transcripción del DNA en RNA mensajero y traducción de este RNA en proteína (15, 16, 17, 18, 19) (figura I.9).

El primer paso en la síntesis de proteínas, a partir de la información presente en los genes a nivel del DNA, es la síntesis o formación de una molécula de RNA mensajero, específica para cada gene, usando para ello como molde un segmento (un gene) de una de las dos cadenas del DNA (figuras I.9 y I.10). El RNA es una molécula químicamente muy parecida a una de las hebras del DNA ya que también está formado por cadenas lineales de nucleótidos, por lo que la información genética contenida en el DNA, es decir, el orden de deoxirribonucleótidos de una de las hélices del DNA, de uno o varios genes, se transfiere uno a uno, a una secuencia de ribonucleótidos complementaria en el proceso de la síntesis del RNA. Este proceso de "transcripción" o síntesis del RNA es un proceso enzimático mediado por la enzima RNA polimerasa que siempre ocurre, al igual que la replicación del DNA, en la dirección 5' a 3', y en la mayoría de los casos sólo una de las dos cadenas del DNA es transcrita en una molécula de RNA (figura I.10). La iniciación del proceso de transcripción se lleva a cabo en los sitios denominados promotores y este proceso está regulado finamente en la célula tal y como se verá más adelante.

En el caso de los procariontes que no tienen membrana nuclear, las moléculas de RNA mensajero que se transcriben de los genes que codifi-

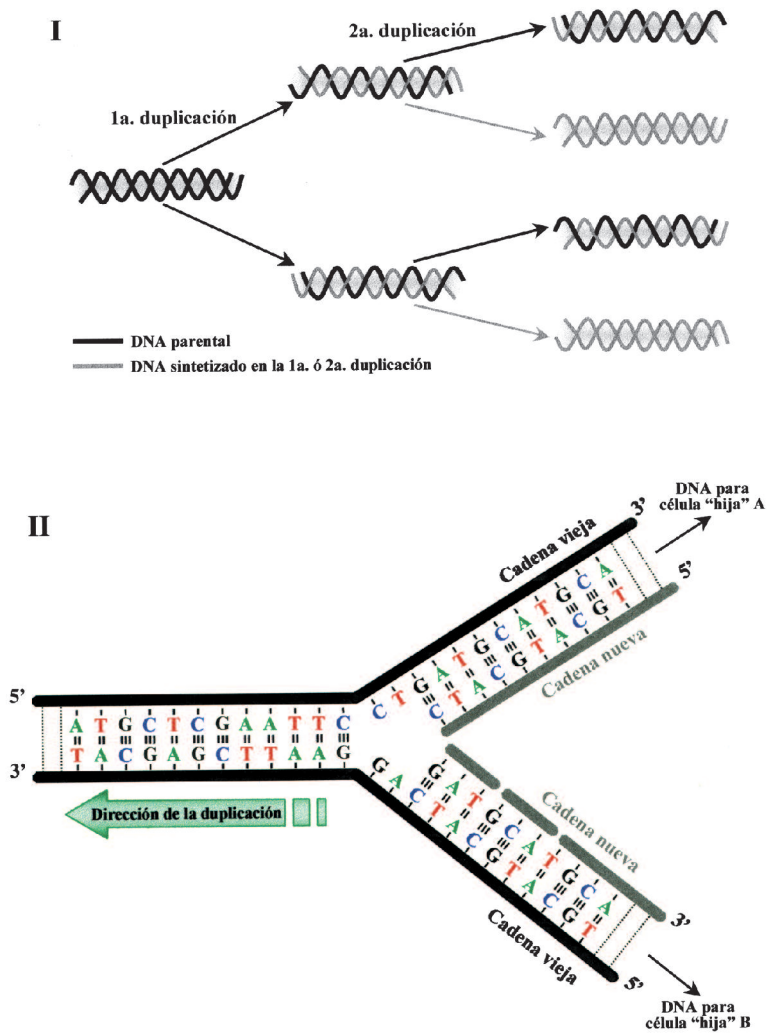


Figura I.8

REPLICACIÓN DEL DNA

La replicación del DNA es el fenómeno que permite el copiado de una doble hélice de DNA, para generar dos dobles hélices idénticas a la original.

La información genética contenida en las moléculas de DNA es perpetuada mediante la replicación. Durante este fenómeno, las dos cadenas se separan y cada una sirve de molde para sintetizar una nueva cadena complementaria. Este proceso tiene dos características intrínsecas: I) es "semiconservado", ya que cada una de las dos cadenas de la molécula original pasa intacta a cada una de las moléculas hijas, mientras que la otra cadena se sintetiza *de novo,* y II) siempre procede en la dirección 5' a 3'.

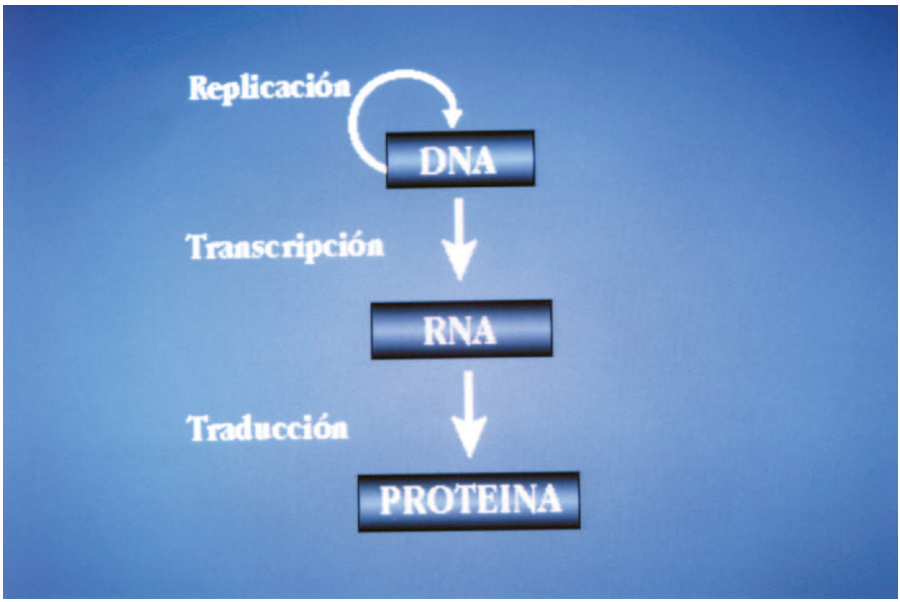


Figura I.9

EL DOGMA CENTRAL DE LA BIOLOGÍA

El dogma central de la biología molecular indica el flujo de la información genética. En el DNA se encuentran los genes, en todas las células de los organismos vivos. A partir de la información localizada en esta molécula de doble hélice, una célula sintetiza todas sus proteínas. Esto se lleva a cabo mediante dos mecanismos: la transcripción, que es la síntesis de moléculas de RNA usando regiones específicas o genes del DNA como templado o molde, y la traducción, que es la síntesis de proteínas a través de la "lectura" de las moléculas del RNA mensajero en los ribosomas. Además el DNA, como ya se ha mencionado, tiene la función de autorreplicarse.

can para proteínas, son inmediatamente traducidas a nivel de los ribosomas para sintetizar las proteínas (figuras I.10 y I.12). Sin embargo, en el caso de los eucariontes que sí tienen membrana nuclear, los RNA transcritos a partir de los genes, deben ser transportados del núcleo al citoplasma, a través de esta membrana. Además, es importante señalar como veremos en detalle en el capítulo III, que a diferencia de las bacterias, los genes que codifican para proteínas de los eucariontes contienen las estructuras llamadas "intrones". Estas estructuras, que son también DNA, están interrumpiendo las regiones del gene que codifican para la proteína y que son llamadas "exones". Como resultado de esta situación al sintetizarse RNA a partir de un gene durante el proceso de transcripción, la molécula de RNA resultante incluye tanto las regiones de los intrones

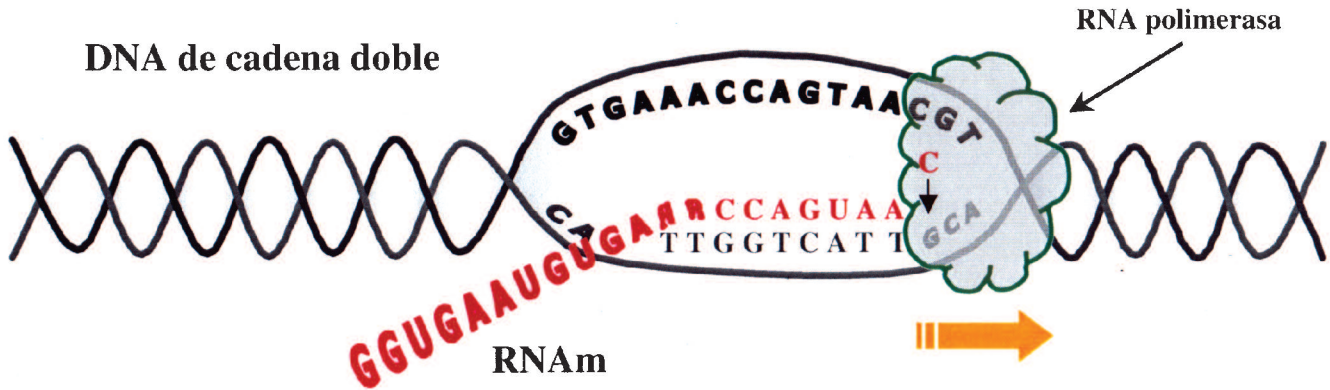


Figura I.10

EL FENÓMENO DE LA TRANSCRIPCIÓN PERMITE LA SÍNTESIS
DEL RNA A PARTIR DE LOS GENES

Las moléculas de RNA (se muestra como cinta roja), son transcritas o producidas por la enzima RNA polimerasa a partir de regiones específicas de material genético (que contienen uno o varios genes), utilizando como molde una de las dos cadenas del DNA (ver figura I.8). Las moléculas de RNA son polímeros lineales de centenas de cuatro tipos diferentes de nucleótidos: A, G, C y U, en donde la diferencia primaria con el DNA es que el uracilo (U) es utilizado en lugar de la timina (T), durante su síntesis. Todas las moléculas de RNA mensajero, que son intermediarios en la síntesis de las proteínas, son exportadas del núcleo en el caso de las células eucariontes, y luego en el citoplasma celular son leídas y su información es utilizada para sintetizar proteínas (ver figura I.12). Cada molécula de RNA mensajero es recipiente de la información para sintetizar una o varias proteínas específicas.

Aminoácidos:

- Alanina	Ala	A	- Leucina	Leu	L
- Arginina	Arg	R	- Lisina	Lys	K
- Asparagina	Asn	N	- Metionina	Met	M
- Ac. aspártico	Asp	C	- Prolina	Pro	P
- Cisteína	Cys	D	- Serina	Ser	S
- Fenilalanina	Phe	F	- Tirosina	Tyr	Y
- Glicina	Gly	G	- Treonina	Thr	T
- Ac. Glutámico	Gln	Q	- Triptófano	Trp	W
- Glutamina	Glu	E	- Valina	Val	V
- Histidina	His	H	- Terminación de		
- Isoleucina	Ile	I	la traducción	fin	

Nucleótidos:

- Guanina	G
- Adenina	A
- Timina	T
- Citosina	C

NUCLEÓTIDO EN SEGUNDA POSICIÓN

NUCLEÓTIDO EN PRIMERA POSICIÓN	G	A	T	C	NUCLEÓTIDO EN TERCERA POSICIÓN
G	GGG, GGA, GGT, GGC → Gly	GAG, GAA → Glu; GAT, GAC → Asp	GTG, GTA, GTT, GTC → Val	GCG, GCA, GCT, GCC → Ala	G, A, T, C
A	AGG, AGA → Arg; AGT, AGC → Ser	AAG, AAA → Lys; AAT, AAC → Asn	ATG → Met; ATA, ATT, ATC → Ile	ACG, ACA, ACT, ACC → Thr	G, A, T, C
T	TGG → Trp; TGA → fin; TGT, TGC → Cys	TAG, TAA → fin; TAT, TAC → Tyr	TTG, TTA → Leu; TTT, TTC → Phe	TCG, TCA, TCT, TCC → Ser	G, A, T, C
C	CGG, CGA, CGT, CGC → Arg	CAG, CAA → Gln; CAT, CAC → His	CTG, CTA, CTT, CTC → Leu	CCG, CCA, CCT, CCC → Pro	G, A, T, C

como la de los exones. Hoy sabemos y se verá en detalle en el capítulo III, que las moléculas de RNA mensajero, que llevan intrones y exones, resultantes del proceso de transcripción que se lleva a cabo en los núcleos de las células de los eucariontes, deben ser "procesadas" para dar lugar a las moléculas de los RNA mensajeros maduras, más pequeñas, que son exportadas del núcleo de la célula al citoplasma, donde son luego traducidas en proteínas (ver figuras I.12 y III. 1)

Existen muchos genes en la célula que no codifican para proteína y cuyos transcritos de RNA son indispensables para el proceso de la traducción de los RNA mensajeros en los ribosomas. Entre estos genes están los que codifican para los RNAs que integran las dos subunidades (grande y pequeña) de los ribosomas (rRNA). Los genes que codifican para estas dos moléculas de RNA se transcriben constantemente en la célula y sus

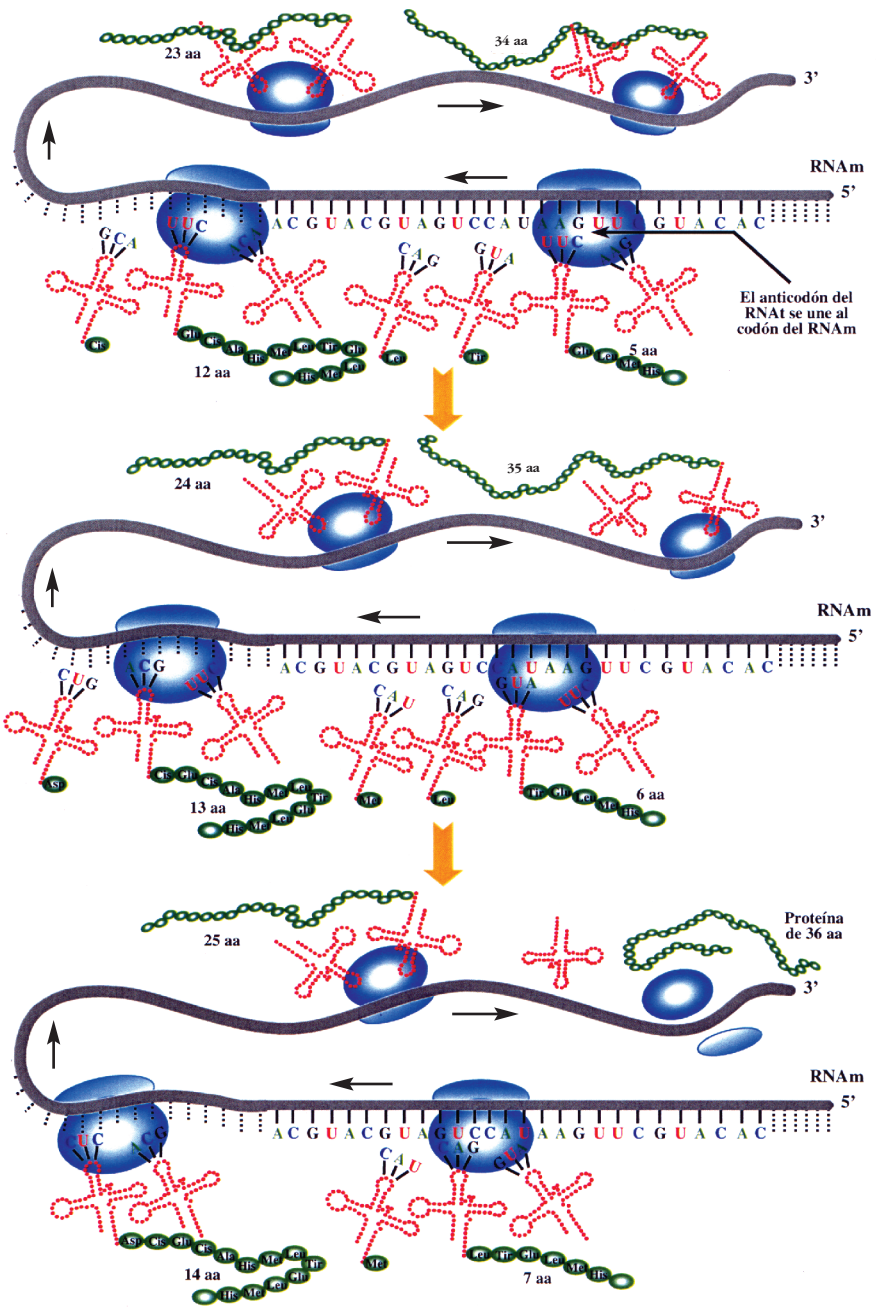
Figura I.11

EL CÓDIGO GENÉTICO ES UNIVERSAL

El código genético es universal, es decir, es utilizado de la misma manera en todos los seres vivos. Este código es el que permite a la célula de cualquier organismo traducir en proteínas la información genética almacenada en los genes que codifican para proteínas que se localizan en el DNA, mediante la lectura, en bloques de tres nucleótidos (tripletes o codones) de la información genética presente en el RNA mensajero. Las proteínas son polímeros o grandes collares biológicos de decenas o centenas de aminoácidos, en las cuales cada aminoácido (o cuenta del collar) es un monómero (ver figuras I.12 y I.16). Son veinte diferentes aminoácidos con los que cuenta la célula para integrar las más de cien mil proteínas del cuerpo humano. Se puede hacer una analogía entre letras del alfabeto que serían los aminoácidos, y las palabras que serían las proteínas; el orden de las letras es responsable del significado de las palabras, de la misma manera que el orden de los aminoácidos en la proteína es responsable de su significado o función biológica.

Cada uno de los veinte diferentes aminoácidos está codificado por un triplete o codón, de tres nucleótidos, a nivel del RNA mensajero. El RNA mensajero es, pues, una molécula formada por una secuencia de nucleótidos. Esta información es traducida en proteínas al ser leídos estos nucleótidos, de tres en tres, por los ribosomas tal y como se muestran en la figura I.12.

En un código de cuatro letras genéticas (AGCT) organizado en tripletes, puede haber 64 diferentes tripletes y la figura muestra estas 64 posibles combinaciones. Como puede verse, hay aminoácidos que están codificados hasta por seis diferentes tripletes, como leucina (leu), y hay aminoácidos como triptofano (trp), que sólo está codificado por un solo triplete (en este caso TGG). Existe un codón ATG, que codifica para metionina y que es el codón o triplete, con el que se inicia la síntesis de la mayor parte de las proteínas; existen también tres codones TGA, TAA y TAG, que son tripletes que al leerse en los ribosomas son responsables de que finalice el proceso de traducción; esto es, se termina en este punto la síntesis de una molécula de proteínas y ésta se libera de los ribosomas para ser utilizada por la célula de acuerdo con su función biológica (ver figuras I.12 y I.13).


23 aa
34 aa
3'
RNAm
5'
El anticodón del RNAt se une al codón del RNAm
12 aa
5 aa
24 aa
35 aa
3'
RNAm
5'
13 aa
6 aa
25 aa
Proteína de 36 aa
3'
RNAm
5'
14 aa
7 aa

productos de rRNA se asocian a proteínas para integrar los ribosomas, que es el sitio celular, como se ha señalado, donde se sintetizan las proteínas (figura I.12). Además, los varios RNAs de transferencia (tRNA) son también codificados cada uno por un gene. Estos RNAs como los RNA ribosomales no codifican para proteínas, sino que son usados por la célula como RNAs, y sirven los tRNAs como adaptadores específicos para los veinte diferentes aminoácidos durante el ordenamiento lineal de éstos en la síntesis de las proteínas a partir de la secuencia de nucleótidos del RNA-mensajero (figura I.12).

Figura I.12

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS: EL RNA MENSAJERO Y SU TRADUCCIÓN EN LOS RIBOSOMAS

El RNA mensajero (RNAm) que se muestra en la figura (como una cinta café), es el intermediario en la síntesis de proteínas (que se muestran como collares con cuentas verdes). El RNA mensajero al ser copia del DNA, lleva la información genética de los genes hacia los ribosomas, donde ésta es traducida en proteína. Las cadenas polipeptídicas o proteínas, son sintetizadas cuando los ribosomas (estructuras azules) se mueven leyendo, como una cabeza de grabadora o lectora de cintas, sobre las moléculas de RNAm, donde el extremo 5' del RNAm es leído o traducido primero. Una sola molécula de RNA mensajero normalmente es utilizada por la célula para sintetizar varias moléculas de la misma proteína, al leerse simultáneamente por varios ribosomas, como los cuatro que se muestran en la figura y se sintetizan simultáneamente cuatro cadenas de la misma proteína en este ejemplo.

Durante el proceso de lectura del RNA mensajero por los ribosomas, los codones o tripletes del RNAm se asocian con los anticodones complementarios de los RNA de transferencia (estructuras rojas), que a su vez se encuentran "cargados" con los aminoácidos respectivos de acuerdo con el código genético (figura I. 11). Inmediatamente ocurre un proceso de transferencia del aminoácido que llega y que así se incorpora a la cadena de proteína naciente compuesta por varios aminoácidos previamente unidos entre sí. En la primera sección de la figura se muestra a los cuatro ribosomas en los cuales ya se ha iniciado la síntesis de las proteínas y se han formado cuatro pequeñas proteínas con 5, 12, 23 y 34 residuos de aminoácidos cada una, que se ven como cuentas de los collares. En la segunda sección de la figura se muestra cómo ha ocurrido el proceso de crecimiento o elongación de los collares de aminoácidos que integran las proteínas; en todas ellas, el tamaño del collar ha crecido en un aminoácido adicional (6, 13, 24 y 35aa). Finalmente en la tercera sección de la figura, el proceso de elongación ha permitido la incorporación de un aminoácido adicional en cada una de las cadenas de proteínas nacientes (7, 14, 25 y 36aa).

De esta manera se lleva a cabo la elongación de los polímeros y con ello la síntesis de las proteínas completas (en este caso de 36 aminoácidos), la cual se libera del ribosoma al terminarse la lectura del mensajero, tal y como se muestra en esta última sección de la figura y liberándose también el ribosoma que participó en este proceso particular, al llegar al final de la lectura del RNAm.

Además de los ácidos nucléicos RNA y DNA, las proteínas son el otro tipo de moléculas biológicas informacionales que tenemos en nuestro organismo y en ellas se encuentra la información que les permite realizar la mayor parte de las funciones y los trabajos celulares tal y como veremos más adelante. El DNA es una molécula, que es el resultado de polimerizar (unir en forma de collar), varios millones de los cuatro diferentes nucleótidos (A, G, C y T); las proteínas también son polímeros biológicos que están constituidos por decenas o centenas de veinte tipos diferentes de monómeros llamados aminoácidos. Por esta razón, no puede haber correspondencia de un aminoácido por cada uno de los nucleótidos que integran los genes que codifican para proteína y la consecuencia es que cada uno de los muchos aminoácidos que integran una proteína debe estar "codificado" por un grupo de nucleótidos. Al descifrar el código genético se comprobó, *de facto,* que cada aminoácido está codificado por un grupo de tres nucleótidos, al que se le denomina triplete o codón. Se determinó también que en varios casos, más de un triplete codifica para un mismo aminoácido y que algunos tripletes codifican para señales de terminación o iniciación para la síntesis proteica. Este código genético es universal ya que es el mismo para todos los seres vivos y se muestra en la figura I.11.

Como se ha señalado, la información genética contenida en cada molécula de RNAm, es traducida en moléculas de proteínas a través de un proceso enzimático que se realiza en los organelos celulares llamados ribosomas. En este mecanismo biosintético llamado "traducción" como se ha mencionado, participan principalmente tres tipos distintos de RNA: el RNA ribosomal (rRNA), que forma los ribosomas; el RNAm, que acarrea la información genética contenida en segmentos específicos (genes) del DNA y finalmente, los RNAs de transferencia (tRNA) (figura I.12). La síntesis de proteínas, que *de facto* es la traducción de la secuencia de nucleótidos presentes en el RNAm, se lleva cabo también en dirección 5' a 3', mediante la polimerización de aminoácidos en proteínas, a nivel de los ribosomas en donde la secuencia del RNAm, se lee de tres en tres nucleótidos de acuerdo con el código genético, incorporando en cada paso de lectura un aminoácido de la proteína, tal y como se puede ver en la figura 1.12. Este proceso es similar al que ocurre al pasar una cinta de un casete musical en una grabadora, en donde la información para cada canción, que está contenida en un segmento de esta cinta, es traducida en melodía cuando esta sección de la cinta del casete pasa a través de las cabezas lectoras de la grabadora. En el caso de la célula viva, la cinta

corresponde al RNA mensajero que lleva la información y los ribosomas corresponden a las cabezas de la grabadora que leen la cinta y transforma (traduce) la información en proteínas, las cuales serían en analogía, las "melodías o canciones biológicas".

Mutación

La información genética contenida en el DNA es susceptible de sufrir cambios, los cuales se denominan mutaciones. Las mutaciones son causa de cambios que se heredan y, también, por ello, de la predisposición a enfermedades como veremos más adelante. Se sabe que todos los organismos experimentan mutaciones en su DNA debido a factores ambientales, tales como la radiación solar, interacción con productos químicos o infecciones virales y también como resultado de errores cometidos al replicar el DNA. Son varios los tipos de cambios que puede sufrir el DNA, y éstos pueden alterar desde un solo nucleótido, hasta cromosomas completos (figura I.13). Alteraciones en la secuencia de los nucleótidos de un gene pueden ocasionar un cambio en la fase de lectura del gene, a nivel del RNA mensajero, y por ello generarse una proteína con su secuencia de aminoácidos diferente, la cual ya no sea capaz de realizar su función original. Sin embargo, puede haber cambios en la secuencia del DNA que no afecten el funcionamiento de la proteína o de un RNA que no se traduce codificado por el gene particular (figura I.14). Estos cambios son responsables de la aparición de los llamados "polimorfismos genéticos" en los genes de la especie humana, tal y como se verá más adelante.

Las proteínas; su estructura y función biológica

Como ha sido señalado, las proteínas son moléculas biológicas informacionales, pero a diferencia del DNA, que es la molécula en donde reside la información genética para sintetizar las proteínas, éstas son las herramientas que tienen las células para llevar a cabo la mayor parte de sus funciones; en otras palabras, en las proteínas reside la información funcional de la célula. Ejemplos de estas proteínas son los siguientes: la insulina que es una proteína que regula el nivel de azúcar en la sangre; la hemoglobina, que transporta en los glóbulos rojos el oxígeno de los pulmones a todas las células del organismo; la tripsina, que es una proteína que trabaja en nuestro aparato digestivo para digerir otras proteí-

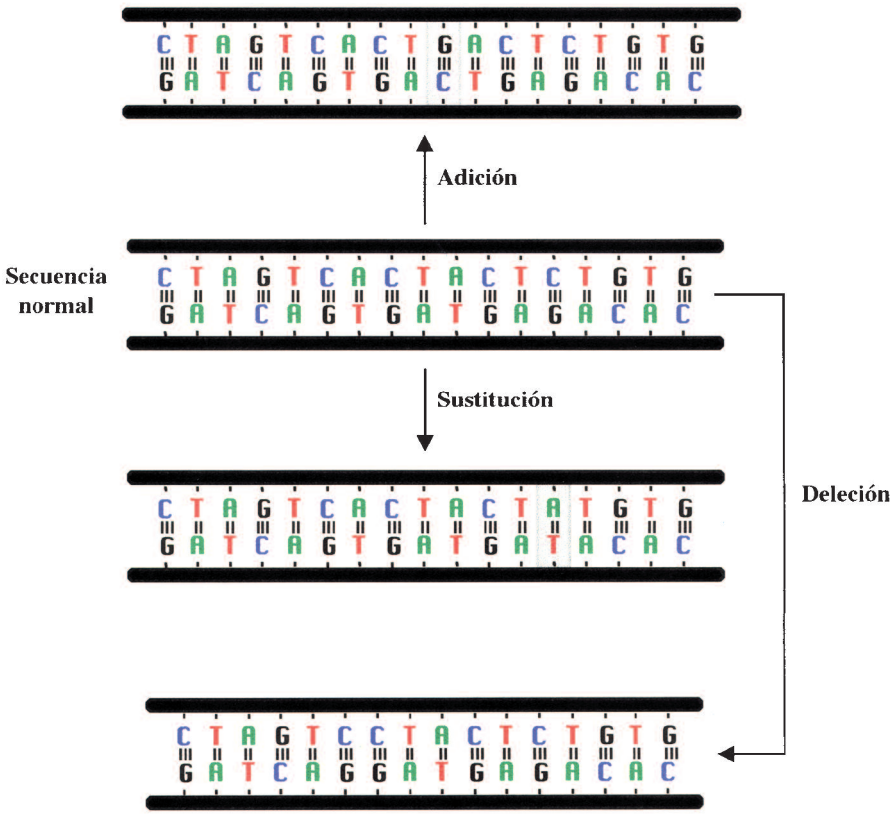


Figura I.13

TIPOS DE MUTACIÓN

La figura muestra los diferentes tipos de mutaciones que pueden ocurrir para cambiar la secuencia original de nucleótidos en cualquier molécula de DNA: a) sustitución, b) adición y c) deleción. En la figura se muestra el efecto de la sustitución, adición y deleción de un par de nucleótidos; sin embargo, las adiciones o deleciones pueden involucrar uno o muchos pares de nucleótidos.

Al cambiar la secuencia de nucleótidos de un gene, puede tener resultados diversos sobre el producto peptídico o proteína para la que codifica. Si el cambio es sólo de un par de nucleótidos, en muchos casos no hay efecto en la actividad de la proteína. Sin embargo, en algunos casos este cambio sí afecta la función biológica.

Los cambios en los genes, debido a las mutaciones, son elemento fundamental en el proceso de la evolución de los seres vivos, ya que permiten el fenómeno de la variabilidad genética y biológica.

nas provenientes de otros organismos y que forman parte de nuestro alimento. Como estas tres proteínas, existen al menos cien mil en nuestro organismo, y gracias a ellas y a la información funcional específica en cada una de ellas, el organismo y sus diferentes órganos, tejidos y células, llevan a cabo sus tareas. Como se ha mencionado, las proteínas son polímeros biológicos que están constituidos por decenas o centenas de vein-

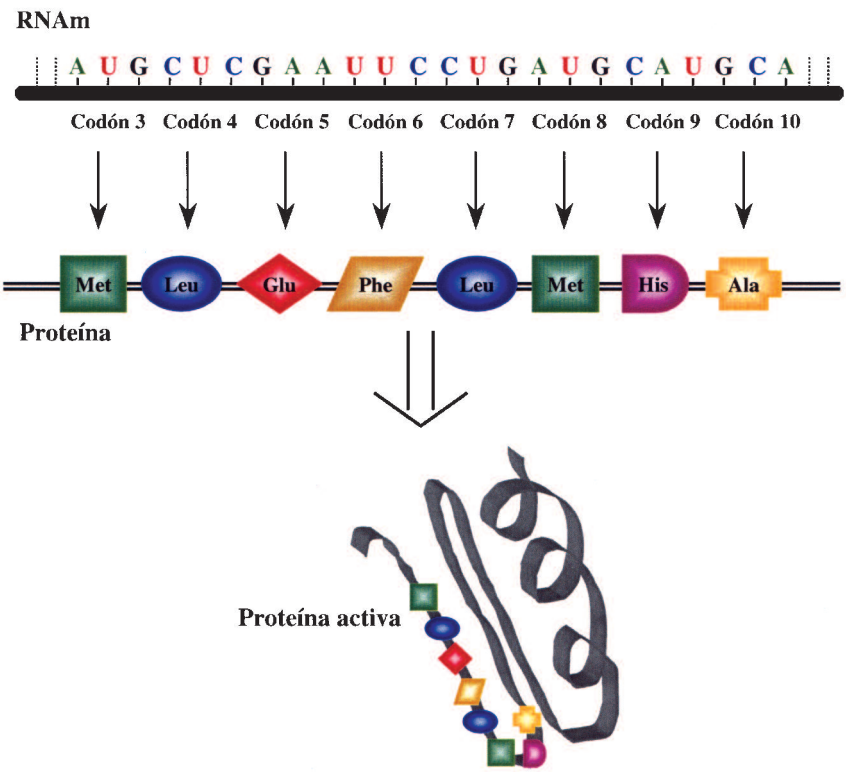


Figura I.14

COLINEARIDAD ENTRE EL RNA MENSAJERO
Y EL PRODUCTO PROTEICO

La secuencia de los nucleótidos en el gene es responsable de la secuencia de los nucleótidos del RNA mensajero. Este orden, en particular el de cada tres nucleótidos, a su vez, de la secuencia de los aminoácidos en la proteína codificada por el gene particular. La estructura final de la proteína depende del orden, a nivel primario, es decir de la secuencia de los aminoácidos que la integran (ver figura I.15). Si este orden se altera, la función de la proteína puede también alterarse. Las mutaciones o cambios que ocurren en un gene pueden dar lugar a su vez a cambios en los aminoácidos en la proteína que se obtiene a partir de dicho gene.

te tipos de monómeros diferentes llamados aminoácidos. Cada proteína tiene una secuencia específica de aminoácidos dada por la secuencia de nucleótidos del gene que la codifica y esta secuencia es la que se conoce como la estructura primaria de la proteína (1) (figura I.15). Gracias a esta

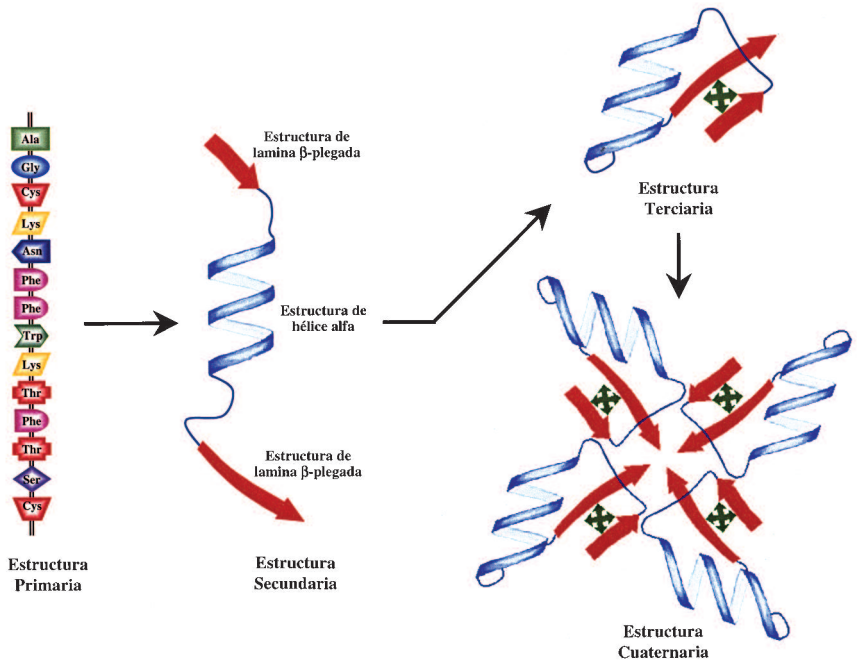


Figura I.15

PROTEÍNAS; ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Las proteínas son las herramientas que tiene la célula viva para llevar a cabo la mayor parte de sus funciones. La función de cada proteína es específica y está determinada por la estructura tridimensional de la propia proteína. Las proteínas son polímeros o cadenas de varias decenas o centenas de aminoácidos que son los monómeros de este tipo de polímero biológico. La estructura tridimensional (terciaria y cuaternaria) de cada proteína, está determinada por la estructura primaria, que es en realidad la secuencia de aminoácidos de la proteína.

En cada proteína existen regiones de este polímero que pueden organizarse, en lo que se conoce como estructuras secundarias, del tipo α hélice o β plegada. A partir de este tipo de doblamientos, la proteína adquiere su estructura terciaria. Finalmente, la estructura cuaternaria de las proteínas es el resultado de asociar varias proteínas ya estructuradas a nivel terciario, lo que les permite un arreglo espacial multipolimérico para llevar a cabo sus funciones.

secuencia primaria, la proteína puede adquirir una estructura secundaria que puede ser fundamentalmente de dos tipos: α hélice o β plegada. Las estructuras secundarias, a su vez, permiten el doblamiento de las proteínas en estructuras terciarias y finalmente, las estructuras terciarias permiten la asociación de varias moléculas de proteínas en lo que se conoce como estructura cuaternaria, tal y como se aprecia en la figura I.15. La estructura o conformación espacial de cualquier proteína, es lo que le permite tener una función biológica particular a esa proteína; todas las proteínas tienen estructuras específicas y por ende funciones específicas en la célula viva (1).

Regulación de la expresión de los genes

Simultáneamente a los trabajos encaminados a determinar los mecanismos involucrados en la traducción del RNA mensajero en proteínas, se inician esfuerzos dirigidos a comprender la regulación de la expresión de los genes, es decir, mediante qué sensores y mecanismos las células deciden expresar o transcribir un gene particular, para que así pueda sintetizarse el producto de transcripción codificado por ese gene (1, 2).

Los mecanismos que regulan la expresión de la información genética de una bacteria permiten a ésta adaptarse con rapidez a los cambios del medio ambiente. Al evolucionar los organismos y diferenciarse las células, aparecieron mecanismos regulatorios más sofisticados que permiten a los organismos multicelulares más complejos disponer de un conjunto más amplio de respuestas diferentes con miras a la sobrevivencia y evolución.

En principio, los genes funcionan, se expresan o se transcriben, únicamente cuando el organismo lo requiere, proveyendo así el producto para el cual codifican y sólo en aquellas células que lo requieren. En general, hay dos tipos de regulación genética: las llamadas positiva y negativa; cuando la expresión de los genes es aumentada cuantitativamente, la regulación es positiva, en tanto que si dicha expresión es disminuida, entonces la regulación es negativa. Los elementos que participan en el control de ambos tipos de regulación son proteínas y RNA que reconocen secuencias específicas en el DNA, en regiones cercanas a los genes que regulan. Además, en algunos casos, las secuencias de nucleótidos en el DNA son capaces de modular por sí mismas la expresión de los genes. Esta etapa de la genética se inicia en 1960, gracias a los esfuer-

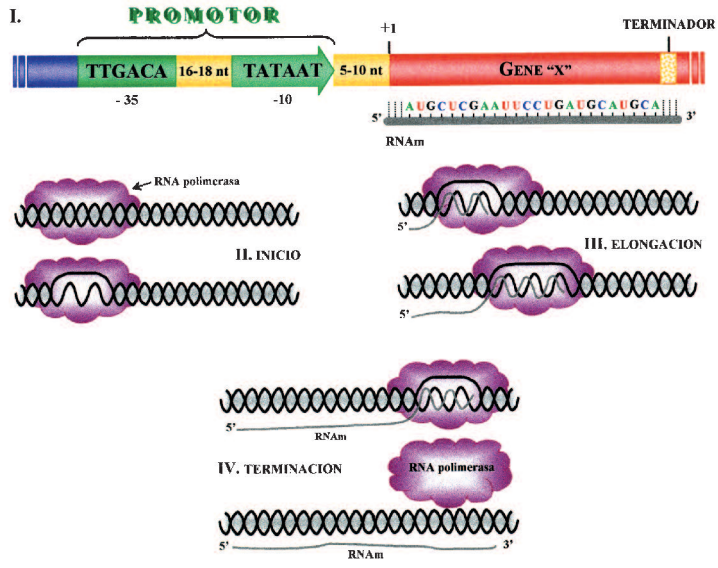


Figura I.16

TRANSCRIPCIÓN Y ELEMENTOS DE CONTROL GENÉTICO

En el DNA hay regiones específicas que regulan la expresión de los genes, es decir, que regulan y permiten la síntesis del RNA a partir de ese gene. Una de estas regiones es la del promotor (I). El promotor es una región de DNA localizada en uno de los extremos del gene que es reconocida por la enzima RNA polimerasa para, a partir de ahí, iniciar la síntesis de la molécula de RNA, la cual posteriormente es traducida en proteína (ver figuras I.10 y I. 12). La región de los promotores en los organismos procariontes es un fragmento de aproximadamente veinticinco pares de nucleótidos que contiene dos conjuntos denominados regiones de -10 y -35. Estas regiones son altamente conservadas en los promotores bacterianos. La síntesis de RNAm inicia en bacterias en la posición +1, es decir, 10 pares de nucleótidos después de la región -10. Cuando ocurren mutaciones en las regiones -10 o -35, la enzima RNA polimerasa ya no es capaz de reconocer, con la misma eficiencia, esta región del promotor; en esos casos puede cancelarse la síntesis de RNAm.

zos de los investigadores franceses Jacob y Monod (20), los cuales son complementados por Gilbert y Ptashne (21, 22), quienes fueron responsables del aislamiento de los primeros represores genéticos. Estos investigadores demostraron que estos reguladores eran proteínas. El aislamiento y caracterización de estos primeros represores genéticos permitió demostrar su modo de acción, lo cual, como se ha señalado, implica su asociación o unión con el DNA, en regiones específicas de los genes, llamadas regiones reguladoras, las cuales se localizan normalmente en uno o ambos extremos de los genes (figura I.16). Por la importancia del fenómeno de la regulación genética, profundizaremos en él.

Los mecanismos particulares de regulación de la expresión genética varían de una especie a otra. Hasta la fecha, estos mecanismos han sido estudiados, en forma detallada, en varios organismos, aunque es en la bacteria *Escherichia coli* en la que mejor se conocen, por ser éste el microorganismo mejor caracterizado. El conocimiento de los mecanismos de regulación bacterianos ha servido como base para estudiar la compleja regulación de la expresión genética en organismos eucariontes, incluyendo al hombre. A continuación se explican algunos de los mecanismos de control genético mejor conocidos.

Regulación de la expresión genética en procariontes

La expresión o transcripción de los genes de organismos procariontes como las bacterias puede estar o no regulada. Los genes cuya expresión no está regulada se denominan genes constitutivos; los genes que responden a uno o varios mecanismos de regulación son llamados inducibles.

Los genes inducibles han sido objeto de una extensa investigación, ya que en ellos se encuentran presentes mecanismos de regulación del fenómeno de la transcripción. Una gran parte de los genes estudiados en bacterias forman agrupamientos, en donde cada uno de los genes codifica para proteínas funcionalmente relacionadas, y en muchos casos estos genes se transcriben en una sola molécula de RNAm. El grupo de genes con funciones relacionadas que es regulado y transcrito como una unidad en una sola molécula de RNAm, se denomina "operón" y normalmente las proteínas codificadas por los genes de un operón son enzimas que intervienen en la misma vía metabólica. Los RNAm que se sintetizan a partir de un operón se denominan "policistrónicos" o "poligénicos"; este término indica que una molécula de un RNA mensajero es portadora de la información de varios genes que especifican varias proteínas, cada una de las cuales está codificada por un solo gene (23).

Sin embargo, no todos los genes que son controlados como una unidad están agrupados en operones. Por ejemplo, los ocho genes que codifican las enzimas de la vía de biosíntesis del aminoácido arginina, se encuentran dispersos en el cromosoma de *Escherichia coli;* no obstante, la expresión es regulada en forma coordinada. Los genes que exhiben esta organización dispersa constituyen una unidad funcional que recibe el nombre de "regulón".

La expresión de los genes en organismos procariontes está regulada básicamente a nivel de la síntesis o transcripción del RNAm, por lo que existen diferentes tipos de mecanismos de control a este nivel, aunque no todos ellos están presentes en la totalidad de los genes, operones y regulones. Se conocen los siguientes mecanismos específicos que hacen posible la regulación genética a nivel transcripcional: represión, inducción, activación, represión catabólica, terminación, antiterminación y atenuación. También se ejerce la regulación de la expresión a nivel transduccional.

i) Control transcripcional

En procariontes, el punto más importante de regulación de la transcripción de cualquier gene es el comienzo de este proceso. El promotor es la secuencia de DNA donde se une la enzima RNA polimerasa, en la región que precede a los genes, para iniciar la transcripción del DNA (figura I.16). La frecuencia con la que se inicia el proceso de la transcripción de un gene específico es resultado, en buena medida, de la secuencia de las bases nucleotídicas que forman el promotor, ya que dicha secuencia puede variar (21, 22, 24, 25, 26).

Un promotor clásico en la bacteria *Escherichia coli* consiste en dos conjuntos de nucleótidos bien conservados: el primero de éstos consta de seis pares de nucleótidos y está colocado hacia arriba del sitio de iniciación de la síntesis del RNAm (alrededor de la posición -10). El segundo grupo tiene también seis pares de nucleótidos y se encuentran generalmente a 17 o 18 nucleótidos del primer grupo (alrededor de la posición -35), tal y como se aprecia en la figura I.16. Estas secuencias permiten el reconocimiento y la subsecuente unión de la enzima RNA polimerasa al promotor para que, posteriormente, en la región -10, se separen las dos hebras del DNA, y con ello se permita la iniciación de la síntesis del RNAm.

Generalmente, mientras menos se parezca un promotor a la llamada "secuencia consenso" (figura I.16), menor es la afinidad de la RNA polime-

rasa por esta secuencia y consecuentemente menos eficiente es el promotor para promover la transcripción. La secuencia "consenso" de un promotor se determinó teniendo en cuenta el número de veces que aparece un nucleótido particular en una posición específica en todos los promotores con secuencia nucleotídica conocida. Además del promotor, existen en su vecindad sitios donde otro tipo de moléculas regulatorias pueden interaccionar con el DNA para modular el inicio de la transcripción. Así, la frecuencia con la que un gene u operón es transcrito depende no sólo de la afinidad de la RNA polimerasa por el promotor, sino también del grado en que las regiones regulatorias y sus moléculas receptoras restrinjan o favorezcan el paso de la RNA polimerasa hacia el gene estructural.

Para modular la actividad de un promotor, la célula suele utilizar dos estrategias generales: la represión y la activación. En ambas, la actividad del promotor (principalmente su unión a la RNA polimerasa), es modulada por la unión de proteínas específicas a regiones cercanas (o traslapadas) al promotor. Estas proteínas moduladoras están, a su vez, codificadas por genes reguladores.

En el caso de la represión, la proteína moduladora llamada "represor" se une a la región regulatoria, llamada "operador", que es normalmente una región del DNA que incluye parte del promotor (figura I.17). En el operador se ejerce el control negativo, ya que la interacción de una molécula del represor con el operador bloquea la transcripción del gene al impedir que la RNA polimerasa se una al promotor. En contraste, mediante un gene activador y su producto, se ejerce el control positivo, ya que a través de la interacción de una molécula reguladora, llamada "activador", con cierta región del DNA, se propicia que inicie el fenómeno de la transcripción.

El represor activo está constituido por una proteína, codificada por un gene regulador, a la que se le une una molécula receptora. Dicha proteína, que no despliega actividad de represor por sí misma, recibe el nombre de "aporrepresor", y la molécula receptora se denomina "correpresor". La función del correpresor consiste en incrementar la afinidad del aporrepresor por los sitios de interacción con el DNA (operadores), y su concentración refleja además las condiciones metabólicas prevalentes. Con este tipo de estrategias y elementos, un organismo puede "apagar" o "prender" la transcripción o expresión de un gene u operón, como respuesta a cambios en su medio ambiente.

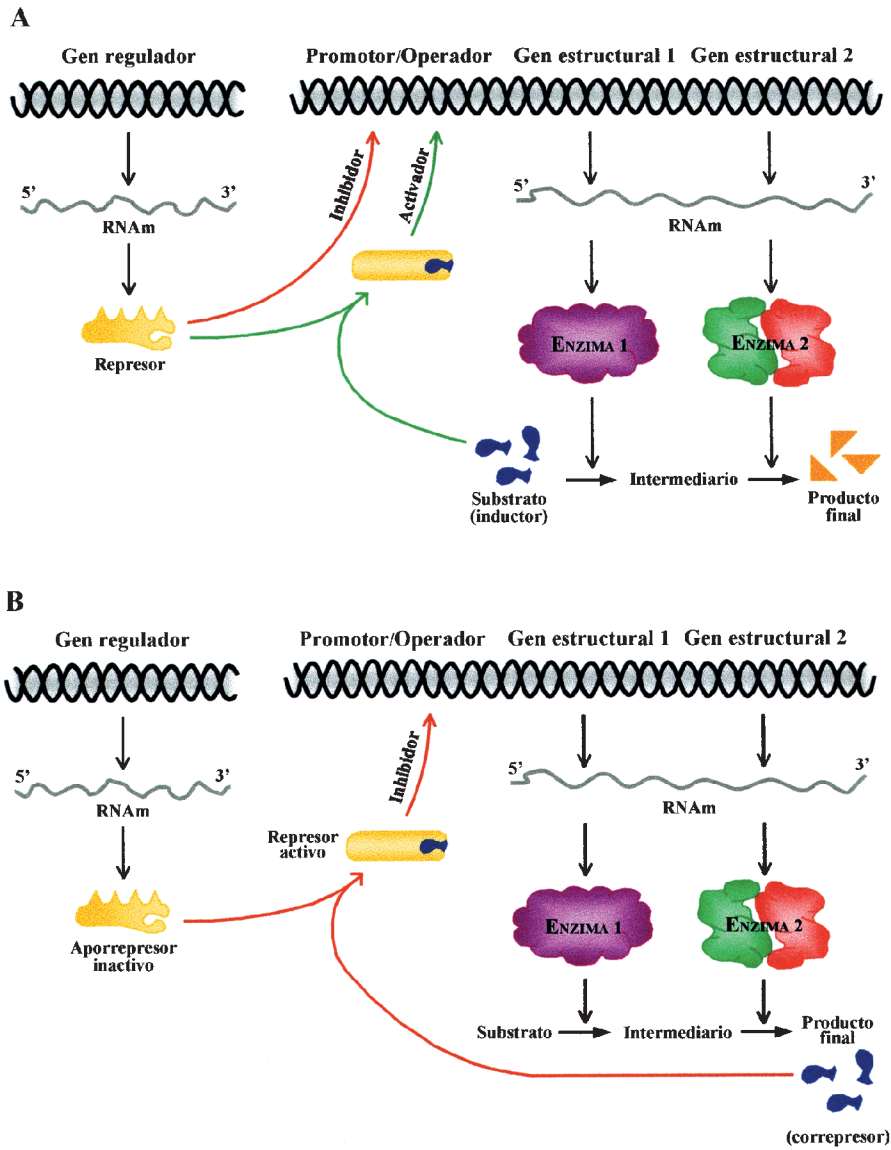
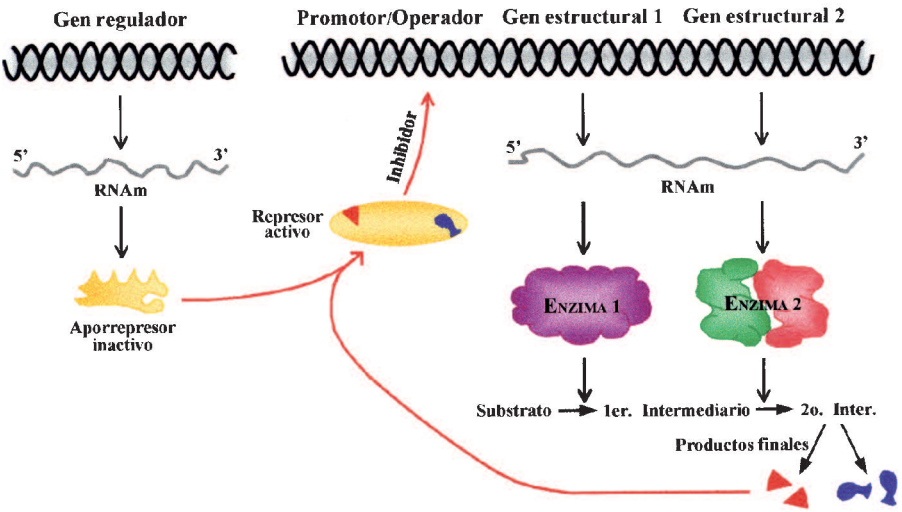


Figura I.17

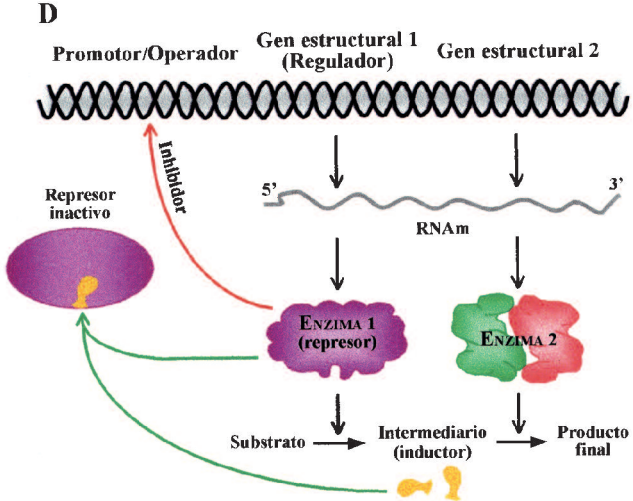
MECANISMOS DE REGULACIÓN GENÉTICA

Los mecanismos de regulación de la transcripción más frecuente utilizados en las células de microorganismos procariontes son los siguientes: A) regulación positiva; B) regulación negativa; C) regulación multivalente y D) regulación autógena. Una explicación detallada de estos mecanismos se presenta en el texto.

C


Gen regulador
Promotor/Operador
Gen estructural 1
Gen estructural 2
5'
3'
RNAm
Inhibidor
Represor activo
Aporrepresor inactivo
ENZIMA 1
ENZIMA 2
Substrato
1er. Intermediario
2o. Inter.
Productos finales

D


Promotor/Operador
Gen estructural 1 (Regulador)
Gen estructural 2
Inhibidor
Represor inactivo
5'
3'
RNAm
ENZIMA 1 (represor)
ENZIMA 2
Substrato
Intermediario (inductor)
Producto final

El efecto contrario a la represión de la transcripción es la inducción. Este proceso es mediado por otras moléculas pequeñas, los inductores, que a su vez se unen al represor disminuyendo su afinidad por el operador. De esta forma, la célula puede volver a iniciar la expresión de un sistema genético.

La represión y la inducción son mecanismos mediante los cuales se modula la expresión de los genes y las moléculas efectoras (correpresores e inductores), están cercanamente relacionadas o son productos de las vías metabólicas que regulan algunos operones y genes que están naturalmente reprimidos y sólo son inducidos cuando las condiciones metabólicas así lo demandan. Estos sistemas, denominados "sistemas inducibles", suelen ser de carácter catabólico y confieren al organismo la habilidad de adaptarse a cambios en la disponibilidad de nutrientes. Por lo general, las moléculas pequeñas que actúan como receptores de las proteínas regulatorias, son sustratos de las vías metabólicas. En la figura I.17A se esquematiza este mecanismo.

El caso inverso son los operones o genes que se encuentran naturalmente inducidos y que sólo se reprimen en caso de que sus productos no sean necesarios. Estos sistemas, que se denominan "sistemas represibles" son de carácter generalmente biosintético, y capacitan al organismo para utilizar productos presentes en el medio ambiente en vez de tener que sintetizarlos *de novo*. Las moléculas receptoras en estos sistemas suelen ser los productos finales de las vías biosintéticas. Este mecanismo se ejemplifica en la figura I.17B.

En algunos casos las vías biosintéticas están ramificadas, es decir, las enzimas codificadas por un operón catalizan la síntesis de más de un producto. En tales circunstancias opera un mecanismo de regulación conocido como "represión multivalente". En este caso, el aporrepresor no puede ser activado exclusivamente por ninguno de los productos finales de las vías biosintéticas y solamente se activa cuando todos los correpresores correspondientes se unen al aporrepresor. En la figura I.17C se esquematiza este mecanismo.

Los ejemplos presentados en la figuras I.17A, B y C, representan sistemas de represión-inducción mediados por moléculas que forman parte de las vías metabólicas. Sin embargo, en ciertos casos, el aporrepresor es el producto directo de un gene estructural y entonces se encarga de su propia regulación. Este mecanismo se denomina "regulación autógena" y en muchos casos el gene que ejerce dicha regulación desempeña una función dual, ya que además de ser el aporrepresor, puede actuar también como una enzima. En la figura I.17D se ilustra este mecanismo.

Además de los mecanismos en que intervienen operones o genes individuales, los sistemas procariontes tienen la capacidad de regular simultáneamente varios genes u operones a través de algunas moléculas comunes. Los mecanismos individuales capacitan al organismo para responder con un elevado grado de especificidad, a las condiciones del ambiente. Los mecanismos de regulación simultánea, por su parte, permiten al organismo coordinar grupos de respuestas.

Una vez que la enzima RNA polimerasa se une al promotor de un gene, se inicia la transcripción, sintetizándose RNAm, el cual es elongado con la adición de nucleótidos complementarios correspondientes a la secuencia del DNA. Una vez sintetizado este RNAm —como fuera señalado—, es posteriormente traducido en los ribosomas para sintetizar proteínas. Es relevante señalar que existen mecanismos adicionales que permiten modular la transcripción del RNAm. Entre estos mecanismos vale la pena señalar el llamado "efecto de atenuación" el cual es un mecanismo que permite, al modular la estructura del RNAm, atenuar su lectura a nivel de los ribosomas (21, 22, 23, 24, 25).

ii) Control a nivel de la traducción del RNA mensajero

Se ha señalado que los niveles de expresión de un gene están determinados por la transcripción de su RNAm y por la traducción de éste en los ribosomas. La regulación a nivel de la traducción del RNA mensajero explica el porqué en muchos casos las enzimas codificadas por un mismo operón son sintentizadas en concentraciones diferentes. Lo anterior se debe a que la traducción de ciertos RNAm poligénicos puede comenzar no sólo en el extremo 5' del mismo, sino además en sitios internos del mensajero. La iniciación de la traducción del RNAm depende de la existencia de un grupo de nucleótidos en el RNAm localizados en la región anterior al codón de iniciación. Esta secuencia se denomina "sitio de unión ribosomal" y su secuencia es complementaria al extremo 3' del RNA que constituye la subunidad pequeña del ribosoma. En este punto las bases del RNA ribosomal y del RNAm se asocian, iniciándose así la traducción del mensajero (25, 26, 28).

Existen proteínas que modulan la unión del RNA mensajero a la subunidad pequeña del ribosoma y por ello puede darse el efecto de una traducción diferencial.

Indudablemente las células de organismos superiores tienen mecanismos de regulación genética que comparten elementos generales con las bacterias. Sin embargo, entre las células de organismos unicelulares y pluricelulares hay una diferencia importante: la diferenciación morfológica y funcional inherente a las células de organismos pluricelulares. Ello requiere de mecanismos de control preciso de la expresión genética en las diferentes células del organismo, de modo que las células diferenciadas realicen sus funciones de manera adecuada.

Contrariamente con lo que sucede a los procariontes, en el caso de los eucariontes la regulación de la expresión genética es bastante más complicada y se sabe menos de ella. Por ejemplo, en las células de los eucariontes hay varios sistemas genéticos encargados de transcribir la información del DNA en copias del RNAm y de otros tipos de RNAs; es decir, hay varios sistemas de RNA polimerasa. Por otro lado, el DNA se encuentra no sólo en el núcleo sino también en mitocondrias y cloroplastos y además, como veremos más adelante muchos de los genes de los eucariontes tienen intrones y exones, a diferencia de los procariontes que sólo tienen exones.

Sin embargo, se han descrito varios tipos de secuencias regulatorias en los organismos eucariontes en donde algunas de ellas guardan similitudes importantes con las regiones de regulación de los procariontes, aunque también se han descrito otras que tienen características diferentes. Se ha señalado que el genoma humano y el de otros eucariontes contienen muchos genes que codifican para RNAs pequeños, que no codifican para proteínas. Se sabe que estos transcritos de RNA están involucrados en modular la expresión de los genes principalmente a través de modular la traducción de los RNAs mensajeros (27, 28).

Finalmente, es relevante señalar como veremos en capítulos posteriores, que la fisiología de cualquier célula procarionte o eucarionte, está *de facto* bajo el control de redes que regulan la expresión de los genes. La estructura y organización de estas redes de control genético, es decir el conjunto de genes particulares que responden a estímulos específicos similares y la jerarquía de estos conjuntos de genes, está controlada a su vez, por la combinación de regiones regulatorias a nivel del DNA (tales como promotores, operadores, etc.), y de proteínas que se unen a estas regiones, para modular la expresión de la transcripción de estos genes. Hoy en día, gracias a los proyectos de secuenciación que han permitido

determinar la secuencia de todos los genes de varios genomas de diferentes organismos incluyendo el humano, como se verá en capítulos posteriores, se tiene ya una gran colección de genes de muchos organismos, que han permitido empezar a tener una idea más clara de la manera en que se regula la expresión de los genes y de la manera en que se transcribe el genoma en microorganismos, plantas y animales incluyendo la especie humana (1, 27, 28). Este conocimiento permitirá avanzar en la comprensión de estas redes de control de la expresión genética en la célula viva.

Caracterización de los procesos y de las herramientas celulares

Regresando a mediados de los años setenta, a escasos veinte años después del descubrimiento de Watson y Crick que demostró que el DNA era la sustancia donde residía la información genética y del desciframiento de su estructura, la especie humana había descubierto los mecanismos fundamentales de cómo es que la información genética es capaz de ser utilizada por la célula para sintetizar las proteínas, de cómo los genes estaban estructurados en el DNA, de manera análoga a los segmentos que codifican para las canciones en una cinta musical, y de cómo, en términos generales, se transcriben o se expresan y se regulan los genes en paticular en microorganismos.

Un producto adicional de todo este avance y conocimiento fue que la humanidad empezaba a entender cuáles eran las proteínas, en el interior de la célula, responsables de manejar *in vivo* su material genético; es decir qué proteínas, con qué actividades enzimáticas, podían modificar y regular, *in vivo,* la expresión de los genes en el DNA.

En 1970, Arber, Smith y Hamilton descubren, como parte de este esfuerzo encaminado a entender más detalladamente las funciones de regulación y organización genética, las llamadas "enzimas de restricción", que son proteínas que cortan el DNA en sitios específicos, como "tijeras moleculares" y que reconocen secuencias específicas de nucleótidos en el DNA. En ese tiempo también Berg y Jackson descubren el uso de la enzima ligasa de DNA que es utilizada por la célula para formar uniones covalentes entre diferentes moléculas de DNA.

Así, todo el escenario estaba preparado para que en 1973, Cohen y Boyer (29), realizaran su experimento histórico en donde por primera vez, usando *in vitro* —es decir en un tubo de ensayo en el laboratorio— estas

herramientas celulares, insertaron el DNA de una rana en el DNA de la bacteria *Escherichia coli*. Con este experimento se construye el primer organismo transgénico y da inicio la era del manejo *in vitro* de la información genética, o la edición molecular del material genético, mediante la metodología llamada ingeniería genética o de DNA recombinante. En el siguiente capítulo se describen estas herramientas y métodos y se detalla su uso para aislar, caracterizar y manipular el DNA de los organismos vivos.

Bibliografía

1. Voet, D., Voet, J.G. *Biochemistry,* 2nd. Ed. John Wiley and Sons, Inc. NY, EUA (1995).
2. Lim, D. *Microbiology,* McGraw-Hill, New York, NY, EUA (1998).
3. Mendel, G. English translation of Mendel's experiments in plant hybridization, reimpreso en: Peters, J., ed. *Classic Papers in Genetics.* Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. USA (1959), y en: *The Origin of Genetics.* Stern, C., and E. Sherwood, eds. Freeman, Ca., USA (1966).
4. Morgan, T. Sex-limited inheritance in *Drosophila. Science,* 32: 120-122 (1910).
5. Morgan, T., L. Sturtevant, H. Muller, C. Bridges. *The Mechanism of Mendelian Heredity,* H. Holt & Co., New York (1915).
6. Griffith, F. The significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* 27: 113-159, (1928).
7. Avery, O., C. MacLeod, M. MacCarty. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.,* 79: 137-158 (1944).
8. Chargaff, E. Structure and function of nucleic acids cell constituents. *Fed. Proc.,* 10: 654-659 (1951).
9. Franklin, R., R. Gosling. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature,* 171: 740-741 (1953).
10. Wilkins, M., R. Stokes, H. Wilson. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature,* 171: 738-740 (1953).
11. Watson, J., F. Crick. Molecular structure of nucleic acids: structure for deoxyribose nucleic acids. *Nature,* 171: 737-738 (1953).
12. Watson, J., F. Crick. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature,* 171: 964-967 (1953).
13. Crick, F., J. Watson. The complementary structure of deoxyribonucleic acid. *Proc. Roy. Soc.,* 223: 80-96 (1954).
14. Meselson, M., F. Stahl. The replication of DNA in *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci.* USA., 44: 671-682 (1958).

15. Crick, F. On protein synthesis. Biological replication of macromolecules. *Symp. Soc. Exp. Biol.,* 12: 138-163 (1958).
16. Brenner, S., F. Jacob, M. Meselson. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature,* 190: 576-581 (1961).
17. Crick, F., L. Barnett, S. Brenner, R. Watts-Tobin. General nature of the genetic code for proteins. *Nature,* 192: 1227- 1232 (1961).
18. Leder, P., M. Nirenberg. RNA code words and protein synthesis II: nucleotide sequence of valine RNA code word. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 52: 420-427 (1964).
19. Crick, F. Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.,* 19: 548-555 (1966).
20. Jacob, F., J. Monod. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.,* 3: 318-356 (1961).
21. Gilbert, W., B. Müller-Hill. Isolation of the lac repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 56: 1891-1898 (1966).
22. Ptashne, M. Isolation of the phage repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 57: 306-313 (1967).
23. Shapiro, J., L. MacHattie, L. Eron, G. Ihler, K. Ippen, J. Beckwith. Isolation of pure lac operon DNA. *Nature,* 224: 768-774 (1969).
24. Ptashne, M., N. Hopkins. The operators controlled by the phage repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 60: 1282-1287 (1968).
25. Shine, J., L. Dalgarno. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplet and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 71: 1342-1346 (1974).
26. Yanofsky, C. Attenuation in the control of expression of bacterial operons. *Nature,* 289: 751-758 (1981).
27. The Encode Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the Encode Pilot Project. *Nature,* 447: 799-817 (2007).
28. Rana, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*, 8: 23-36 (2007).
29 . Cohen, S., Chang, H. Boyer, R. Helling. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 70: 3240-3244, (1973).

Capítulo II

INGENIERÍA GENÉTICA
LAS HERRAMIENTAS MOLECULARES Y LOS MÉTODOS PARA AISLAR, CARACTERIZAR Y MANIPULAR EL DNA

F. G. Bolívar Zapata

La manipulación *in vitro* del material genético

La ingeniería genética, llamada también metodología del DNA recombinante, es un conjunto de herramientas y métodos que permiten la manipulación *in vitro* —la edición molecular— del material genético de los organismos vivos. Esta poderosa metodología está sustentada en dos grandes tipos de herramientas celulares. La primera de ellas son las enzimas que utiliza la propia célula en sus procesos internos para el manejo de su material genético. El otro tipo de herramientas son los vehículos moleculares de clonación de DNA, que son moléculas de DNA que permiten la replicación de fragmentos de ácido nucleico incapaces de hacerlo en forma autónoma. La ingeniería genética está también soportada por un conjunto de métodos que permiten aislar, caracterizar y manipular el DNA entre los que resaltan las técnicas de secuenciación del ácido desoxirribonucleico, mediante las cuales es posible determinar la secuencia nucleotídica del DNA. La sofisticación de estas técnicas de secuenciación han permitido, como veremos más adelante, la determinación de las secuencias de varios genomas, incluyendo el humano, en tiempos muy cortos. Existen también técnicas de síntesis química de oligonucleótidos que son fragmentos pequeños de DNA, que indudablemente son herramientas fundamentales para modificar, editar y detectar de manera muy fina y específica el DNA y finalmente, la técnica de reacción en cadena de polimerasa o PCR que es una metodología que permite la amplificación de cualquier fragmento de DNA, generando varios billones de copias idénticas a este fragmento de DNA en pocas horas.

Las herramientas y técnicas señaladas y algunas otras auxiliares que se presentan en este capítulo, integran la metodología que permiten el aislamiento, manejo y edición del material genético de los seres vivos, llamada ingeniería genética o del DNA recombinante. Por su significado se describen con mayor detalle las más importantes.

Las herramientas celulares; enzimología de ácidos nucleicos

A principios de 1970, habían sido ya descritos los principales mecanismos en la célula involucrados en la utilización de la información genética para sintetizar las proteínas, y así se establecía sólidamente el dogma central de la biología moderna (figura I.9).

Estos dos mecanismos, el de transcripción del DNA en RNA y el de traducción de RNA en proteína, así como el mecanismo de replicación del DNA, que han sido descritos con detalle en el capítulo anterior, han permitido conocer cómo participa un gran número de proteínas en el interior de la célula, las cuales tienen diferentes actividades enzimáticas y funcionales, algunas de ellas involucradas en el manejo de su propio material genético. Así, han sido descritas enzimas, que son moléculas de proteínas con actividades biológicas, que permiten cortar las uniones covalentes fosfodiester en las cadenas del DNA, como verdaderas "tijeras moleculares". A estas enzimas se les conoce con el nombre genérico de nucleasas y entre ellas destacan las endonucleasas de restricción, las cuales reconocen secuencias específicas de nucleótidos en el DNA y luego proceden al rompimiento de algunas de las uniones covalentes en estas secuencias. Las enzimas que llevan a cabo la función contraria a las nucleasas, o sea el formar uniones covalentes fosfodiester entre moléculas de DNA, reciben el nombre genérico de ligasas de DNA. Éstos son dos de los ejemplos más importantes del tipo de enzimas que tienen como sustrato a los ácidos nucleicos. En este capítulo se presenta una descripción de las principales enzimas utilizadas por la célula para manejar sus propios ácidos nucleicos. Es relevante señalar que muchas de estas herramientas celulares han sido purificadas y hoy son utilizadas para manejar o modificar, *in vitro* —es decir en el tubo de ensayo en el laboratorio— el DNA y el RNA de cualquier organismo. Las enzimas que tienen como sustrato los ácidos nucleicos son las herramientas fundamentales de la ingeniería genética, ya que a través de su uso es posible modificar y editar a nivel molecular el DNA de cualquier organismo. Los principales tipos de enzimas utilizadas en la ingeniería genética se describen a continuación.

Las enzimas llamadas nucleasas pertenecen a un grupo de proteínas con actividades enzimáticas que permiten a la célula romper uniones covalentes fosfodiester en las cadenas del DNA y del RNA. Las desoxirribunucleasas son nucleasas que cortan uniones fosfodiester en el DNA y las ribonucleasas son las nucleasas que cortan RNA; las hay que degradan cadenas dobles o sencillas (figura II.1). Otra manera de nombrar las nucleasas es tomando en cuenta la propiedad de ser exo o endonucleasas. Las exonucleasas requieren que sus sustratos sean ácidos nucleicos con extremos, e inician su rompimiento en esos extremos. Las exonucleasas pueden preferir uno de los dos extremos —5' o 3'—, del ácido nucleico para su acción, aunque las hay que no requieren de un extremo particular (figura I.8). Las endonucleasas, por el contrario, no requieren extremos presentes en sus sustratos y por lo tanto pueden hidrolizar o romper moléculas circulares de DNA o RNA; estas enzimas siempre hidrolizan o cortan uniones internas fosfodiester en el ácido nucleico y compuestos productos polinucleotídicos de tamaños variables (figura II.1).

Las endonucleasas de restricción descubiertas por Arber, Smith y Hamilton son un tipo de nucleasas que se encuentran presentes en diferentes especies bacterianas, y son herramientas fundamentales para la disección *in vitro* del DNA, ya que reconocen y luego cortan, pequeñas secuencias específicas de nucleótidos en cualquier molécula de DNA. De esta manera es posible cortar o digerir un DNA particular, siempre de la misma manera, en forma reproducible, utilizando la misma enzima de restricción. Hay muchas endonucleasas de restricción que reconocen, cada una de ellas, una secuencia de nucleótidos específica. En la mayoría de los casos la longitud de las secuencias de reconocimiento varía entre cuatro y seis pares de nucleótidos (1, 2, 3) (figura II.2).

La nomeclatura de las endonucleasas de restricción se deriva de la abreviatura del nombre del organismo del cual se aísla dicha enzima. La primera letra del género y las dos primeras letras de la especie forman el nombre de la enzima. Si la endonucleasa se encuentra presente en una cepa específica de un microorganismo, el nombre básico de tres letras puede ser seguido por la designación particular de la cepa (ejemplo: la enzima *Eco*RI deriva su nombre de *Escherichia coli* organismo de donde se aísla y del factor de resistencia R). Finalmente, un número romano indica el orden de descubrimiento de las enzimas en una cepa microbiana (figura II.2). El corte que ocasionan las endonucleasas en la doble

Nombre	*Fuente*	*Especialidad*	*Preferencia*
Bal31	*Altermonas espejiana*	DNA	cadena sencilla
		DNA	cadena doble
DNAsaI pancreática	bovina	DNA	cadena doble y sencilla
Exo I	*E. coli*	DNA	cadena sencilla
Exo VII	*E. coli*	DNA	cadena sencilla
Nucleasa de *Neurospora*	*Neurospora crassa*	DNA y RNA	cadena sencilla
RNAsaI pancreática	bovina	RNA	cadena sencilla
Nucleasa S1	*Aspergilus oryzae*	DNA y RNA	cadena sencilla
Fosfodiesterasa de estafilococo	*Staphylococus aureus*	DNA y RNA	cadena sencilla

Figura II.1

NUCLEASAS QUE SE UTILIZAN EN LA INGENIERÍA GENÉTICA

La figura muestra algunas de las enzimas del tipo de las nucleasas más utilizadas en la ingeniería genética para cortar, degradar o modificar los extremos de moléculas de DNA o RNA.

Enzima	*Organismo*	*Sitio de reconocimiento**
*Bam*HI	*Bacillus amyloliquefaciens*	G↓GATCC
*Eco*RI	*Escherichia coli*	G↓AATTC
*Eco*RV	*Escherichia coli*	GAT↓ATC
*Hae*II	*Haemofilus aegyptus*	GG↓CC
*Hind*III	*Haemofilus influenzae*	A↓AGCTT
*Hin*fI	*Haemofilus influenzae*	G↓ANTC
*Hpa*I	*Haemofilus parainfluenzae*	GTT↓AAC
*Pst*I	*Providencia stuartii*	CTGCA↓G
*Sal*I	*Streptomyces albus*	G↓TCGAC
*Sma*I	*Serratia marcescens*	CCC ↓GGG
*Sph*I	*Streptomyces phaecromogenes*	GCTAC↓C
*Taq*I	*Thermus aquaticus*	T↓CGA

N= cualquier nucleótido.

*= la dirección del DNA es de 5' a 3'.

Figura II.2

ENZIMAS DE RESTRICCIÓN AMPLIAMENTE USADAS EN EL LABORATORIO

La figura muestra algunas de las endonucleasas de restricción más frecuentemente usadas en el laboratorio, las cuales cortan secuencias específicas, llamadas palindrómicas, en moléculas de DNA; las flechas indican los sitios de corte.

hélice de DNA puede darse en el centro del eje de simetría de la secuencia, generando así extremos rasurados, o en diferentes posiciones con respecto al centro, produciendo de esa manera, moléculas con extremos cohesivos o salientes en el extremo 3', o bien moléculas con extremos cohesivos con residuos salientes en los extremos 5' (4) (figura II.3). Algunas endonucleasas que han sido aisladas de distintos organismos, reconocen y cortan exactamente la misma secuencia de DNA. Estas enzimas se denominan "isoesquizómeros". Los isoesquizómeros imperfectos son las endonucleasas que reconocen la misma secuencia, pero que cortan en una posición diferente (4).

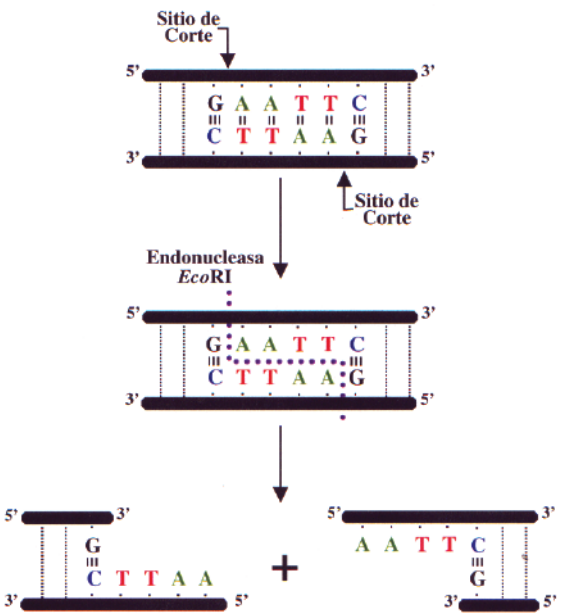


Figura II.3

DIGESTIÓN DEL DNA POR LA ENDONUCLEASA *Eco*RI

La figura muestra el sitio de reconocimiento y el corte del DNA por la enzima endonucleasa de restricción *Eco*RI. El corte del material genético se lleva a cabo en dos pasos donde una hebra del DNA es hidrolizada primero y luego la otra. En las condiciones usuales de reacción, los productos son dos fragmentos de DNA con extremos cohesivos o complementarios de cadena sencilla. Cuando las condiciones se alteran para reestabilizar las uniones, a través de los puentes de hidrógeno entre los cuatro nucleótidos de los extremos salientes del DNA (por ejemplo bajando la temperatura), los fragmentos de DNA pueden reasociarse. Se requiere finalmente la acción de la enzima ligasa para formar las uniones covalentes, entre nucleótidos adyacentes tal y como puede observarse en la figura II.9.

En muchos experimentos de ingeniería genética es necesario para poder desarrollar un análisis adecuado, remover los grupos fosfato que se encuentran en los extremos de las moléculas de DNA. Las enzimas que pueden llevar a cabo esta función reciben el nombre genérico de fosfatasas. Las fosfatasas pueden remover grupos fosfato tanto de extremos 5' como de los 3' generados por la acción previa de las nucleasas (figura II.4).

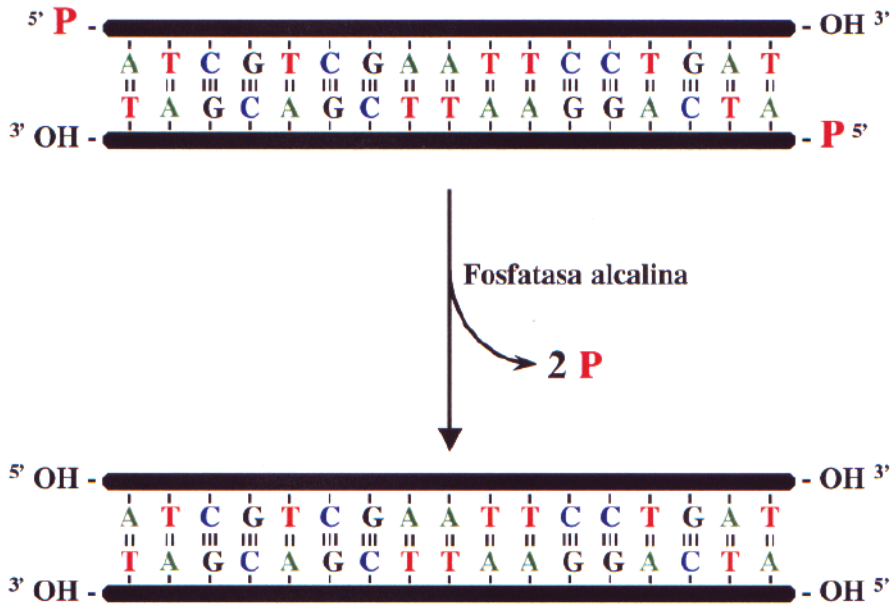


Figura II.4

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ENZIMA FOSFATASA DE DNA

La figura muestra la hidrólisis o ruptura de los grupos fosfatos terminales de un DNA, por medio de la enzima fosfatasa. Esta enzima genera moléculas de DNA sin grupos fosfato (P) en los extremos de las moléculas de los ácidos nucleicos.

Las cinasas de DNA son enzimas que catalizan la función contraria a las fosfatasas, es decir la fosforilación o adición de un grupo fosfato, en un extremo del DNA. Un uso importante de este tipo de enzimas es para "marcar" el extremo 5' de una molécula de DNA, mediante la incorporación del isótopo radioactivo de fósforo 32 en este extremo, como parte del grupo fosfato que se incorpora (figura II.5).

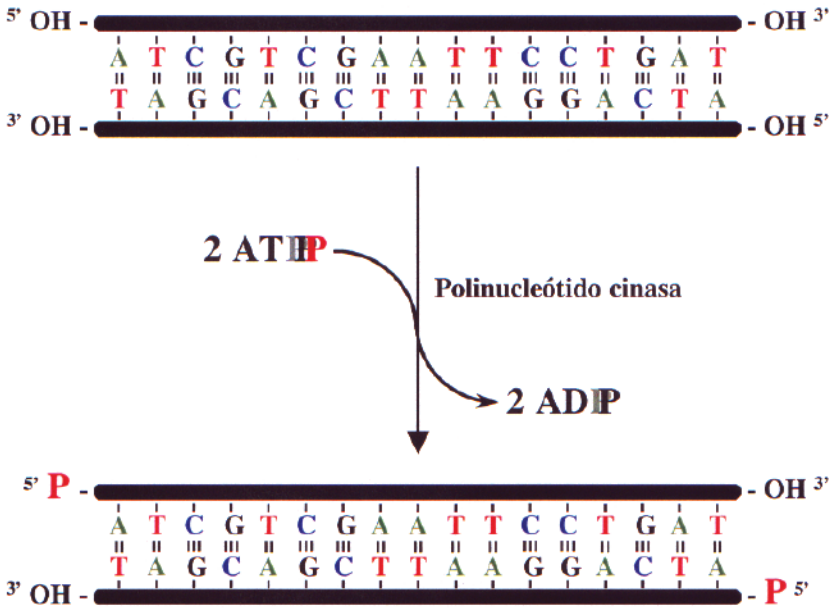


Figura II.5

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ENZIMA CINASA DE DNA

En la figura se muestra el proceso de adición de grupos fosfato en los extremos 5' de una molécula de DNA, por la acción de la enzima llamada polinucleótido cinasa. El grupo gamma fosfato de la molécula de ATP puede ser marcado con 32P (indicado en rojo), para poder producir así una molécula de DNA marcada radioactivamente en sus extremos. Este tipo de herramienta y de marcaje con radioisótopos ha sido utilizado para obtener la secuencia nucleotídica del DNA o para procesos de hibridación utilizados en el diagnóstico a nivel molecular.

Las enzimas que son capaces de unir covalentemente dos moléculas de DNA a través de sus extremos, se denominan ligasas de DNA. Estas enzimas descritas por Berg y Jackson realizan la función opuesta a las nucleasas, es decir, catalizan la formación de enlaces covalentes fosfodiester entre el extremo 5' fosfato de un DNA y el grupo 3'0H de otro (5). Para lograr una reacción exitosa, las cadenas del DNA que van a ser ligadas deben ser orientadas apropiadamente. En este caso, los extremos cohesivos que generan algunas nucleasas de restricción son adecuados para este fin ya que, a través de ellos, es posible alinear dos moléculas de DNA (figura II.6). Sin embargo algunas enzimas, como la ligasa proveniente del bacteriófago T4, no requiere de este tipo de alineamiento ya que es capaz de ligar entre sí dos fragmentos "rasurados" de DNA.

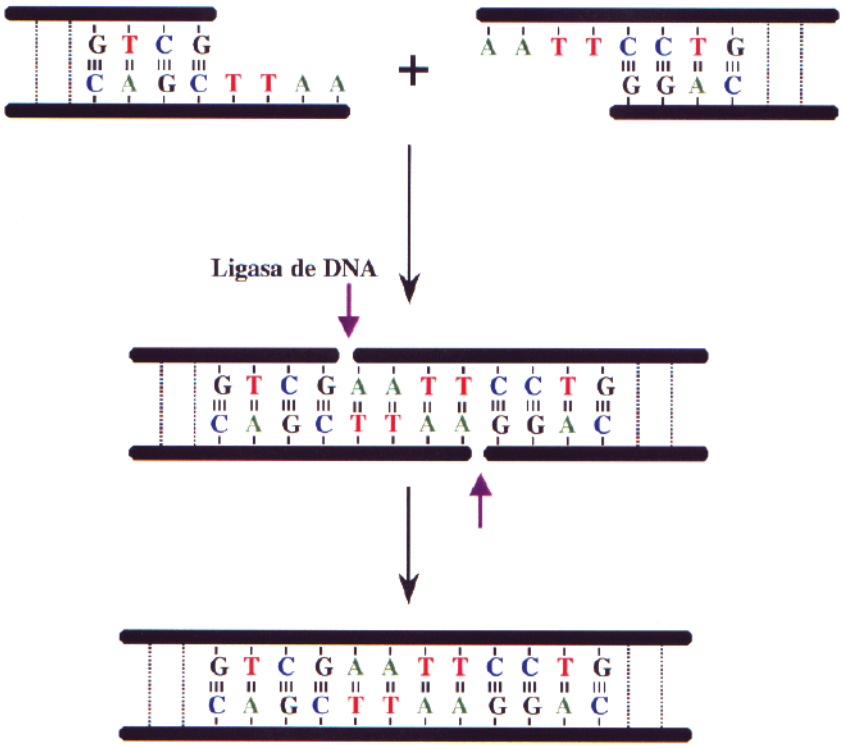


Figura II.6

MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ENZIMA LIGASA DE DNA

La figura muestra la propiedad de la enzima ligasa para enlazar fragmentos de DNA. La enzima ligasa une covalentemente dos cadenas de DNA, previamente unidas entre sí a través de los puentes de hidrógeno. La ligasa proveniente del bateriófago T4, tiene también la capacidad de unir dos fragmentos de DNA, con extremos rasurados.

Las polimerasas del DNA

Otro tipo de enzima que es utilizada de una manera muy importante en la ingeniería genética, es la DNA polimerasa o polimerasa del DNA. Estas enzimas, como su nombre lo indica, catalizan la síntesis de las nuevas cadenas del DNA, usando como molde o templado una de las cadenas originales, siendo por tanto una de las enzimas clave para la replicación del DNA (6) (figuras I.8 y II.7). *In vitro*, las cadenas nacientes del DNA son elongadas por la adición secuencial de nucleótidos a partir de un "prímero" de DNA, que normalmente es un oligonucleótido sintetizado quí-

micamente y que tiene un extremo 3'0H libre. En cada paso de elongación, el nucleótido que se incorpora en la hélice nueva es definido por el nucleótido complementario correspondiente presente en el templado del DNA. Existe una variedad muy importante de diferentes DNA polimerasas que se utilizan como herramientas en las metodologías del DNA recombinante y en particular en el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizado como veremos más adelante, para "amplificar" el DNA, es decir, generar varias copias de una molécula de DNA a partir de una sola copia original.

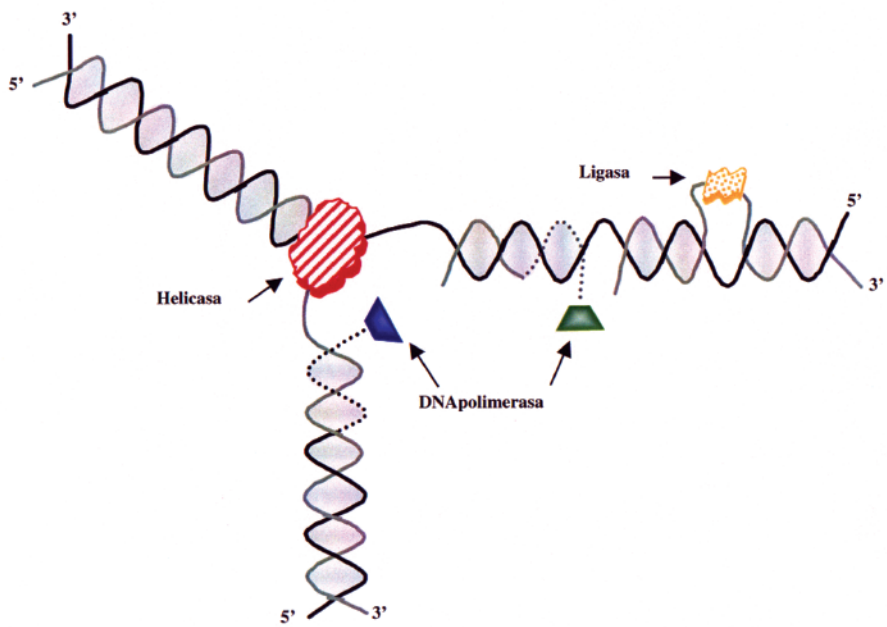


Figura II.7

REPLICACIÓN DEL DNA. EL PAPEL DE LA DNA POLIMERASA

Varias enzimas son necesarias para lograr la replicación del DNA, aunque la DNA polimerasa es indudablemente la enzima principal. La DNA polimerasa requiere de un "prímero" sintetizado por la RNA polimerasa, como parte de una región de doble hélice, para iniciar la síntesis de DNA. En este proceso participa también una proteína llamada helicasa, la cual desenrolla las dos hélices de DNA para que proceda la replicación. Finalmente, es importante señalar que como la DNA polimerasa puede sintetizar DNA solamente en la dirección 5' a 3', una de las dos cadenas del DNA debe ser sintetizada de manera discontinua. Lo anterior genera una serie de cadenas cortas de DNA, llamados fragmentos de Okasaki, en la otra hélice, que son unidos covalentemente por la enzima ligasa de DNA.

Como hemos visto, el tratamiento de un DNA con enzimas de restricción permite generar fragmentos específicos a partir del DNA original. Es importante recalcar que esta técnica hace posible que este tipo de experimento se repita siempre con los mismos resultados (para el mismo DNA), ya que los sitios de reconocimiento de las endonucleasas son secuencias específicas en el DNA. Hay, sin embargo, métodos alternativos para generar fragmentos de DNA.

Uno de estos métodos alternativos al uso de las nucleasas de restricción para generar fragmentos de DNA, ha sido la ruptura mecánica. La ruptura mecánica del DNA, en condiciones controladas, ha sido especialmente útil para generar, al azar, fragmentos de DNA no homólogos. Por ejemplo, pueden obtenerse fragmentos de gran tamaño (>10 000 pares de nucleótidos) imposibles de obtener con endonucleasas de restricción, ya que según un cálculo de probabilidad, éstas cortan una vez en cada 4 000 nucleótidos si su secuencia de reconocimiento es de seis nucleótidos, o bien una vez cada 400 si reconocen secuencias de cuatro nucleótidos. Este método de ruptura mecánica ha sido utilizado para construir los llamados "bancos", "librerías" o "genotecas" de genes, que son colecciones de moléculas recombinantes que contienen el DNA genómico de un organismo.

Otra alternativa para obtener fragmentos específicos de DNA ha sido el uso del copiado enzimático de moléculas de RNAm para producir una copia de DNA complementario (DNAc), al RNAm. Lo anterior es posible gracias a un tipo de enzima de origen viral conocida con el nombre de transcriptasa reversa (figura II.8). Un elemento indispensable para obtener una copia de DNA a partir de un RNA es el llamado "prímero o iniciador"; éste es un fragmento pequeño de DNA de hélice sencilla (un oligonucleótido), de 10-30 nucleótidos que debe hibridizar o aparearse con el extremo 3' del RNA que se desea copiar. Hoy en día la mayor parte de los iniciadores son sintetizados químicamente en el laboratorio. A partir del extremo 3' del iniciador, la transcriptasa reversa sintetiza un DNA complementario, de cadena sencilla, de forma análoga como la enzima DNA-polimerasa sintetiza DNA a partir de DNA. Una vez que se obtiene la cadena de DNA, el RNA es removido y la misma enzima es capaz de sintetizar la segunda cadena complementaria de DNA. Después de obtenido el DNA de doble cadena, las regiones de DNA de cadena sencilla son digeridas con una nucleasa que degrada específicamente este tipo de cadena sencilla.

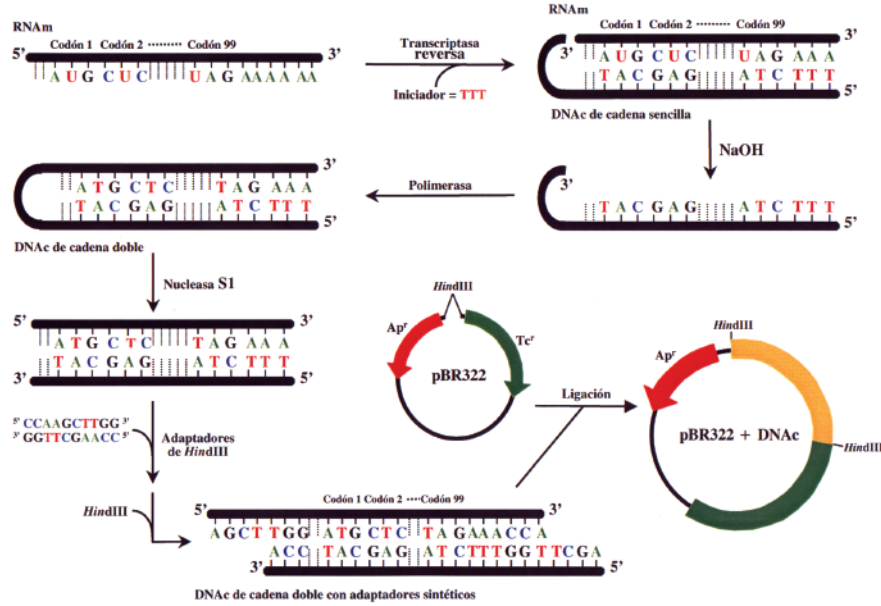


Figura II.8

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE DNA A PARTIR DE RNA MENSAJERO

El copiado enzimático de una molécula de RNAm para producir una copia de DNA complementario (DNAc), comprende varios pasos. Primero, se copia el RNAm con la enzima transcriptasa reversa y el DNAc de hélice sencilla que se genera se libera del RNA al ser tratado con álcali (NaOH). Posteriormente, con una polimerasa, se obtiene la segunda cadena de DNA; finalmente, la estructura de asa terminal se digiere con una nucleasa que degrada hélice sencilla. Se genera así un DNAc de cadena doble con extremos rasurados que puede clonarse directamente o bien ligarse a moléculas adaptadoras de DNA. En el diagrama se muestra su unión con un adaptador de DNA sintetizado químicamente que contiene un sitio de reconocimiento para la endonucleasa *Hin*dIII. El DNAc puede ser clonado directamente en un sitio de *Hin*dIII presente en un vehículo molecular, en este caso el plásmido pBR322.

La molécula de DNA resultante, con extremos rasurados, puede clonarse directamente en un vehículo molecular (la descripción de esta técnica de clonación se describe más adelante). Alternativamente, pueden utilizarse oligonucleótidos sintéticos de DNA para adaptar los extremos de las moléculas de DNA; por ejemplo, incorporando la secuencia correspondiente a un sitio de reconocimiento de una nucleasa de restricción. Debido a que muchos de los genes de eucariontes —como veremos más adelante— contienen intrones, los DNA copiados a partir de los RNAm tienen la ventaja de ser portadores exclusivamente de las secuencias exónicas presentes en el RNA maduro. Estos DNAc pueden utilizarse posteriormente para aislar los genes completos a partir de bancos de genes y para producir proteínas recombinantes en bacterias, tal y como se verá en el próximo capítulo (7, 8, 9, 10, 11).

Una vez que se ha digerido y cortado un DNA con una endonucleasa de restricción (o con cualquier otro método), los segmentos obtenidos pueden ser separados gracias a su tamaño, utilizando el método de la electroforesis en soportes sólidos constituidos por polímeros sintéticos.

La electroforesis se basa en el principio de que una molécula colocada en un campo eléctrico migra al electrodo apropiado a una velocidad (movilidad electroforética), proporcional al campo de fuerza y a su propia carga neta. Por esta razón, una mezcla de moléculas de DNA (o de proteínas), puede separarse electroforéticamente en función de: a) el tamaño, b) la forma o conformación molecular y c) la magnitud de las cargas netas. Cuando se coloca una mezcla de moléculas en la misma posición en un campo eléctrico, los componentes individuales se resuelven en bandas discretas que migran en distintas posiciones (figura II.9). En soluciones acuosas en condiciones fisiológicas, los grupos fosfato de los ácidos nucleicos se encuentran ionizados con una carga negativa (aniones) por lo que migrarán al electrodo positivo (ánodo), cuando son sometidos a un campo eléctrico. Asimismo, al aumentar la viscosidad del medio o soporte en el que migran las moléculas, las de menor peso molecular se moverán con mayor facilidad que las de tamaños mayores, y así las moléculas son separadas exclusivamente en función de su tamaño.

Los soportes más utilizados en los métodos de separación por electroforesis son la agarosa y la poliacrilamida. La agarosa forma geles o gelatinas al establecer puentes de hidrógeno cuando se encuentra en soluciones acuosas frías; el tamaño del poro, a través del cual deben migrar las moléculas de ácidos nucleicos, depende directamente de la concentración de la agarosa. Los geles de poliacrilamida se generan por el entre-

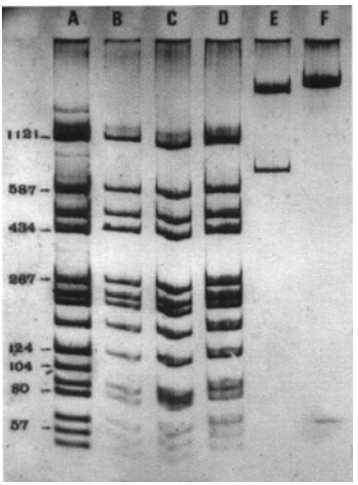


Figura II.9

SEPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA POR ELECTROFORESIS

La figura muestra una fotografía de un gel de acrilamida en la que aparecen como pequeñas bandas, los fragmentos de DNA que se generan con diferentes enzimas de restricción. Al digerir una molécula de DNA con una o varias enzimas de restricción de DNA, se le puede cortar en uno o varios sitios. En la figura se observa que al digerir la molécula de DNA del plásmido pBR322 con la enzima *Eco*RI, sólo se forma una banda ya que esta molécula solamente tiene un sitio de reconocimiento para esta enzima (carril F). Si se digiere con la enzima *Hind*II, aparecen dos bandas (carril E), ya que hay dos sitios de reconocimiento para esta enzima. Al digerir el DNA del plásmido con la enzima *Alu*I se forman muchos fragmentos (carril A), ya que hay varios sitios de reconocimiento para esta enzima en el DNA del plásmido (figura II.14). En el extremo izquierdo del gel aparecen números que indican el tamaño, en número de nucleótidos, de los fragmentos de DNA que se generan.

cruzamiento covalente de los polímeros de acrilamida y su monómero bisacrilamida. Con estos polímeros puede obtenerse una amplia gama de tamaños de poro variando las proporciones de acrilamida-bisacrilamida y el grado de polimerización y de esta manera se controla el tamaño del fragmento de DNA que se mueve por el gel. Por regla general, los geles de agarosa al 1% pueden resolver y separar fragmentos lineales de DNA en el rango de 30 a 0.2 kilonucleótidos (30 000 a 200 nucleótidos), mientras que los geles al 7.5% de poliacrilamida resuelven fragmentos de 2 a 0.05 kilonucleótidos (2 000 a 50 nucleótidos).

Los fragmentos de DNA sometidos a electroforesis se pueden visualizar si se les tiñe, por ejemplo, con sustancias que fluorecen al ser irradiadas con luz ultravioleta, como es el caso del bromuro de etidio. Para ello, los

geles de agarosa o acrilamida se sumergen directamente en una solución de este compuesto, el cual se intercala entre las dos hélices del DNA, y así las bandas de DNA se observan de color blanco-naranja al irradiar el gel con luz ultravioleta. Importa destacar que la intensidad de la tinción es directamente proporcional al tamaño de los segmentos de DNA; en consecuencia, las bandas de mayor peso molecular tendrán fluorescencia más intensa que las bandas de menor peso molecular (figura II.9).

Cada fragmento de DNA observado en el gel representa una población homogénea en tamaño de moléculas de DNA, de modo que el análisis de patrones de restricción de genomas pequeños o segmentos de DNA clonados constituye un poderoso método para el estudio de estos DNAs.

Síntesis química de DNA

La síntesis por métodos químicos de oligonucleótidos ofrece la posibilidad de generar secuencias de DNA que no existen en la naturaleza. Se han desarrollado métodos manuales y automáticos de gran eficiencia para sintetizar cadenas sencillas de DNA (de longitud hasta de 150 nucleotidos), mediante la adición progresiva de nucleótidos en dirección 3' a 5'. Se ha demostrado que los fragmentos de DNA y los genes sintéticos son totalmente funcionales *in vivo*. Generalmente se utilizan fragmentos pequeños de DNA de secuencias específicas para adaptar y conectar moléculas de DNA durante los procesos de clonación y de expresión. Así, es posible "editar" las moléculas de modo análogo como se editan las películas cinematográficas. Recientemente, el uso de oligonucleótidos sintéticos de DNA se ha incrementado notablemente por la demanda y requerimiento de este tipo de reactivo en la reacción en cadena de polimerasa o PCR, técnica que se describe más adelante, así como para determinar la secuencia de fragmentos de DNA utilizando el método descrito por Sanger, como se muestra en la siguiente sección (12, 13, 14).

Métodos para determinar la secuencia de nucleótidos del DNA

Una vez que se ha aislado un gene deseado, este DNA puede ser analizado tanto en su estructura como en su función. Los mapas de restricción y la determinación de la secuencia nucleotídica permiten conocer

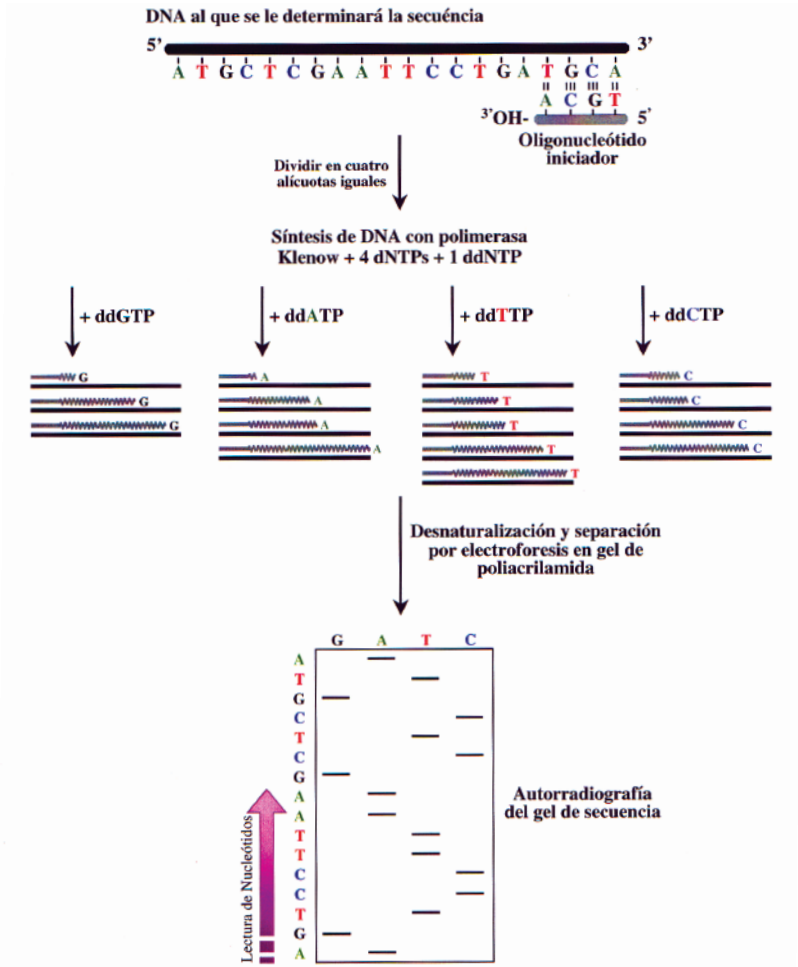


Figura II.10

MÉTODO ORIGINAL DESCRITO POR SANGER PARA DETERMINAR LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS DEL DNA

En este método se utilizan nucleótidos normales marcados radioactivamente para poder observar las cadenas sintetizadas *de novo*. Además, esta técnica utiliza también derivados de nucleótidos normales, que se denominan 2'-3'-dideoxirribonucleótidos, de cada uno de los cuatro nucleótidos, en cuatro reacciones separadas. Estas moléculas de dideoxis pueden también ser incorporadas al DNA por la enzima DNA polimerasa, generando así una colección de fragmentos que, sin embargo, ya no pueden ser elongados adicionalmente cuando se ha incorporado uno de estos dideoxinucleótidos. Los fragmentos de DNA así generados, se separan en un gel de poliacrilamida y se obtiene una autorradiografía del gel. De esta forma, se observan las bandas radioactivas donde las de menor tamaño corresponden al extremo 5' de la molécula original.

la estructura del gene, en tanto que para caracterizar funcionalmente el fragmento de DNA, es necesario utilizar estrategias más complejas. La determinación de la secuencia de nucleótidos del DNA ha representado un paso importante en la caracterización estructural inicial de los genes. Si ésta se conoce, es posible analizar cualquier fragmento de DNA para detectar regiones regulatorias, genes estructurales, intrones, etc., así como la secuencia de aminoácidos para la que codifica. A este respecto, procede señalar que el desarrollo de programas de computación que permiten comparar secuencias de DNA de diferentes orígenes de manera eficiente, es una herramienta poderosa para realizar este tipo de análisis. Actualmente se dispone de bancos de información, donde pueden consultarse y compararse todas las secuencias de los genes y de los genomas y proteomas que han sido publicadas tal y como se describe en detalle en el capítulo III.

Son dos los procedimientos desarrollados originalmente para determinar la secuencia del DNA: la técnica enzimática ideada en 1975 por Sanger, Nicklen y Coulson (15, 16), y la técnica química elaborada por Maxam y Gilbert en 1977 (17). Ambos métodos descansan en el principio teórico de la generación de fragmentos de DNA de diferente tamaño según la posición de cada nucleótido en la cadena de DNA. Con el método químico, los fragmentos se obtienen por ruptura química de las bases, mientras que con la técnica enzimática los fragmentos se generan por síntesis de DNA utilizando una DNA polimerasa.

El método enzimático es el que ha sido más usado debido a su gran eficiencia, ya que se pueden leer varios miles de nucleótidos en poco tiempo (figura II.10). Además, se ha desarrollado una amplia gama de vectores específicos que permiten obtener grandes cantidades de DNA de cadena sencilla, fácilmente purificables. Por otro lado, más recientemente se han desarrollado métodos automatizados de secuenciación que permiten una lectura mucho más rápida de la secuencia del DNA, y *de facto,* han permitido secuenciar los genomas de muchos organismos, incluyendo el humano, en tiempos muy cortos, tal y como veremos en el próximo capítulo.

Reacción en cadena de polimerasa o PCR

La enzima DNA polimerasa que se utiliza por las células para la síntesis del DNA, es el elemento fundamental que sustenta la metodología de la

"reacción en cadena de polimerasa" o PCR (por sus siglas en inglés). Mediante esta técnica poderosísima desarrollada por Mullis (18, 19), es posible sintetizar, en pocas horas, millones de copias de un gene o de una región específica de DNA, a partir de cualquier genoma. Para lograr este propósito, el DNA que se desea amplificar o copiar extensivamente, es desnaturalizado —separar a sus dos hélices— utilizando calor como primer paso (figura II.11). Posteriormente, a cada una de las dos hebras del DNA desnaturalizado, se les asocia por hibridación, un fragmento de DNA sintético de hélice sencilla. Esta región de doble hélice que se forma en ambas hélices sirve ahora como sustrato o "prímero" para que la DNA polimerasa sintetice, de manera análoga a como lo hace *in vivo,* copias nuevas de las dos hebras de DNA, teniendo como molde las hebras originales. De esta forma, y como resultado de un primer ciclo de amplificación, se obtienen dos dobles hélices idénticas a partir de una doble hélice (figura II.11).

Para lograr una verdadera amplificación, la reacción se somete a varios ciclos alternos de calentamiento y enfriamiento para permitir el funcionamiento de la enzima de manera que el iniciador o prímero sea utilizado para sintetizar cadenas nuevas de DNA de manera exponencial (figura II.12). La enzima DNA polimerasa obtenida de un microorganismo termorresistente, *Thermos aquaticus,* es una enzima que no se desnaturaliza por calor y que trabaja a altas temperaturas (72 °C). Esta propiedad permite desnaturalizar el DNA de interés para ser polimerizado sin destruir la enzima, y así se puede multiplicar rápidamente el número de copias de un fragmento específico de DNA. Es posible aislar y amplificar genes específicos, si se tiene la secuencia de un fragmento de DNA del propio gene o de una sección del DNA cercana al gene de interés —sin tener que clonar el gene— utilizando esta técnica de PCR (19, 20).

El vehículo molecular; herramienta fundamental para la clonación molecular y expresión de DNA

Otro tipo de herramienta fundamental para la ingeniería genética, además de las enzimas que manejan ácidos nucleicos, son los llamados vehículos moleculares para la clonación, manipulación y expresión de DNA. Estos vehículos o vectores de clonación molecular son en esencia moléculas pequeñas de DNA que tienen la capacidad de replicarse en forma autónoma a la de los cromosomas celulares, por tener un origen

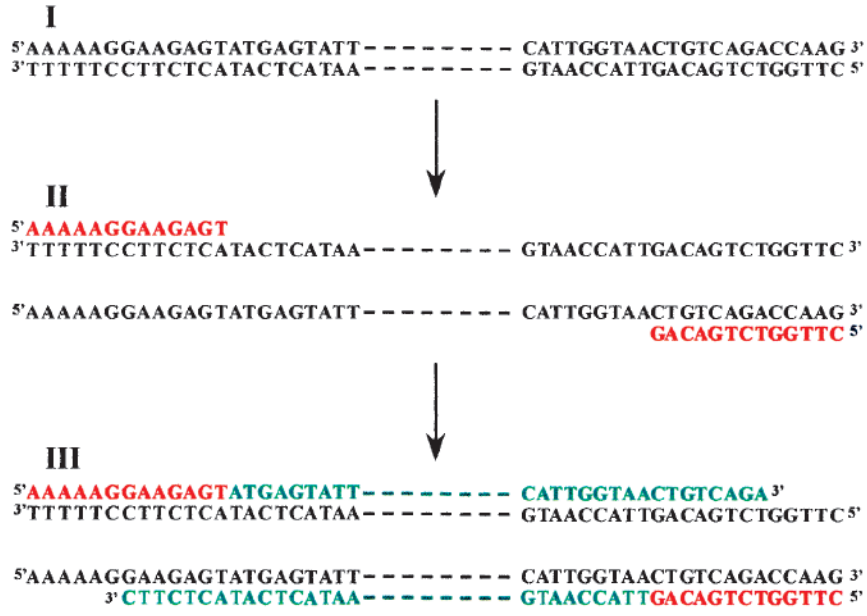


Figura II.11

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE DNA UTILIZANDO DNA POLIMERASA Y OLIGONUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS COMO INICIADORES: EL MÉTODO "PCR"

La sección I de la figura muestra el segmento de DNA de doble cadena que se desea amplificar. Como se observa en la sección II, al calentar el DNA, las dos hélices se separan y, al agregar los primeros específicos de 13 nucleótidos (fragmentos sintéticos de hélice sencilla de DNA señalados en rojo), se hibridan específicamente a sus secuencias complementarias en los extremos 3' de cada secuencia blanco. En la sección III se observa cómo la enzima DNA polimerasa utiliza estos primeros para comenzar la síntesis de nuevas cadenas complementarias utilizando el DNA como templado, siempre en la dirección 5' a 3'.

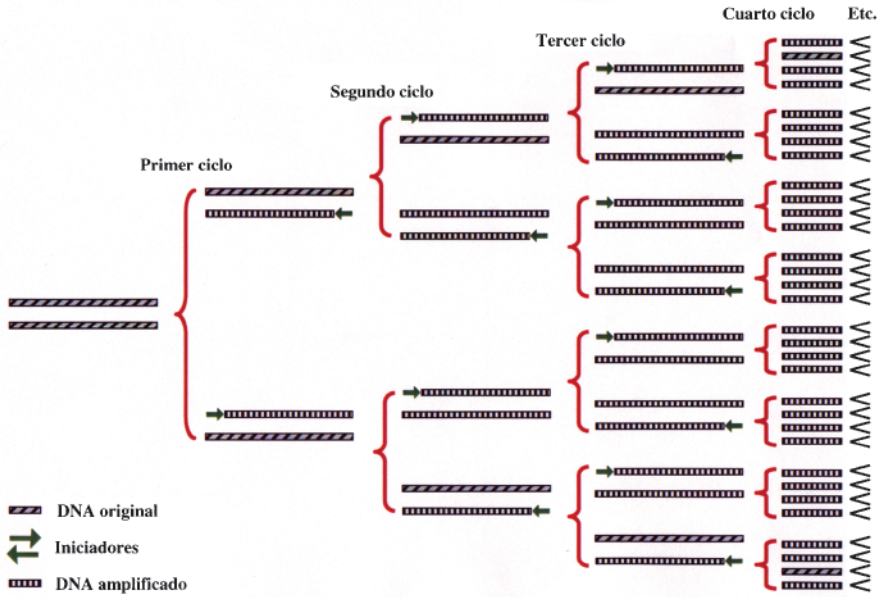


Figura II.12

CICLO DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA DNA POLIMERASA

La figura muestra el ciclo descrito en la figura anterior donde la muestra de DNA que se desea amplificar se calienta con el objetivo de separar sus cadenas (desnaturalización inicial). Posteriormente, la mezcla de reacción se somete a repeticiones de ciclos de hibridación de prímeros, síntesis de DNA y desnaturalización. La secuencia original de DNA se duplica en concentración cada ciclo que se lleva a cabo.

propio para el inicio de la replicación del DNA. Entre este tipo de moléculas se encuentran los DNA de los virus y los elementos extracromosomales llamados plásmidos. Es importante recordar que existe un número pequeño de orígenes del inicio de la replicación del DNA en los cromosomas de los organismos vivos y que por ende la mayor parte de los fragmentos de DNA que se generan utilizando nucleasas o cualquiera de los otros métodos descritos, a partir de los cromosomas celulares, no son capaces de replicarse en forma autónoma. Los vehículos o vectores para la clonación molecular de DNA se han construido a partir de entidades extracromosomales con capacidad de replicación autónoma, conocidos con el nombre de “replicones”.

Entre estos elementos se encuentran los plásmidos, los cuales están constituidos por una doble cadena de DNA circular y se les encuentra en forma natural en una gran variedad de microorganismos. Estas unidades autorreplicativas y extracromosomales intervienen y codifican para funciones importantes tales como la resistencia a antibióticos, a metales pesados y a radiaciones; codifican también para enzimas de restricción y determinantes de virulencia bacteriana y, finalmente, participan en el fenómeno de la fijación biológica de nitrógeno. Los plásmidos naturales varían considerablemente en tamaño, algunos pueden movilizarse de una célula a otra y pueden llegar a coexistir varios de ellos dentro de la misma célula (figura II.13).

El DNA de los bacteriófagos y el de los virus también puede ser utilizado como vector, para bacterias el primero y para células vegetales o animales el segundo. Estas entidades normalmente alteran las células que infectan induciéndoles, en algunos casos, un estado patológico. El DNA de bacteriófagos, virus y plásmidos naturales, se utilizó en un principio como vector de clonación. Sin embargo, el diseño y la construcción de derivados y recombinantes de diversos orígenes, han permitido estructurar vehículos moleculares no virulentos, sofisticados y especializados (21, 22). Para que el vector de clonación y expresión sea fácil de manejar debe poseer las características siguientes:

a) Caracterización funcional, especialmente en lo que se refiere al proceso de la replicación.
b) Total caracterización estructural, incluyendo la localización de genes y el conocimiento de la secuencia nucleotídica.
c) Tamaño pequeño, ya que la eficiencia de entrada a la célula huésped (transformación) disminuye al aumentar el tamaño del DNA. Además, la capacidad de los vectores para recibir DNA pasajero tiene un límite y la caracterización del DNA es más sencilla en vehículos pequeños.
d) Estabilidad dentro del huésped, ya que en algunos casos los vectores son degradados o se pierden durante la división celular (fenómeno denominado “segregación”).
e) La presencia de genes, llamados marcadores de selección, que permitan diferenciar las células que llevan el vector de aquellas que no lo contengan.
f) La presencia de varios sitios únicos de reconocimiento de enzimas de restricción dentro de los genes que se utilizan como marcadores.

g) La capacidad de “amplificar” su número de copias, lo cual facilita la obtención de grandes cantidades del vehículo por célula.
h) La posibilidad de insertarse en sitios específicos del cromosoma del huésped.

Figura II.13

PLÁSMIDOS

La figura muestra una fotografía tomada con microscopio electrónico de moléculas de DNA circular del plásmido pBR322.

Cualquier vector de uso general debe poseer estas propiedades. Sin embargo, los vectores para usos específicos, como la producción de proteínas o la secuenciación de DNA, poseen características especiales adicionales. En particular el vehículo para expresión de DNA debe tener uno o varios promotores localizados en posiciones adecuadas y que puedan ser regulados en la célula huésped, para poder controlar así la expresión de genes heterólogos, en el sistema de expresión seleccionado. Los plásmidos son hoy día los vehículos moleculares más utilizados, motivo por el cual las explicaciones siguientes se basarán en el empleo de estas entidades biológicas como vectores de clonación y expresión.

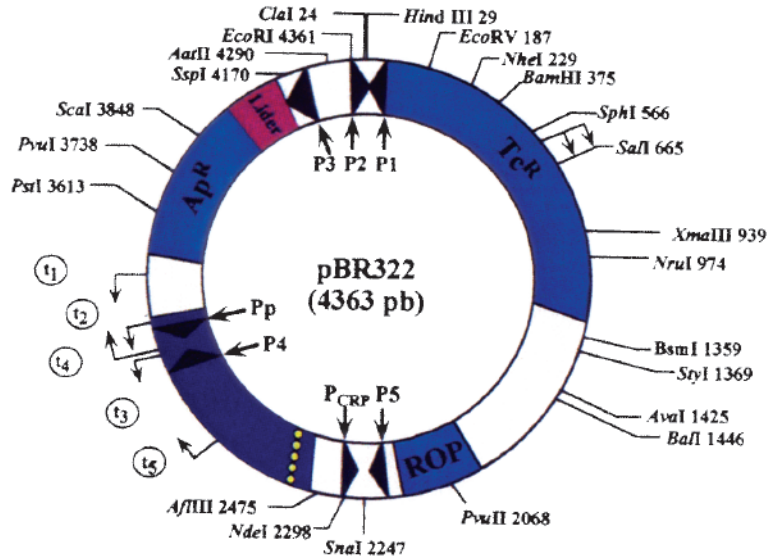


Figura II.14

MAPA GENÉTICO DEL PLÁSMIDO pBR322

Este plásmido fue diseñado para la clonación, caracterización y expresión de material genético. Mediante su uso y el de varios de sus derivados, se han podido aislar, caracterizar y expresar miles de genes de diferentes orígenes. Este plásmido tiene dos genes que confieren a la bacteria que los lleva, resistencia a los antibióticos tetraciclina y ampicilina, y tiene también un origen para la replicación de su DNA. En el diagrama se muestran también varios sitios únicos de corte para diferentes enzimas de restricción, los terminadores de la transcripción, los promotores conocidos y la secuencia ROP que participa en el control del número de copias del plásmido. El plásmido consta de 4363 pares de nucleótidos y la secuencia de estos nucleótidos de este DNA circular ha sido determinada.

Para la clonación y caracterización de DNAs de diferentes orígenes, se ha diseñado y construido un gran número de vehículos moleculares sofisticados. Un ejemplo de estos vehículos es el plásmido pBR322 el cual fue construido para contender con muchos de los problemas que presentaban los primeros vehículos moleculares. Este plásmido permitió la clonación de cerca de los 2000 primeros genes aislados de diferentes organismos, y gracias a sus múltiples derivados ha sido posible clonar, caracterizar y expresar DNA de distintos orígenes en diferentes organismos (21, 22) (figuras II.14 y II.15).

Como ya se ha mencionado, Cohen y Boyer realizaron en 1973 el primer experimento de clonación molecular de DNA de una rana, en la bacteria *Escherichia coli*. Este experimento fue posible gracias al uso de enzimas como las endonucleasas de restricción que cortan moléculas grandes de DNA en sitios específicos, generando fragmentos más pequeños de DNA con extremos "cohesivos" o rasurados y a la enzima ligasa que genera las uniones covalentes entre fragmentos de DNA. Así, el experimento utilizó la endonucleasa de restricción *Eco*RI con la cual se dirigió por un lado DNA de rana y por otro DNA de un plásmido proveniente de *E. coli*. Posteriormente, estas moléculas DNAs de diferentes orígenes, fueron mezcladas y puestas en contacto con la enzima ligasa de DNA, la cual generó las uniones covalentes entre el DNA de la rana y el del plásmido proveniente de la bacteria. De esta manera se unió el material genético de estos dos organismos, formándose moléculas "híbridas o recombinantes" que contenían tanto el DNA de la rana como el del plásmido bacteriano.

Estas moléculas híbridas fueron luego introducidas en la bacteria *Escherichia coli* (mediante el fenómeno de transformación), en donde gracias al origen de replicación del plásmido bacteriano, se pudo replicar todo el DNA de la molécula recombinante, incluyendo el de la rana. De esta manera se generaron colonias de bacterias en donde todas las células de estas colonias llevaban DNA de rana insertado en el DNA del plásmido bacteriano y así fue "clonado molecularmente" el DNA de la rana en *Escherichia coli* (23) (figura II.15).

El diseño y construcción de sistemas de expresión de material genético para la producción de proteínas

La capacidad técnica para realizar experimentos de clonación molecular de DNA de cualquier origen en bacterias, abrió la posibilidad de uti-

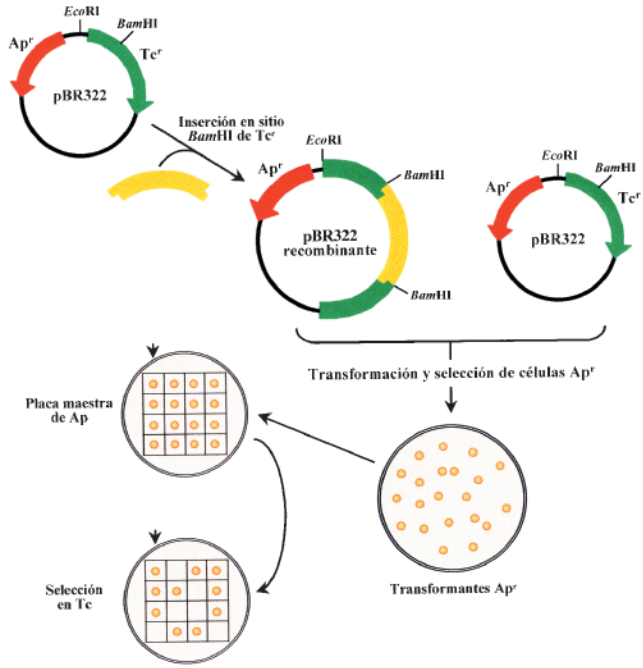


Figura II.15

CLONACIÓN MOLECULAR DE DNA EN EL PLÁSMIDO pBR322

El plásmido pBR322, al tener dos genes de resistencia a antibióticos, permite una selección indirecta de las células que portan plásmidos recombinantes. La figura muestra cómo se inserta DNA de cualquier origen, en el sitio *Bam*HI localizado en el plásmido en el gene que confiere resistencia a tetraciclina. La mezcla resultante de moléculas de DNA recombinadas se usa para transformar a una población bacteriana. Mediante el fenómeno de la transformación, es posible introducir en la mayor parte de una población de células bacterianas, las moléculas de DNA recombinantes, las cuales una vez dentro de cada célula, se replican y dan lugar a células transformadas estables. Esta población de células se coloca a su vez en un medio de cultivo que contiene el antibiótico ampicilina, para seleccionar así aquellas que fueron transformadas por plásmidos. En la figura, se muestra un círculo con puntos amarillos. El círculo representa una caja de Petri, donde están creciendo las colonias bacterianas que están representadas por los puntos amarillos. Cada colonia proviene de una célula transformada. Posteriormente, se replican las colonias en cajas independientes con un medio de cultivo que lleva ampicilina y tetraciclina. Aquellas colonias que llevan plásmidos que les confieren resistencia a ampicilina y que simultáneamente son tetraciclina sensibles, muy probablemente llevan un fragmento de DNA clonado, que ha interrumpido el gene de tetraciclina.

El primer experimento para la clonación molecular de DNA utilizó al plásmido pSC101, precursor del pBR322, como vehículo. El DNA que se insertó en este plásmido fue un DNA proveniente de la rana.

lizar esta metodología para la producción de proteínas humanas y de otros seres vivos en microorganismos. Sin embargo, para alcanzar realmente este objetivo fue necesario desarrollar inicialmente sistemas bacterianos de expresión de material genético que permitieran la producción controlada de los genes de interés en el microorganismo productor. Lo anterior se logró incorporando en los vehículos moleculares de clonación de DNA, como pBR322, aquellos elementos de regulación de la expresión genética adecuados para cada experimento. En lo general, los sistemas de expresión genética implican incorporar un promotor regulable, así como elementos de terminación de la transcripción, antes y después del gene, respectivamente, que se desea expresar. De esta manera es posible controlar la expresión de genes específicos para lograr la producción de proteínas heterólogas en bacterias.

La expresión de genes heterólogos en otros organismos se ha ido desarrollando de manera paralela al trabajo en bacterias. Así, hoy se tienen sistemas de expresión donde los huéspedes pueden ser otros microorganismos y células de animales o vegetales, así como los propios organismos superiores (dando lugar a los organismos transgénicos, tal y como se verá en el cuarto capítulo). Cada sistema de expresión tiene ventajas y desventajas propias y por ello, en la selección del sistema de expresión y del huésped, se deberá contemplar una serie de consideraciones con relación al producto proteico esperado, entre las que resaltan: el tamaño de la proteína a expresar, las modificaciones postransduccionales deseadas, la toxicidad de ciertas proteínas para algunas células, la estructura que se obtiene de la proteína al expresarla en cierto huésped, que en algunos casos tiene como resultado la precipitación y la formación de cuerpos de inclusión.

Indudablemente ésta es un área metodológica y de ingeniería muy relevante para poder desarrollar sistemas rentables que permitan la producción de proteínas recombinantes por la industria y por ello se trabaja en el diseño y la optimización permanente de muchos de estos sistemas y en el desarrollo de nuevos. En el capítulo cuarto se señala cómo este conjunto de técnicas de expresión genética y fermentación, ha permitido la producción de muchas proteínas recombinantes que hoy se utilizan para el tratamiento de diferentes problemáticas.

Además, en la segunda sección de este libro se presentan ejemplos específicos del uso de la ingeniería genética para el desarrollo de organismos transgénicos responsables de varios ejemplos exitosos del uso de esta metodología.

1. Linn, S., W. Arber. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli. In vitro* restriction of phage fd replicative form. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 59: 1300-1306 (1968).
2. Smith, H., K. Wilcox. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae,* I. Purification and general properties. *J. Mol. Biol.*, 51: 379-391 (1970).
3. Kelly, T., Jr., H. Smith. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae,* II. Base sequence of the recongnition site. *J. Mol. Biol.,* 51: 393-409 (1970).
4. Roberts, R. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucl. Acids Res.,* 11: 135-167 (1983).
5. Jackson, D., R. Symons, P. Berg. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 69: 2904-2909 (1972).
6. Kornberg, A. Biological synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science,* 131: 1503-1508 (1960).
7. Rougeon, F., P. Kourilsky, B. Mach. Insertion of the rabbit β-globin gene sequence into an *E. coli* plasmid. *Nucl. Acids Res.,* 2: 2365-2378 (1975).
8. Klug, W.S. Cummings M.R. *Conceptos de Genética.* Prentice Hall, Madrid (1999).
9. Rabbitts, T. Bacterial cloning of plasmids carrying copies of rabbit globin messenger RNA. *Nature*, 260: 221-225 (1976).
10. Grunstein, M., D. Hogness. Colony hybridization: method for the isolation of cloned DNAs that contains specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 72: 3961-3965, (1975).
11. Suggs, S., R. Wallace, T. Hirose, E. Kawashima, K. Itakura. Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human b2-microglobulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 78: 6613-6617 (1981).
12. Heyneker, H., J. Shine, H. Goodman, H. Boyer, J. Rosenberg, R. Dickerson, S. Narang, K. Itakura, S. Linn, A. Riggs. Synthetic lac operator is functional *in vivo. Nature*, 263: 748-752 (1976).
13. Korana, H. Total synthesis of a gene. *Science*, 203: 614-625 (1979).
14. Itakura, K., A. Riggs. Chemical DNA synthesis and recombinant DNA studies. *Science*, 209: 1401-1405 (1980).
15. Sanger, F., F. Coulson. Rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 94: 444-448 (1975).
16. Sanger, F., S. Nicklen, F. Coulson. DNA sequencing with -chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 74: 5463-5467 (1977).
17. Maxam, R., W. Gilbert. New method of sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 74: 560-564 (1977).
18. Saiki, R., S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn, H. Erlich, N. Riheim.

Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230: 1350- 1354 (1985).
19. Mullis, K., F. Faloona. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.*, 55: 335-350 (1987).
20. Brutlag, D., A. Kornberg. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid: proofreading function for the 3' to 5' exonuclease activity in deoxyribonucleic acid polymerases. *J. Biol. Chem.*, 247: 241-248 (1972).
21. Bolívar, F., R. Rodríguez, P. Greene, M. Betlach, H. Heyneker, H. Boyer, J. Crosa, S. Falkow. Construction and characterization of new cloning vehicles, II: multi-purpose cloning system. *Gene*, 2: 95-113 (1977).
22. Yanisch-Peron, C., J. Vieira, J. Messing. Improved M13 phage-cloning vectors and host strains. *Gene*, 33: 103-119 (1985).
23. Cohen, S., Chang, H. Boyer, R. Helling. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 70: 3240-3244 (1973).

Capítulo III

CIENCIA GENÓMICA, PROTEÓMICA Y BIOINFORMÁTICA
EL GENOMA, EL TRANSCRIPTOMA Y EL PROTEOMA HUMANO

F. G. Bolívar Zapata

Genes interrumpidos en eucariontes; síntesis y procesamiento de RNA

El avance de las metodologías de la ingeniería genética, a principios de la década de los años ochenta en el siglo pasado, cataliza un esfuerzo muy importante encaminado al aislamiento y la caracterización de genes de organismos superiores incluyendo el humano, con el objetivo general de entender en detalle la organización y la expresión de los genes. Así, utilizando diferentes estrategias y metodologías, se aísla un primer conjunto de DNA complementarios a partir de copiar moléculas de RNA mensajeros específicos (figura II.8), los cuales fueron, a su vez, utilizados para aislar los genes correspondientes a partir directamente del DNA cromosomal. Sorpresivamente, muchos de los genes cromosomales de organismos superiores resultaron tener un mayor número de nucleótidos, es decir un mayor tamaño, que los DNA complementarios correspondientes utilizados para aislarlos. Tras un análisis cuidadoso de estos resultados, que incluyó la determinación de la secuencia del material genético, fue posible concluir que a diferencia de las bacterias, la mayor parte de los genes que codifican para proteínas en los organismos superiores están constituidos por dos tipos de regiones de DNA. El primer tipo son regiones que codifican para una proteína, llamadas "exones", y el segundo tipo son regiones de DNA que no codifican para esa proteína, a las cuales se les denominó "intrones". El DNA complementario, obtenido a partir de RNA mensajeros (figura II.8), sólo lleva o está constituido por las regiones de DNA que son los exones, y por eso siempre es de menor tamaño que el gene a nivel del DNA cromosomal, el cual lleva también los intrones.

Hoy sabemos que las células de organismos superiores, han desarrollado mecanismos muy sofisticados para procesar el RNA que se produce durante la transcripción de un gene en el núcleo de la célula. La trans-

cripción del DNA en RNA, tal y como fuera explicada en el primer capítulo, genera una molécula de RNA que es copia fiel del DNA transcrito (figura I.10). En el caso de las bacterias, las moléculas de RNA mensajero son directamente traducida en proteínas. Sin embargo, en el caso de los organismos eucariontes, la mayor parte de los transcritos de RNA mensajero son procesados, para ser transformados en los RNA mensajeros maduros que se traducen en proteína a nivel de los ribosomas.

En la figura III.1, se muestra la estructura del gene, a nivel del genoma, que codifica para la proteína β-globina, que es parte de la hemoglobina de la sangre en los seres humanos. Como puede verse en esta figura, este gene a nivel del cromosoma, está constituido por alrededor de 1600 pares de nucleótidos, de los cuales sólo 600 corresponden a tres secuencias de exones y los otros 1 000 pares de nucleótidos integran dos secuencias de intrones. Al sintetizarse RNA a partir de este gene, se genera una primera molécula de "RNA premensajero" de aproximadamente 1600 pares de nucleótidos. Este RNA es posteriormente "procesado" en el interior del núcleo de la célula. Este procesamiento consiste en remover fragmentos específicos de RNA, que en este caso del gene que codifica para la β-globina, corresponden a dos intrones, para generar así un RNA mensajero que sólo lleva la secuencia correspondiente a los tres exones. Al final de esta secuencia que codifica para los tres exones se localiza otra, a la que se le denomina "cola de poli A", que está presente en casi todos los RNA mensajeros de los organismos eucariontes. Este RNA mensajero de aproximadamente 600 pares de nucleótidos, es traducido a nivel de los ribosomas en la proteína β-globina humana que es una cadena polipeptídica de aproximadamente 150 residuos de aminoácidos (1) (figura I.15).

Es importante señalar que en términos generales, el procesamiento del RNA premensajero, puede ser realizado de manera alternativa para el caso de varios genes, en cuanto a los fragmentos del RNA premensajero que son removidos. De hecho, se ha reportado que al menos 38% de los genes humanos que codifican para proteínas pudieran tener un procesamiento diferente y alternativo de su RNA premensajero, lo que implica que a partir de un RNA de este tipo se pudieran generar al menos dos RNA mensajeros diferentes (del mismo RNA premensajero) y de esta manera generar, a su vez, al menos dos proteínas diferentes a partir de un gene, tal y como se verá más adelante (2, 3, 4, 5).

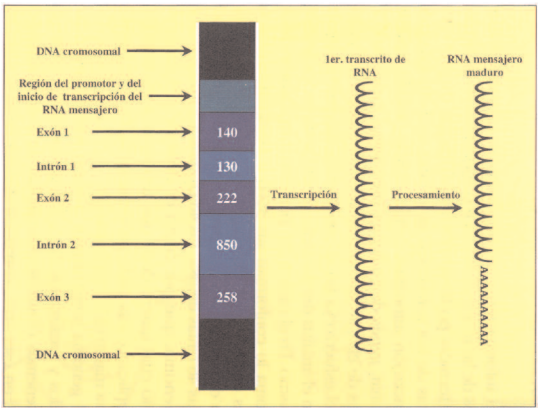


Figura III.1

ORGANIZACIÓN DEL GENE DE LA PROTEÍNA β-GLOBINA

El gene que codifica para la proteína β-globina está formado por tres exones y por dos intrones, cuyos tamaños se señalan a nivel del DNA. Como resultado del proceso de transcripción de este gene, se produce una primera molécula de RNA que es copia fiel de todo el gene, incluyendo los exones y los intrones. Las regiones de RNA codificadas por los intrones en este RNA precursor, son removidas a nivel del núcleo por enzimas específicas, generándose así la molécula de RNA mensajero madura, a la cual se le une una "cola de Poli A" formada por varios residuos de adenina. Esta molécula de RNA mensajero es transportada al citoplasma y ahí traducida en β globina a nivel de los ribosomas.

El genoma, el transcriptoma y el proteoma del organismo vivo

Con toda esta información y gracias al mejoramiento y sofisticación continuos de las técnicas del DNA recombinante, en particular la aparición de técnicas poderosas de amplificación de DNA (PCR) y de secuenciación automática de DNA, hoy es posible analizar, inclusive sin clonar, genes de cualquier organismo, incluyendo los del hombre. A través de ello, inició la etapa o la era del genoma, en la cual el esfuerzo ya no se concentra solamente en genes aislados, sino en el análisis del conjunto de todos los genes presentes en un organismo. En el caso de las bacterias, organismos unicelulares, su genoma lo conforman los 3 000 a 5 000 genes que se localizan en sus cromosomas, dependiendo de la especie (figura III.2). En el caso de los humanos, tenemos entre 20 000 y 25 000 genes que codifican para proteínas localizados en las 46 cintas de DNA, los 46 cromosomas que conforman nuestro genoma, que por cierto es diploide (23 pares de cromosomas), lo cual quiere decir que tenemos la información genética por duplicado, una parte proveniente de nuestro padre y la otra de nuestra madre (6, 7) (figura I.3).

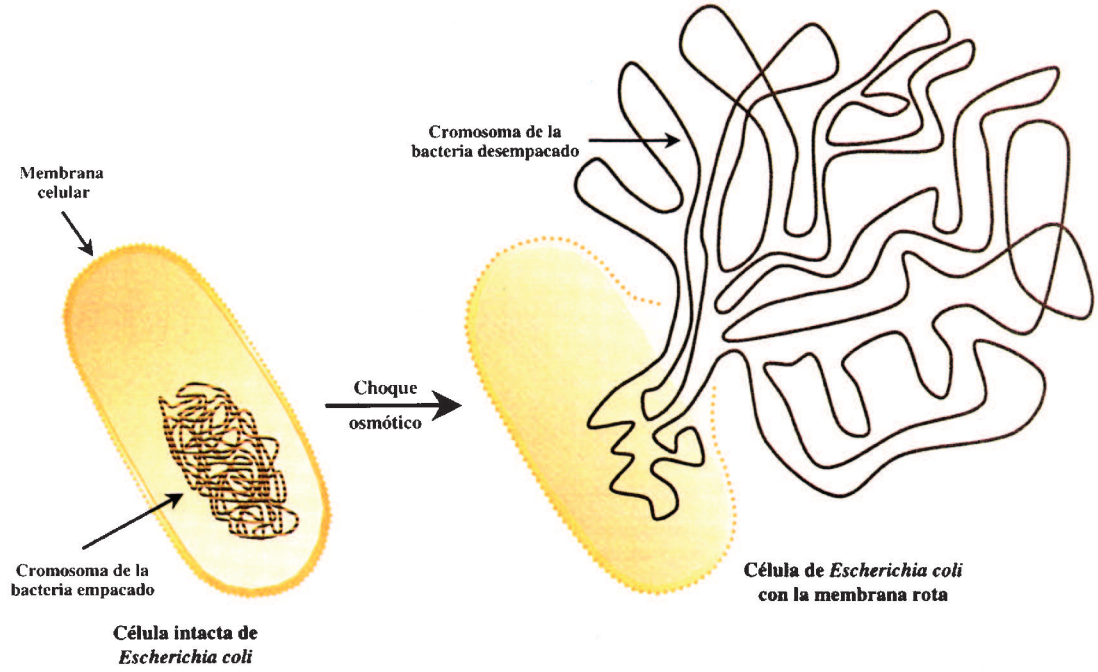


Figura III.2

EL GENOMA DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

La figura muestra un diagrama de la bacteria *E. coli,* en la cual aparece el cromosoma bacteriano en forma empaquetada.

Al someter la bacteria a un choque osmótico, ocurre un rompimiento de la membrana bacteriana, y el único cromosoma de esta bacteria se desorganiza, se desempaca y eventualmente se fragmenta. En la figura se muestra el cromosoma desempacado, que mide un milímetro, y en el que se encuentran localizados los 4 464 genes que conforman el genoma de este organismo.

Al inicio de la era del genoma, el objetivo fue conocer primeramente cuál era la secuencia de nucleótidos de todos los genes de un organismo y con ello iniciar el análisis de cómo están organizados y localizados todos los genes en los cromosomas; es decir, el objetivo global era contribuir a determinar los "mapas genéticos" de los seres vivos. Asimismo, se busca también conocer cómo se regulan y en qué tipo de procesos celulares participan los genes y sus productos. En geografía, un mapa es la posición que guarda un país con respecto a los otros países en el planeta. En genética, un mapa es la posición que guarda un gene con respecto a los otros genes en las cintas de DNA que forman los cromosomas de un determinado organismo (figuras I.3, I.4 y III.3). El genoma es, pues, el conjunto de todos los pares de nucleótidos, que incluyen el total de los genes y otras secuencias de DNA que se encuentran en nuestros cromosomas.

El transcriptoma es el conjunto de todos los transcriptos de RNA que se pueden generar a partir del genoma. Los transcriptos de RNA están involucrados en muchas funciones celulares ya sea directamente como moléculas biológicas activas de RNA, o indirectamente a través de las proteínas que codifican los RNA mensajeros. El conocimiento del genoma y de su transcripción han avanzado y hoy sabemos que existen además de los RNA ribosomales (rRNA) y de transferencia (tRNA), muchísimos transcritos de RNA pequeños tales como microRNA, iRNA, snRNA, codificados por genes que frecuentemente están entre genes que codifican para proteínas. Muchos de estos RNAs pequeños juegan papeles importantes en la regulación de la traducción de los RNA mensajeros de genes que codifican para proteínas. Además, algunos de estos RNAs pequeños aparentemente se asocian a la eucromatina inhibiendo la transcripción y se han asignado también posibles papeles en la diferenciación celular a estos RNA pequeños. Así, aparentemente el número de transcritos de RNA pequeños pudiera superar al de los transcritos de RNA mensajero en los genomas de los eucariontes (8, 9, 10).

El proteoma de un organismo es el conjunto de todas las proteínas que puede sintetizar ese organismo a partir de la información localizada en sus genes, que codifican proteínas. Los humanos tenemos poco más de veinte mil genes que codifican para proteínas en cada célula de nuestro organismo, lo cual implica que podemos fabricar en nuestro organismo al menos veinte mil proteínas (ya que el procesamiento diferencial de ciertos transcritos de RNA premensajeros de algunos genes huma-

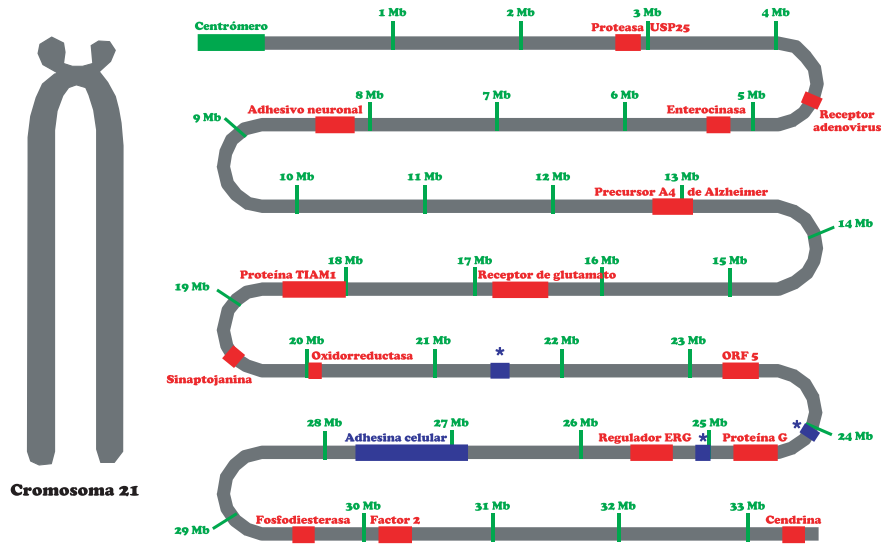


Figura III.3

MAPA GENÉTICO DEL CROMOSOMA HUMANO 21

Esquema del cromosoma humano 21, cuya secuencia nucleotídica fue determinada en el año 2000. En la figura se muestra la posición de algunos de los 225 genes que codifican para proteínas localizados en este cromosoma y entre ellos se señalan algunos de los involucrados en la enfermedad conocida con el nombre de síndrome de Down, que ocurre cuando este cromosoma se encuentra presente en las células en tres copias, en vez de dos, que es lo normal.

nos permitirá sintetizar más proteínas; ver más adelante). En cambio, las bacterias que tienen entre tres y cinco mil genes que codifican para proteínas en su genoma (dependiendo de la especie), no tienen intrones (por lo que no tienen procesamiento diferencial de sus transcritos de RNA), y por ello son capaces de sintetizar un proteoma de sólo 3 000 a 5 000 proteínas (11, 12) (figura III.4).

Se ha logrado ya determinar la secuencia nucleotídica de todo el genoma de cientos de virus, y bacterias y también de varios organismos eucariontes y con esto se consolida la ciencia genómica, que permite el análisis de las secuencias nucleotídicas de todos los genomas y de sus productos de RNA y proteína. El genoma de la bacteria *Escherichia coli* es uno de estos casos. Hoy se conoce la posición relativa en la cinta genética de

su único cromosoma, de los 4 464 genes que codifican para proteínas que constituyen el genoma de este microorganismo (11) (figura III.2). Gracias a esto, somos capaces de listar todas las 4 464 proteínas que puede sintetizar a través de la transcripción de estos genes en esta célula y que constituye su proteoma, cuya interacción hace posible los procesos de crecimiento y división de este organismo unicelular.

En el caso de los organismos eucariontes, que son aquellos que, a diferencia de los procariontes (bacterias), tienen todos sus cromosomas integrando el núcleo de la célula y rodeados por la membrana del núcleo, se han ya determinado las secuencias nucleotídicas completas de los genomas de varios de ellos, entre los que destacan el de la levadura, cuyo nombre científico es *Saccharomyces cerevisiae,* que es un microorganismo unicelular que se utiliza en la producción de alcohol; el de un gusano llamado *Caenorhabditis elegans;* el de la mosca de la fruta llamada *Drosophila melanogaster;* los de las plantas *Arabidopsis thaliana* y arroz; del ratón y del chimpancé y el genoma de la especie humana.

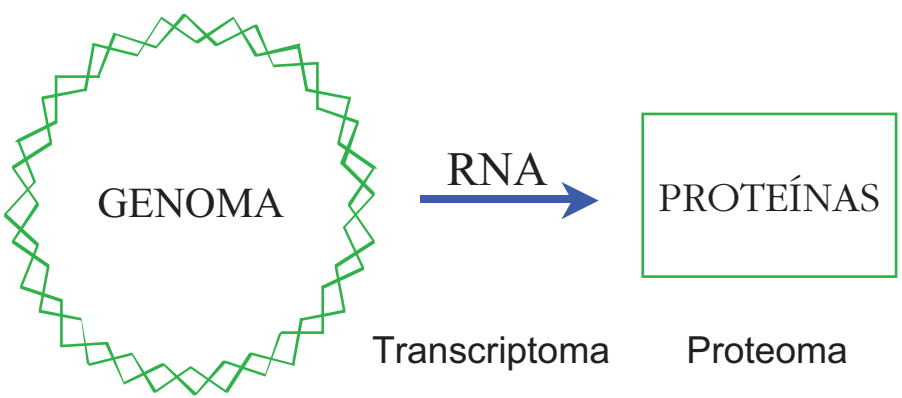


Figura III.4

EL GENOMA, EL TRANSCRIPTOMA Y EL PROTEOMA

El genoma es el conjunto de todo el material genético de un organismo y en él están incluidos todos los genes. El transcriptoma es el conjunto de transcritos de RNA que se producen a partir del genoma y el proteoma es el conjunto de todas las proteínas con las que cuenta un organismo.

La levadura es un organismo que tiene 16 pares de cromosomas los cuales contienen entre todos ellos 6 241 genes que codifican para proteínas (13). En el caso del gusano, este organismo tiene seis pares de cro-

mosomas y 19 099 genes (14), mientras que la mosca *Drosophila* tiene sólo cuatro pares de cromosomas y en ellos se localizan 13 601 genes que codifican para proteínas (15). La planta *Arabidopsis* tiene 25 mil 498 genes (16), en sus cinco pares de cromosomas y el arroz tiene entre 40 mil y 50 000 genes que codifican para proteínas en sus doce cromosomas (17, 18). Para el caso de la especie humana se reportó inicialmente que teníamos alrededor de 35 000 genes que codifican para proteínas aunque este número se ha actualizado y probablemente tenemos entre 20 000 y 25 000 genes, los seres humanos (5, 19, 20). Estudios comparativos entre los genomas, los transcriptomas y los proteomas de estos organismos demuestran que hay un gran conjunto de genes y de sus productos muy parecidos que se encuentran presentes en todos los organismos, incluyendo al hombre y que son responsables de sus funciones biológicas primarias. De hecho, compartimos la secuencia de alrededor de 98.5% de nuestro DNA con el chimpancé, 90% con el ratón y 30% con la mosca (figura III.5).

Las bases de datos de información genómica y proteómica. La bioinformática

Como se ha señalado, la ciencia genómica tiene como objetivo inicial el obtener la secuencia de nucleótidos de los genomas de los organismos vivos y de los virus. Existen ya miles de secuencias de genomas completos (la mayor parte virales) las cuales han sido depositadas en bancos de información en el Internet. A principios de los años ochenta, se tenía no más de 10^4 pares de nucleótidos en estos bancos de datos; en la actualidad este número es de 5×10^{10} pares de nucleótidos y la tendencia es de un incremento logarítmico. Uno de estos bancos, el Genbank que es público (21), tiene registrado un número muy importante de las secuencias generadas. Existen otros bancos públicos y privados en donde el acceso está limitado o tiene un costo económico. Además, también se han generado bases de datos especializadas, por ejemplo para el análisis de secuencias provenientes de virus (22, 23, 24).

Como se ha señalado, las secuencias de los nucleótidos de los genomas, permiten el análisis y la búsqueda de secuencias relacionadas entre dos o más organismos, con funciones específicas. De esta forma es posible, a través de la comparación de las secuencias, determinar o inferir funciones de una proteína que no ha sido previamente descrita en un

ORGANISMO	*Tamaño (Mn*)*	*No. Genes*	*No. Cromosomas*	*Densidad***
Escherichia coli (bacteria)	4.6	4 406	1	949
Saccharomyces cerevisiae (levadura)	13.5	6 241	16	462
Caenorhabditis elegans (gusano)	97	19 099	6	196
Arabidopsis thaliana (planta)	119	25 498	5	214
Drosophila melanogaster (mosca)	180	13 061	4	72
Homo sapiens (humano)	3 200	20 000-25 000	24	12.5

*Mn: millones de nucleótidos.
**: Genes por millón de nucleótidos.

Figura III.5
COMPARACIÓN DE LOS GENOMAS ENTRE DIFERENTES ORGANISMOS
Se muestra la comparación, a nivel del genoma, en cuanto al número total de nucleótidos, genes que codifican para proteínas, cromosomas y densidad de los genes en el genoma que se aprecian en diferentes organismos cuyos genomas han sido secuenciados.

organismo, por su semejanza con otra cuya función se conoce en otro ser vivo. Asimismo, la comparación de secuencias permite comparar genes cuya función es desconocida, con genes parecidos, llamados homólogos, con funciones conocidas en otros organismos y a partir de esto, no sólo establecer relaciones filogenéticas entre los organismos, sino avanzar también en el entendimiento de las funciones de ciertos genes no bien conocidos.

El análisis comparativo de secuencias homólogas de organismos diferentes es la base de la filogenia molecular. Recientemente, con la obtención de secuencias nucleotídicas de genomas completos, se ha encontrado que las filogenias basadas en la comparación de genes únicos son, con frecuencia, inadecuadas e incompletas. La comparación de secuencias nucleotídicas de los genomas completos, analizando cuántos genes de un genoma dado están presentes en el otro, da lugar a árboles filogenéticos más precisos, que están basados no sólo en la evolución de un

gene, sino en la definición del contenido génico funcional de todo el genoma de un organismo.

Desafortunadamente, el análisis aislado de la secuencias genómicas no permite entender cómo funcionan los genes, cómo trabajan las células, cómo las células forman organismos, o qué es lo que pasa cuando una célula se enferma. Es por esto que como respuesta a la gran avalancha de información que se está obteniendo a través de los proyectos genómicos de los últimos años, ha habido un gran interés en el desarrollo de metodologías que permitan el análisis sistemático y la explotación de la información generada. Estas metodologías, que sustentan la investigación llamada post-genómica, o genómica funcional, permiten por ejemplo, analizar la expresión de los genes (transcriptoma) en un organismo, tejido o célula dada, bajo diferentes condiciones, o caracterizar la presencia de proteínas, sus asociaciones y/o las modificaciónes postraduccionales (proteoma) en células normales o enfermas o sujetas a diversos estímulos. La investigación post-genómica involucra, también de manera importante, a la bioinformática, área que se ha desarrollado notoriamente en estos últimos años, y la cual se puede prever continuará desarrollándose de manera acelerada, ya que la extraordinaria gran cantidad de información que se obtiene de los proyectos genómicos y post-genómicos, sólo se puede integrar y manipular a través de las herramientas que se generen en esta disciplina de la bioinformática.

Conocer las secuencias nucleotídicas de todos los genes de los organismos y a partir de ellas las secuencias de RNAs y de aminoácidos de todos sus productos proteicos, no significa, sin embargo, que de forma automática conoceremos todos los detalles del funcionamiento de estos seres vivos. *De facto*, estamos solamente al principio del entendimiento de cómo la regulación fina y sincronizada del genoma permite el desarrollo y funcionamiento del organismo vivo. Sin embargo, es indudable que nuestra capacidad para entender el funcionamiento y desarrollo de cualquier organismo, será potenciada a través del conocimiento de las secuencias nucleotídicas de su genoma, de sus instrucciones genéticas, de su transcriptoma, de su proteoma y de la comparación de éstos con las presentes en otros organismos.

Por ejemplo, estudios recientes de comparación de genes entre los genomas secuenciados de los diferentes organismos eucariontes animales demuestran que, en el caso de la mosca, existen en este organismo más del 65% de los genes que codifican para proteínas que en los humanos son responsables de enfermedades congénitas hasta ahora identifi-

cadas en la especie humana. En otras palabras, en la mosca inicialmente se han encontrado al menos 177 genes que tienen equivalencia con genes humanos involucrados en enfermedades genéticas (25). Ejemplo de estos casos es el de una mutante de la mosca que presenta una patología similar a la que se observa en pacientes con la enfermedad de Parkinson (26). Indudablemente, el análisis del funcionamiento de estos genes y de sus productos proteicos y de otros genes que no codifican para proteínas sino para RNAs pequeños que pudieran jugar papeles importantes en la diferenciación celular en este insecto, permitirá en tiempos mucho más cortos, conocer con gran detalle los elementos moleculares involucrados en muchas enfermedades genéticas humanas, conociendo lo que ocurre en otros organismos modelo como la mosca, y abriendo así posibilidades extraordinarias y novedosas para el tratamiento de este tipo de enfermedades en el ser humano.

Estudio de la expresión génica y los microarreglos

Este tipo de estudios permite caracterizar el patrón de expresión global de todos los genes de una célula específica, en una cierta condición fisiológica. Estos estudios se basan en la idea de que el estado funcional de un organismo está principalmente determinado por los genes que expresa (27). Si bien esta idea no es estrictamente cierta, ya que la cantidad absoluta de las proteínas de una célula con respecto a los RNA mensajeros transcritos no mantiene una relación lineal y además existen modificaciones postraduccionales que alteran o modifican la actividad de una proteína dada, lo que redunda en el estado funcional de una célula, el estudio del transcriptoma de una célula da una idea más cercana del estado general de la misma. Los estudios de expresión génica se realizan en general, de modo comparativo, ya que se compara la inducción y represión de la síntesis de los RNA mensajeros y de otros RNAs que no se traducen de una célula en una cierta condición (por ejemplo en una célula en una condición metabólica o una célula enferma), *vs* una condición control (esto es una célula sana), por lo que los estudios del transcriptoma celular permiten determinar los patrones de expresión global de los genes relativa en diferentes condiciones fisiológicas.

Entre los métodos para medir la expresión génica, el más utilizado actualmente es el de microarreglos de DNA, el cual se ha empleado para diversos estudios, tales como la caracterización de la expresión de los

genes en la célula en diferentes condiciones metabólicas; la expresión global de los genes celulares en respuesta a infección viral o bacteriana; la comparación de la expresión en células sanas contra la expresión de genes en células enfermas o cancerosas. En la figura III.6 se muestran los resultados de comparar los transcriptomas de la bacteria de *E. coli* que tiene más de 4 400 genes en dos diferentes condiciones metabólicas. Los puntos amarillos son genes que en ambas condiciones metabólicas se expresan de manera similar. Los puntos rojos señalan genes que se expresan en una condición metabólica y los verdes en otra.

El genoma, el transcriptoma y el proteoma humano

Se tenían secuenciados y mapeados en nuestros cromosomas (figura I.3) poco más de veinte mil genes, que codifican para proteínas utilizando para ello los DNA complementarios correspondientes (28). En los primeros meses del año 2000, se publicó la noticia de que se había ya determinado la secuencia de todos los fragmentos de DNA que conforman al genoma humano y que en un lapso de no más de dos años se tendría una secuencia del genoma humano con más de 95% de certeza. También en el año 2000 se reportaron las secuencias nucleotídicas de los cromosomas humanos número 22, en el cual se localizaron 545 genes que codifican para proteínas y del cromosoma número 21 el más pequeño de los 23 cromosomas de nuestra especie, que tiene 33.5 millones de pares de nucleótidos y en el cual se localizan 225 genes que codifican para proteínas (29) (figura III.3). Estos números de genes, relativamente reducidos conforme a lo esperado por el tamaño de los cromosomas 21 y 22, hizo pensar que el número final de genes humanos no llegaría a los 80 o 100 mil originalmente estimados, sino tal vez serían entre 35 y 40 mil los genes de nuestra especie (29).

En febrero de 2001, dos grupos reportaron simultánea pero independientemente, en las revistas *Nature* y *Science,* la secuencia del genoma humano (5, 19). Este resultado, alcanzado por cierto antes de lo previsto, es uno de los logros más importantes de la biología, comparable con el desciframiento de la estructura del DNA y con la teoría de la evolución, y va a permitir un avance extraordinario en el conocimiento del organismo humano. Entre los datos más relevantes del resultado de estos trabajos estarían los siguientes:

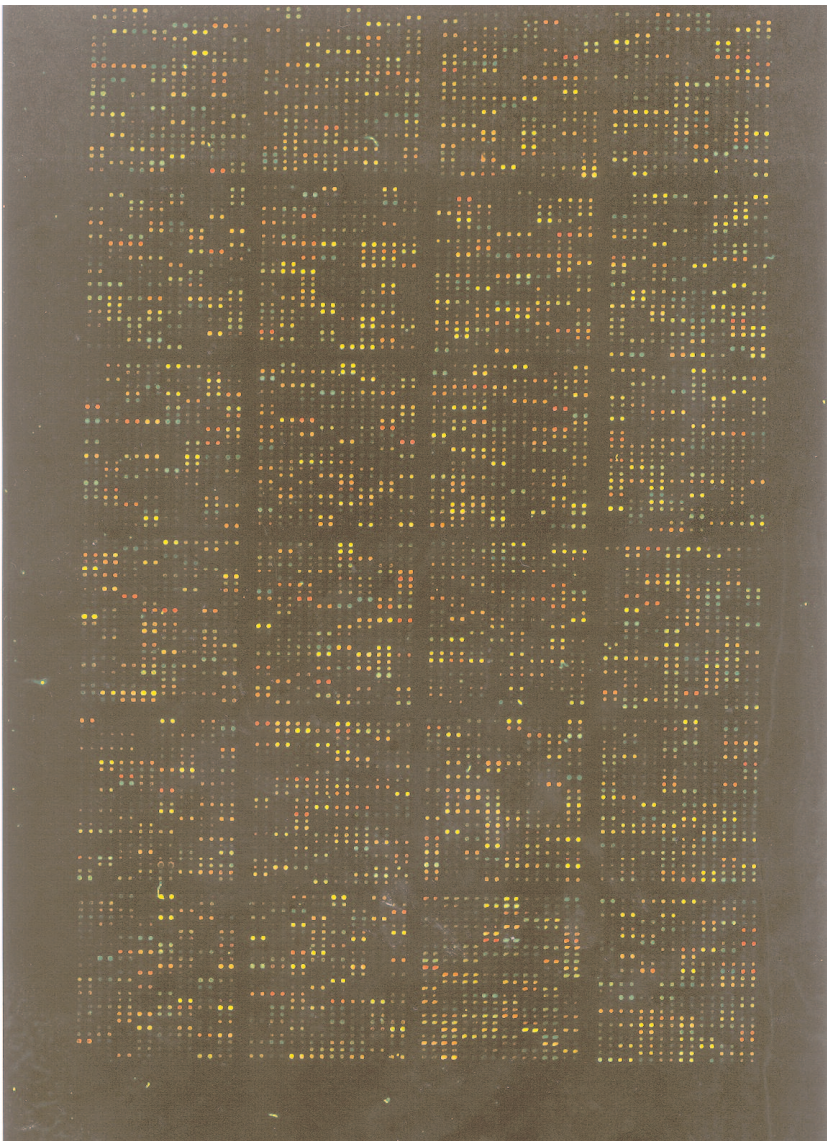


Figura III.6

MICROARREGLO MOSTRANDO EL TRANSCRIPTOMA
DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

En la figura se muestra el microarreglo de la bacteria *Escherichia coli* que tiene más de 4 400 genes en dos diferentes condiciones metabólicas. Los puntos amarillos son genes que en ambas condiciones metabólicas se expresan de manera similar. Los puntos rojos señalan genes que se expresan en una condición metabólica y los verdes en otra.

La secuencia que se reportó es un consenso de la porción de la llamada "eucromatina" (región particularmente rica en genes), que corresponde aproximadamente a 97% del genoma haploide, es decir, 22 cromosomas somáticos y los dos cromosomas sexuales (figura I.3). Se reportó inicialmente la secuencia de cerca de 3 000 millones (3×10^9), de pares de nucleótidos de los cromosomas humanos. Lo anterior significa que las 24 moléculas de DNA de los 24 cromosomas que conforman el genoma humano haploide, miden un poco más de un metro, ya que cada par de nucleótidos está separado por 3.4 Å(un angstrom es 10^{-8} cm), así que al multiplicar $3 \times 10^9 \times 3.4 \times 10^{-8}$ cm, el resultado es 102 cm.

Dos seres humanos somos genéticamente 99.9% idénticos. Lo anterior implica que, si bien entre dos individuos compartimos la mayor parte de nuestro material genético hay, sin embargo, en promedio, tres millones (3×10^6) de nucleótidos diferentes entre dos miembros de la raza humana; encontrándose entonces en promedio entre dos individuos, un nucleótido diferente cada 1200. Estas diferencias son, en lo general, el producto de mutaciones acumuladas en el genoma de la raza humana, a través de los años. Aquellas que en particular son el resultado de una mutación de un solo par de nucleótidos en un gene (figura I.13), reciben el nombre de "polimorfismos genéticos de un solo nucleótido" (SNP, por sus siglas en inglés).

En la población humana, un gene en particular ha sufrido, a lo largo del tiempo desde la aparición de la especie humana, diferentes mutaciones en distintos individuos, dando lugar así a estos polimorfismos genéticos (SNP). Al conjunto de todas las diferentes mutaciones en ese gene (presentes en toda la población humana), se les conoce con el nombre de los "alelos" de ese gene en particular. Muchas de estas mutaciones no tienen efecto en la proteína para la cual codifica el gene; sin embargo, algunas otras mutaciones sí pueden cambiar ligera o profundamente la estructura del producto (figuras I.13 y I.15). En el caso de un cambio menor, el individuo que porta esta o estas mutaciones muy probablemente podrá vivir con este alelo sin problemas. Sin embargo, en el caso de mutaciones que cambian la estructura y por ende la función de la proteína o de un RNA que no se traduce de manera importante, los portadores pueden desarrollar enfermedades complejas e inclusive morir por estos cambios más severos. Inicialmente se reportaron más de dos millones diferentes de estos polimorfismos genéticos del tipo SNP (5, 19).

Los polimorfismos genéticos son, en buena medida, la razón responsable de las diferencias físicas entre los seres humanos. Desde el punto

de vista de la medicina, los SNP son marcadores genéticos importantes para entender no sólo las enfermedades sino también las diferentes predisposiciones a las enfermedades que existen entre las razas y los individuos. Los polimorfismos genéticos son, en suma, los responsables de la identidad genética individual de cada ser humano. La presencia e identificación de los SNP en cada individuo, está dando lugar al desarrollo de una medicina molecular individualizada orientada al diagnóstico preventivo y al diseño de drogas específicas (farmacogenómica) a nivel del individuo. Ejemplos de lo anterior, se señalan en secciones posteriores de este capítulo.

Los dos artículos que reportan la secuencia del genoma humano, señalan que no es posible fijar aún el número preciso de genes que codifican para proteínas que conforman nuestro genoma ya que hay secuencias que pudieran ser realmente genes, pero hay todavía indefiniciones que tienen que precisarse, sobre todo por el problema de la presencia en el genoma humano de "pseudogenes", material genético repetido que no funciona como un gene verdadero (ver más adelante). Sin embargo, ambos grupos reportaron que el genoma humano tenía alrededor de 35 mil genes que codifican para proteínas. Finalmente, el número de genes humanos se ha actualizado con la terminación de la secuencia de la eucromatina humana y resulta que tenemos entre 20 000 y 25 000 genes que codifican proteínas (20). Este número que es importante por varias razones, es un número similar al de los genes presentes en la planta *Arabidopsis thaliana* (alrededor de 26 000 genes) y no mucho mayor al de los genes de la mosca *Drosophila melanogaster* (alrededor de 13 600).

El material genético de los exones de estos 20 000 o 25 000 genes, que codifica para proteínas, sólo representa entre 1 y 2% de todo nuestro genoma mientras que los intrones reportados en los genes de nuestro genoma representan alrededor de 30% del total del genoma y el resto es material genético denominado repetido, como se verá más adelante. Una diferencia importante con los otros organismos eucariontes secuenciados, a nivel de los exones y los intrones de los genes que codifican para proteínas, es que en el caso del humano los intrones son, en promedio, mayores en tamaño. Esta diferencia pudiera ser significativa ya que podría ser parte de la razón por la cual es posible obtener un mayor número de sitios de procesamiento alternativo de los RNA premensajeros que tienen mayores tamaños y mayor número de intrones, para generar así más de una proteína a partir de cada transcrito de RNA premensajero. De hecho, se ha reportado recientemente por varios grupos, que existe una alta probabilidad de que ocurra este tipo de proceso y que más de

38% de los RNA premensajeros humanos, contiene sitios alternos de procesamiento (2, 3, 4, 5).

Esta situación pudiera ser la responsable de explicar la aparente paradoja de por qué el genoma humano, con sólo 20 000 o 25 000 genes, de hecho codifica para un proteoma con más de 25 mil proteínas, resultantes de este tipo de procesamiento diferencial de los transcritos de RNA premensajero, y también de los procesos de modificación postraduccional de las proteínas. De acuerdo con lo anterior, no sería extraordinario que finalmente el proteoma humano estuviera constituido por un conjunto muy superior a 25 000 proteínas diferentes, y que algunos consideran que por la complejidad del organismo humano, pudiera ser incluso, mayor a 80 000 proteínas (5, 19).

Ya se ha señalado que estudios recientes relacionados con la identificación y análisis funcional del material genético del genoma humano, indica que existe un proceso de transcripción muy intenso en el genoma, superior al que originalmente se había determinado, que indica que la mayor parte del genoma es transcrito. Esto dio como resultado la identificación y caracterización inicial de muchos pequeños transcriptos de RNA que no codifican para proteínas, no previamente identificados. De aquí se concluye que el número de genes que codifican para los RNAs pequeños (microRNA, iRNA, snRNA, etc.), pudiera ser tan alto como el de los genes que codifican para proteínas. Además, como ya se ha señalado, las funciones que juegan estos RNA pequeños, van desde la inhibición de la traducción de mensajeros específicos (iRNA), de varios mensajeros (microRNA), hasta la aparente asociación con regiones de eucromatina que pudiera modular la expresión de genes. Se ha señalado que algunos de estos microRNAs pudieran también estar involucrados en la diferenciación celular (8, 9, 10, 20).

En cuanto al análisis del proteoma humano que se reporta en los artículos originales donde se publica la secuencia del genoma humano, se señalan algunas características relevantes. La primera es que una proporción más importante de lo que antes se pensaba de las proteínas humanas hasta ahora reconocidas, está involucrada en procesos del metabolismo celular y en procesos de transcripción-traducción; lo anterior tiene sentido en el marco de una actividad celular de transcripción y traducción muy intensa, consistente con la especulación de tener un proteoma funcional de mayor tamaño al del genoma. Otras funciones en las que se encuentra también involucrado un número elevado de proteínas, se relacionan con los procesos de comunicación intra y extracelular, de transporte, de defensa e inmunidad.

Por otro lado, un resultado importante que se reporta es que cerca del 1% de nuestras proteínas tiene probablemente un origen bacteriano y, por ende los genes que las codifican, debieron haberse adquirido mediante procesos de transferencia (infección) horizontal, ocurridos en diferentes etapas de la evolución de los vertebrados. Entre estos genes están los de las mitocondrias

Es relevante mencionar también que se han identificado ya más de mil genes involucrados con enfermedades humanas (30) y también se han determinado genes que codifican para proteínas que pudieran ser blanco del desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de problemas de salud; ejemplos del uso de estos genes y sus proteínas, se mencionan en la siguiente sección de este capítulo.

Otra característica muy importante de nuestro genoma, es la presencia de lo que se conoce con el nombre de "material genético repetido". Al menos 60% del total del material genético del genoma humano y probablemente más, son secuencias de nucleótidos que se repiten numerosas veces y de maneras diferentes. Este tipo de DNA en términos generales, se puede clasificar en cinco categorías, mencionadas por el Consorcio Internacional para la Secuencia del Genoma Humano: a) material repetido derivado de transposones (que son segmentos discretos de material genético capaces de translocarse o moverse de su lugar original a uno nuevo); b) copias inactivas de genes, llamadas "pseudogenes"; c) secuencias de tamaño corto, repetidas varias veces; d) duplicaciones de regiones del genoma de 10-300 kb, que han sido copiadas e incorporadas en otra región del genoma; y e) bloques de secuencias repetidas en tandem, como los centrómeros (estructuras involucradas en la duplicación de los cromosomas) y los telómeros (estructuras localizadas en los extremos de los cromosomas) de los cromosomas (5).

En estos artículos se señala que cerca de 90% de este material genético repetido en nuestro genoma (que equivale al menos a 45% del total del DNA en el genoma), es del tipo del material repetido derivado de transposones. Los transposones son secuencias de DNA que se localizan en el genoma de todos los seres vivos y que tienen la propiedad de poder reubicar o translocar su posición en el genoma. Al llevar a cabo esta función de relocalización pueden hacerlo, dependiendo del tipo de transposón que se trate, dejando copias perfectas o imperfectas del transposón en la posición original y además, multiplicando el número de copias del transposón en el sitio o sitios nuevos de integración o relocalización (6, 9). En humanos hay cuatro clases de este tipo de DNA proveniente de

transposones: a) los elementos tipo retrovirus; b) las secuencias LINE; c) las secuencias SINE; y d) los transposones de DNA.

Las secuencias repetidas del tipo de los retrovirus, de las cuales existen en nuestro genoma del orden de 450 mil copias, provienen de infecciones de virus que tienen RNA como material genético, que insertaron copias de su genoma como DNA, en diferentes sitios del genoma humano, a lo largo del tiempo. Muchas de estas secuencias contienen todavía un gene activo que codifica para la transcriptasa reversa. La transcriptasa reversa es una proteína con actividad de enzima que sintetiza DNA a partir de RNA, y es la enzima que usan el virus del SIDA y otros retrovirus para incorporar (integrar) copias de su genoma en los cromosomas humanos. Varios miles de estos genomas virales están casi completos en su secuencia, integrados en nuestro genoma; por suerte, la mayor parte de ellos son inertes por haber perdido alguna parte de un gene importante. Estos "retrovirus endógenos de humanos" también conocidos con el nombre de "Hervs" *(human endogenous retrovirus,* por sus siglas en inglés), representan cerca de 8% de nuestro genoma (31).

Las secuencias LINE, son segmentos de DNA entre 6 000 y 8 000 pares de nucleotidos que se encuentran repetidas cerca de 850 000 veces y que por ende representan 21% del genoma humano. Son secuencias de DNA que contienen dos genes estructurales que codifican para dos proteínas. Al transcribirse el DNA de la secuencia LINE en RNA, estas dos proteínas se asocian al RNA transcrito y participan en su proceso de retrotranscripción, por la transcriptasa reversa, para copiar y luego integrar el material copiado de RNA en DNA, en otra región del cromosoma. Las secuencias LINE son autónomas para realizar este proceso y son también secuencias gregarias, ya que se presentan varias copias juntas en diferentes regiones de los cromosomas.

Las secuencias SINE son secuencias de DNA de 100 a 300 pares de nucleótidos que están repetidas cerca de 1.5 millones de veces en el genoma humano, lo cual representa cerca del 13% de nuestro material genético. Las secuencias SINE, en particular las llamadas Alu, tienen semejanza con el gene que codifica para uno de los RNA que forman los ribosomas. Este gene que codifica para RNA ribosomal tiene un promotor interno que probablemente sea responsable de una transcripción especial que posibilita la formación de RNA pequeños que pueden, a su vez, transcribirse en DNA por la transcriptasa reversa y convertirse en estas secuencias Alu que sólo llevan una parte del gene que codifica para el RNA ribosomal. Las secuencias Alu sólo se encuentran en primates.

Finalmente, las secuencias tipo transposones de DNA, son del orden de 300 mil copias de secuencias parecidas a los transposones bacterianos, y representan 3% de nuestro genoma. Varias decenas de nuestros genes se orginaron muy probablemente a partir de este tipo de transposones de origen bacteriano.

Mucho se ha especulado con relación al posible origen y papel del material repetido en nuestro genoma. Ciertamente, parte importante de este material es el resultado de la llamada "transferencia horizontal" de DNA a través de infecciones virales y bacterianas a lo largo de la evolución en los antecesores de nuestra especie. El material genético repetido ha sido denominado por algunos como "DNA basura o genes egoístas" por no tener una función biológica aparente (32). Sin embargo, también hay otras opiniones y evidencias que consideran que los elementos de DNA repetidos derivados de transposones, pudieran participar en el rearreglo de regiones específicas del genoma, lo que a su vez, pudiera contribuir en ciertos procesos de adaptabilidad evolutiva del organismo (33). De lo anterior es importante resaltar que el genoma indudablemente no es un ente estático, invariable, sino todo lo contrario. El genoma es un sistema dinámico, interactivo, que se rearregla en cierta medida, lo que probablemente permite la adaptación, la evolución y la sobrevivencia del organismo ante cambios en los factores del medio ambiente (figura III.7).

El avance de la genética y de la ciencia genómica es vertiginoso. Lo anterior está contribuyendo al entendimiento profundo de los procesos finos involucrados en la organización, expresión y modificación de los genes, y a través de sus productos tanto proteínas como RNAs, del funcionamiento de la célula viva. Por otro lado, el comparar los procesos normales con procesos patológicos, ha facilitado sustancialmente el entendimiento de enfermedades y problemáticas clínicas. Seguramente, la determinación de la secuencia del genoma humano permitirá abordar problemáticas clínicas más complejas y enfermedades multifactoriales, en las que participan varios genes, de manera mucho más certera e individualizada, tal y como se menciona en la siguiente sección de este capítulo.

Finalmente, es fundamental señalar aquí que los factores ambientales juegan también un papel muy importante, e incluso pueden ser indispensables, para desencadenar procesos normales y patológicos causados por uno o por la concurrencia de varios genes y sus productos proteicos. y de RNAs que no se traducen. Así pues, nuestra vida y nuestras respuestas biológicas, no son sólo cuestión de genes, sino de genes y de la interacción de sus productos con factores ambientales.

GENOMA HUMANO

- 22 cromosomas somáticos y los 2 cromosomas sexuales Y y X (aproximadamente un metro de DNA en 24 segmentos).
- Aproximadamente 3200 millones de pares de nucleótidos.
- Si bien el material genético que compartimos dos seres humanos tienen más del 99.9% de identidad, cerca de dos millones de mutaciones polimórficas de un solo nucleótido (SNP) han sido identificadas a nivel de los genes humanos. Estas mutaciones polimórficas son responsables de la individualidad genética humana y también de enfermedades o predisposiciones a enfermedades.
- Entre 20 000 y 25 000 genes que codifican para proteínas (1-2% del genoma corresponde a los exones y 30% a los intrones)
- Un proteoma conformado por al menos 20 000 proteínas (probablemente cerca de 80 000), ya que se sabe que cerca de 40% de nuestros genes, al ser transcritos en RNA premensajero pueden ser procesados diferencialmente y de esta manera es posible generar más de una proteína a partir de cada transcrito
- Al menos 20 000 genes que codifican para RNAs que no se traducen en proteínas. La gran mayoría son RNA pequeños (microRNA, iRNA, snRNA, etc.), que participan en varias funciones regulatorias en la célula.
- 1% de nuestros genes es aparentemente de origen bacteriano, resultado de transferencia horizontal; además, varias docenas de nuestros genes se han derivado de transposones.
- Una parte muy importante del genoma es material repetido interdisperso; mucho de éste (45% del total) derivado de transposones.

Material repetido en el genoma humano derivado de transposones; representa 45% del total del genoma:

- elementos del tipo "retrovirus"	8%
- secuencias LINE	21%
- secuencias SINE	13%
- transposones	3%

Figura III.7

EL GENOMA HUMANO

Resumen de algunas de las características más importantes del genoma humano.

Las técnicas de ingeniería genética han permitido desde 1973, el aislamiento de muchos genes humanos que codifican para proteínas y su utilización para la construcción de organismos transgénicos para la producción de proteínas humanas recombinantes, que hoy en día se utilizan en diferentes problemáticas clínicas y para el tratamiento y la prevención de enfermedades tal y como veremos en el siguiente capítulo. Asimismo, con el avance de la ciencia genómica —y particularmente con el desciframiento de la secuencia del genoma humano— tenemos una visión más avanzada de la forma en que están organizados los genes humanos, y también de las diferencias, los polimorfismos genéticos, que existen en todos y cada uno de los genes humanos y que son responsables de nuestra individualidad genética y por ello también de nuestra predisposición genética a enfermedades.

Esta nueva información genómica, aunada a las técnicas de ingeniería genética, permiten hacer un uso más sofisticado de los genes humanos, no sólo para producir proteínas específicas en organismos transgénicos, sino también para contender de manera más individualizada con aspectos fundamentales de la salud humana, entre los que señalaríamos el diagnóstico genético, la farmacogenómica y la terapia génica, tres áreas de gran importancia que se describen a continuación.

El diagnóstico genético

Las enfermedades genéticas humanas son el resultado de la presencia de mutaciones en uno o más genes humanos. Como resultado de lo anterior, en el individuo que porta estos genes mutantes se producen procesos fisiológicos anormales que dan lugar a enfermedades genéticas, algunas de las cuales están listadas en la figura III.8. Uno de los propósitos del diagnóstico genético es conocer la presencia de los genes mutantes en los individuos que los llevan, haciendo uso para ello de segmentos de estos genes (figura III.9); el otro propósito del diagnóstico genético es detectar enfermedades infecciosas, usando genes de organismos patógenos o de virus.

El desciframiento del genoma humano, como hemos señalado, ha permitido identificar muchos polimorfismos genéticos, que son responsables de la individualidad genética de cada ser humano y también de su

ENFERMEDADES GENÉTICAS
Anemia falciforme
b-talasemias
Corea de Huntington
Diabetes
Distrofia de Duchenne
Enfermedad de Alzheimer
Fenilcetonuria
Fibrosis quística
Hemofilia
Hipoparatiroidismo
Neoplasia endócrina
Neurofibromatosis de von Recklinghausen
Renitis pigmentosa
Retinoblastoma
Síndrome de Lesch-Nyhan
Desórdenes inmunológicos

Figura III.8

ENFERMEDADES GENÉTICAS

Listado que muestra algunas de las enfermedades genéticas más importantes. El elemento común en todas estas enfermedades es que en ellas ha habido mutaciones en uno o varios genes. Como resultado de este cambio, en algunos casos la proteína codificada ya no es capaz de llevar a cabo sus funciones adecuadamente y se presenta la enfermedad en el individuo portador.

particular predisposición genética a contraer enfermedades. La detección y el diagnóstico temprano de estas diferencias representa un cambio cualitativo paradigmático en la práctica médica, ya que permitirá a cada individuo diseñar una estrategia de vida, incluyendo el posible tratamiento médico, más adecuada y más individual para contender con sus enfermedades genéticas presentes y futuras. Lo anterior es particularmente importante para aquellos individuos cuyas familias hayan mostrado una mayor susceptibilidad a contraer una cierta enfermedad, debido a la presencia de uno o varios polimorfismos genéticos específicos.

El extraordinario caudal de información que día a día emana del estudio del genoma humano, nos ha incorporado cada vez más íntimamente, a esta nueva etapa de la genética y la medicina molecular moderna: la del diagnóstico genético preventivo e individualizado. Sin embargo, hoy por hoy, aun cuando hemos avanzado en forma increíble y extraordinaria en esta área de la genética humana —se conocen más de 1 000 genes humanos involucrados en enfermedades genéticas (30)— el diag-

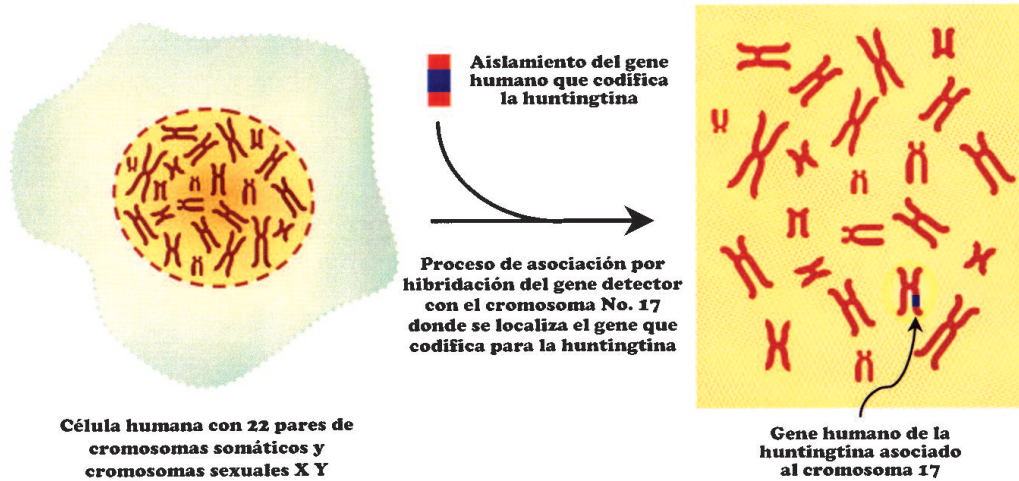


Figura III.9

DIAGNÓSTICO GENÉTICO

En la figura se muestra un esquema del uso de genes humanos para determinar la presencia específica de un gene normal o mutado en los DNA de los cromosomas humanos. En particular, se señala el uso del gene humano que codifica para la proteína huntingtina, como rastreado del mismo gene o de alguno de sus alelos, a nivel de los cromosomas humanos. A través de procesos de hibridación, se puede detectar la presencia del gene de huntingtina en el cromosoma 17 humano. Además, mediante el uso de enzimas de restricción y técnicas de secuenciación de DNA, es posible determinar las diferencias entre alelos de este u otros genes, y a través de ello determinar si se porta un gene normal o uno mutado. En el caso de la huntingtina, el portar un gene con cierto tipo de mutación (amplificación) de cierta región, genera la enfermedad de Huntington.

nóstico genético todavía no representa una herramienta de uso cotidiano, en particular en países en vías de desarrollo como el nuestro. Es indudable que, conforme se vayan conociendo y aislando, cada día más rápidamente, genes y polimorfismos genéticos asociados a enfermedades genéticas —particularmente aquellos que provean información acerca de las enfermedades humanas más comunes y de la predisposición a contraerlas— el diagnóstico genético individualizado será componente de toda estrategia médica en todos los sistemas de salud (34).

Reconociendo la inminencia del uso de esta poderosa tecnología de manera masiva, y sin dejar de resaltar el potencial de todo este nuevo paradigma médico, es necesario, sin embargo, destacar algunos aspectos éticos relevantes del uso de estas capacidades y de la información genética. Debemos distinguir muy claramente entre el diagnóstico orientado a los adultos, los niños, personas discapacitadas mentalmente e individuos no natos. Surge aquí el concepto y el aspecto fundamental de la "privacidad genética y biológica", donde el concepto de "autorización de la obtención y uso de la información genética", debe aplicarse de manera distinta en estos grupos. Es obvio que se debe legislar para que el diagnóstico genético sólo se practique cuando exista una autorización por parte del individuo o su responsable legal en el caso de infantes, cuyo DNA pretende examinarse. Sin embargo, es indudable también que aun cuando existan las leyes adecuadas, entraremos en problemáticas éticas, morales, filosóficas y jurídicas complejas cuando se otorguen autorizaciones por individuos ignorantes del tipo de consecuencias de los resultados que puedan obtenerse de este tipo de permiso. Realistamente, es posible prever —como lo han hecho notar muchos y en particular James Watson, descubridor de la estructura del DNA— que habrá muchos individuos que autoricen la realización de pruebas de diagnóstico, sin comprender todos los escenarios que los resultados pudieran tener en su vida futura. Así pues, resulta imperativo desarrollar programas de divulgación y también de educación sobre el DNA y la genómica que no sólo expliquen los aspectos fundamentales de esta disciplina, sino que también dejen claro el significado en particular de resultados positivos en pruebas de diagnóstico para enfermedades incurables al menos por ahora. Hoy en día, existen muchos individuos que conociendo tener 50% de probabilidades de portar un gene mortal, como el asociado a la enfermedad de Hungtinton, prefieren no conocer su destino final, eligiendo vivir en la incertidumbre que tener que cargar con la idea de que a cierta edad desarrollarán un problema médico terrible (9, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43).

La industria químico-farmacéutica ha generado a lo largo de los años, un conjunto muy importante de productos farmacéuticos que se utilizan en el tratamiento de diferentes problemas clínicos. Muchos de estos productos están dirigidos o tienen como blanco una proteína específica, en algún tejido de nuestro organismo. Estas proteínas tienen funciones particulares, dependiendo de su estructura (figura I.15), tales como receptores de moléculas pequeñas o transductores de señales, y permiten el funcionamiento de la célula y del organismo. Ciertamente, el conocimiento del genoma y del proteoma humano, facilitará diseñar nuevas drogas más potentes y específicas contra aquellos blancos proteicos ya conocidos. Sin embargo, este conocimiento también permitirá seleccionar un conjunto más amplio de genes y sus proteínas y RNAs que no se taducen, que pudieran ser blancos específicos de los actuales y de nuevos productos farmacéuticos para el tratamiento más efectivo de muchas enfermedades (8, 9, 10, 43, 44) (figura III.10).

Resulta importante resaltar que el grupo del Consorcio Internacional para la Secuencia del Genoma Humano, reporta ya en su artículo de *Nature* (5), un primer conjunto de 18 nuevas proteínas con dominios receptores aparentes para diferentes moléculas, tales como la dopamina, y factores de crecimiento tipo insulina, entre otros, que pudieran ser blanco de éstos y otros productos. Indudablemente, el desarrollo de nuevas drogas, a través del enfoque y del apoyo de la ciencia genómica, y en particular de la farmacogenómica, abrirá una rica avenida para el desarrollo de nuevos medicamentos.

Por otro lado, como ya hemos señalado, el uso de la información de los polimorfismos genéticos, a nivel de cada individuo, permitirá también conocer las diferencias entre las variedades funcionales de cada uno de los genes humanos, que se conocen como los alelos de ese gene. Estas diferencias son las responsables, en muchas ocasiones, a través de la presencia en las células de proteínas ligeramente modificadas, de las diferentes susceptibilidades a las enfermedades y también a las diferencias en cuanto a la acción de los medicamentos.

A través de la identificación de estas diferencias presentes en cada individuo en las proteínas que funcionan como receptores de drogas, o transductores de señales, podremos modular la concentración y/o afinidad de los medicamentos, inclusive al grado de diseñar drogas específicas para cada individuo, dependiendo del alelo particular que se tenga (42, 44, 46).

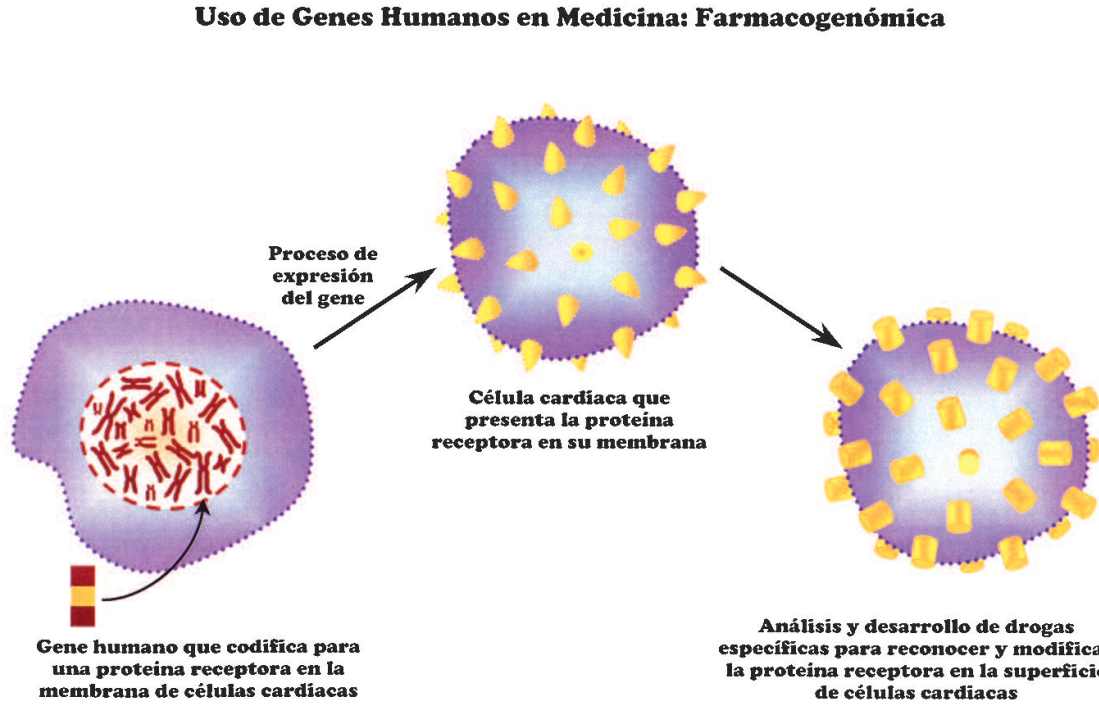


Figura III.10

EL DISEÑO DE NUEVAS DROGAS; LA FARMACOGENÓMICA

La figura muestra un esquema mediante el cual es posible utilizar el gene que codifica para una proteína que funciona como receptora de algún ligando, en alguno de nuestros órganos (en este caso el corazón), para diseñar y desarrollar drogas específicas que se asocien y modifiquen la proteína receptora, cambiando su afinidad por el ligando. De esta manera es posible modular el funcionamiento de la proteína receptora.

Independientemente del buen uso de los sistemas de diagnóstico que permitan orientar el estilo de vida —conforme al conocimiento de nuestros polimorfismos genéticos y por ello de nuestra predisposición a enfermedades—, habrá siempre individuos que nazcan con enfermedades genéticas complicadas y terribles. De esta realidad surge la posibilidad de la terapia génica, como una estrategia orientada a curar las deficiencias genéticas. Esta metodología implica el introducir una o varias copias de genes normales para sustituir la función de genes ausentes o mutantes en los cromosomas de las células de enfermos, para así curar la enfermedad (figura III.11).

En el momento actual, los esfuerzos correctivos de terapia génica están orientados a introducir genes normales o mensajeros antisentido en las células somáticas del organismo que presentan alguna deficiencia genética. Hace tan sólo unos años, fue realizado un primer experimento en células de la médula espinal de un niño con una enfermedad de inmunodeficiencia; estas células aisladas y cultivadas *in vitro,* fueron transformadas con genes normales para el defecto de la inmunodeficiencia y algunas de ellas incorporaron y expresaron el gene. Estas células modificadas genéticamente fueron posteriormente retransplantadas a la médula del propio niño enfermo que después de este tratamiento se ha recuperado (47, 48).

Éste es el primer experimento de terapia génica en humanos que abre una nueva área y una nueva era en la medicina y la biología modernas. Al día de hoy ya son varios los experimentos de terapia génica realizados en humanos, algunos inicialmente exitosos, lo cual es extraordinario y alentador (34, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53).

Por otro lado, no existen a la fecha —en principio y al menos por ahora— y no deben permitirse, intentos para modificar genéticamente las células germinales de nuestros organismos, células que son transferidas a las generaciones humanas que nos sucederán. La decisión de no permitir efectuar experimentos en células germinales, se sustenta primariamente en la convicción de que es inaceptable experimentar con la vida humana cuando no podemos conocer ni predecir, por ahora, el impacto global que pudiera tener este tipo de intervención genética en un nuevo ser humano.

Si tratamos de juzgar la manera en que debemos proceder desde el punto de vista ético y moral con los procedimientos de la terapia génica

Uso de Genes Humanos en Medicina: Terapia Génica

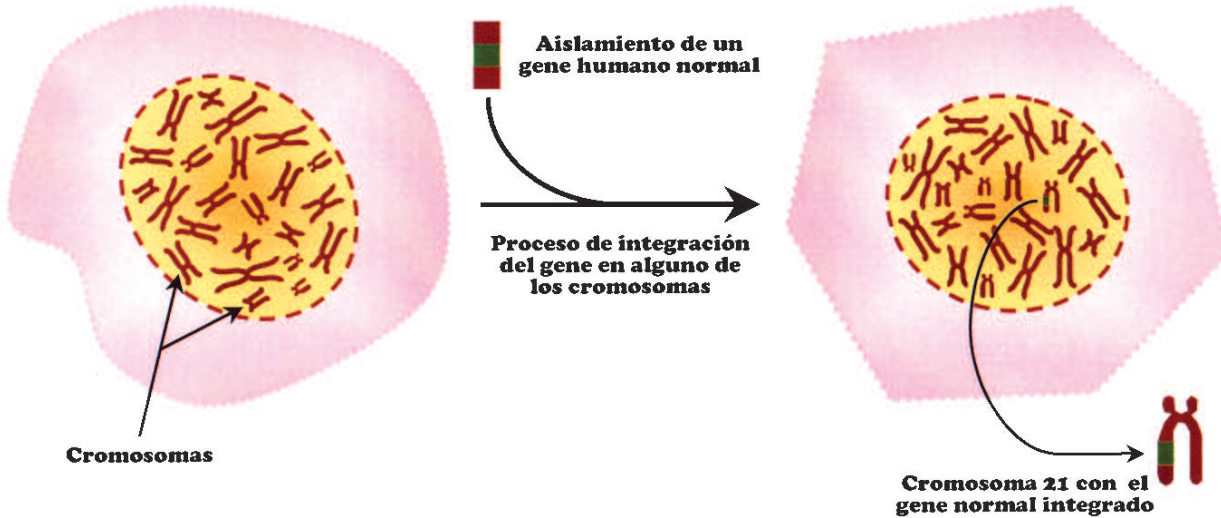


Figura III.11

LA TERAPIA GÉNICA

En la figura se muestra cómo una célula que porta un gene mutante (en el lado izquierdo de la figura), puede incorporar la copia normal de este gene en alguno de sus cromosomas. Como resultado, esta célula se "transforma" en una célula que ahora tiene la capacidad de producir la proteína faltante. Esta estrategia se conoce como terapia génica.

y el diagnóstico genético, o con cualquier otro aspecto de la genética que pudieran tener consecuencias para la vida humana, diríamos, como ha señalado James Watson, que debemos orientar nuestros esfuerzos a propiciar el desarrollo de marcos jurídicos y de acciones sociales, que impliquen o permitan los potenciales más altos para mejorar la calidad de la vida humana. Actuando de esta manera, sin embargo, se debe esperar controversia, ya que el nuevo conocimiento genómico modificará la percepción sobre nosotros mismos y nuestro lugar en el planeta, e indudablemente entrará en conflicto con valores tradicionales. Además, no debe olvidarse que, de cualquier manera, las herramientas del DNA recombinante y el conocimiento sobre los genomas, los transcriptomas y los proteomas están ya con nosotros, y que tenemos la obligación de usarlos no sólo para beneficio de la raza humana sino de la vida misma (8, 11, 34, 53, 54, 55, 56). Finalmente, señalaríamos que la declaración de la Conferencia General de la UNESCO en 1997, sobre "El Genoma Humano" (57), resulta ser un avance fundamental en este sentido, ya que genera un marco moral y ético sobre los derechos y responsabilidades para el manejo de la información genética presente en el genoma de la raza humana, y permite simultáneamente abrir un espacio relevante para el análisis y el debate sobre el manejo de los genomas de otros organismos, con los que conformamos la biodiversidad de nuestro planeta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chambon, P. Split genes. *Sci. Am.,* 244(5): 60-71 (1981).
2. Mironov, A., J.W. Fickett, M.S. Gerfand. Frequent alternative splicing of human genes. *Genome Research,* 9: 1288-1293 (1999).
3. Hank, J. *et al.* Alternative splicing of human genes: more the rule than the exception? *Trends in Genetics,* 15: 389-390 (1999).
4. Brett, D. *et al.* EST comparisons indicates 38% of human mRNA contains alternative splice forms. *FEBS Letters,* 474; 83-86 (2000).
5. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature,* 409: 860-921 (2001).
6. Klug, W.S., Cummings M.R. *Conceptos de genética.* Prentice Hall, Madrid (1999).
7. T.A. Brown. *Genomes.* Wiley-Liss Bross, New York, USA (1999).
8. The Encode Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the Encode Pilot Project. *Nature,* 447: 799-817 (2007).

9. M. Sohail (Ed.). Gene silencing by RNA interference. CRC Press, USA (2005).
10. Rana, T. M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. Nature Reviews: *Molecular Cell Biology,* 8: 23-36 (2007).
11. Blattner, F., G. Plunkett III, C. Bloch, N. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. Glasner, C. Rode, G. Mayhew, J. Gregor, N. Davis, H. Kirkpatrick, M. Goeden, D. Rose, B. Mau, Y. Shao. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science,* 277: 1453-1462 (1998).
12. Watson, J., M. Gilman, J. Wilkowski, M. Zoller. *Recombinant DNA;* Scientific American Books, Freeman, Co., NY, USA (1992).
13. Goffean, A., *et al.* Life with 6000 genes. *Science,* 274: 546-567 (1996).
14. *C. elegans* sequencing consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans:* a platform for investigating biology. *Science,* 282: 2012-2018 (1998).
15. Adams, M.D., *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster. Science,* 287: 2185-2195 (2000).
16. The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana. Nature,* 408: 796-826 (2000).
17. Yu, J., *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). *Science* 296: 79-92 (2002).
18. Groff, S., *et al.* A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp indica). *Science* 296: 92-100 (2002).
19. Venter, J.C., *et al.* The sequence of the human genome. *Science,* 291: 1304-1349 (2001).
20. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931-945 (2004).
21. Mount, D.W. *Bioinformatics: sequence and genome analysis.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA (2001).
22. Alba, M., D. Lee, F. Pearl, A. J. Sheperd, N. Martin, C. A. Orengo, P. Kellam. Vida: a virus database system for the organization of animal virus genome open reading frames. *Nucleic Acids Res.* 29:133-136 (2001).
23. Hiscock, D., C. Upton. Viral genome data base: storing and analyzing genes and proteins from complete viral genomes. *Bioinformatics.* 16: 484-485 (2000).
24. Lafontaine, D., S. Mercure, J. Perreault. Update of the viroid and viroid-like sequence database: addition of a hepatitis delta virus RNA section. *Nucleic Acids Res.* 25:123-125 (1997).
25. Rubin, G.M., *et al.* Comparative genomics of the eukaryotes. *Science,* 287: 2204-2215 (2000).
26. Haass, C., P.J. Kahle. Parkinson's pathology in a fly. *Nature,* 404: 341-343 (2000).
27. Lockhart, D., E. Winzeler. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405: 827-836 (2000).

28. Collins, F., A. Patrinos, E. Jordan, A. Chakravarti, R. Gesteland, L. Walters. New goals for the US Human Genome Project: 1998-2003. *Science* 282: 682-689 (1998).
29. Hattori, M. *et al.* The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 405: 311-319 (2000).
30. Jimenez-Sanchez, G., B. Ihilds, D. Valle. Human disease genes. *Nature* 409: 853-855 (2001).
31. M. Ridley. *Genome: the autobiography of a species in 23 chapters.* Harper Collins Publishers, N. York, USA (2000).
32. Dawkins, R. *The selfish gene.* Oxford University Press, Oxford England (1976).
33. Moffat, A.S. Transposons help sculpt a dynamic genome. *Science* 289: 1455-1457 (2001).
34. Watson, J. *A passion for DNA. Genes, Genome and Society.* Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000).
35. Reilly, P. *Genetics Law, and Social Policy.* Harvard University Press, Cambridge, Mass., USA (1977).
36. Kazazian, H., C. Boehm. Molecular basis and prenatal diagnosis of β-thalassemia. *Blood* 72: 1107-1116 (1988).
37. D. Melkin, L. Tankredi. *Dangerous diagnostics: the social power of biological information.* Basic Books, Inc. Publishers, New York, USA (1989).
38. Harper, P., S. Clarke. Should we test children for 'adult' genetic diseases? *Lancet* 335: 1206-1206 (1990).
39. Reiss, J., D. Cooper. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human genetic disease. *Hum. Genet.* 85: 1-8 (1990).
40. Chakravarti, A. Population genetics-making sense out of sequence, *Nature Genet. Suppl.* 21: 56-60 (1999).
41. Rish, N.J. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature,* 405: 847-856 (2000).
42. Diehn, M., A.A. Alizadeh, P.O. Brown. Examining the living genome in health and disease with DNA microarrays, *MsJAMA* 283: 229-299 (2000).
43. Debouck, C., P.N. Goodfellow. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nature Genet. Suppl.* 21: 48-50 (1999).
44. Roses, A.D. Pharmacogenetics and the practice of medicine. *Nature* 405: 857-864 (2000).
45. Del Bosque-Plata, L., E. García-García, M.T.. Tusie-Luna. Analysis of the glucokinase gene in Mexican families displaying early-onset non-insulin-dependent *Diabetes mellitus* including MODY families. *Am. J. of Med. Genet.* 72: 387-393 (1997).
46. Dhand, R. Nature insight. Functional genomics. *Nature* 405: 819 (2000).
47. Cavazzana, M., S. Calvo, G. Hacein-Bey, F. Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 270: 669-672 (2000).

48. Gerna, G., F. Baldanti, D. Lilleri, M.G. Revello. Human cytomegalovirus immediate-early mRNA detection by nucleic acid sequence-based amplification as a new parameter for preemptive therapy in bone marrow transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1845-1853 (2000).
49. Ledley, F. Clinical applications of somatic gene therapy in inborn errors of metabolism. *J. Inher. Metab. Dis.* 13: 587-616 (1990).
50. Anderson, W. Human gene therapy. *Science* 256: 808-813 (1992).
51. Crystal, R.G. Transfers of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science* 270: 404-410 (1995).
52. Putnam, D.A. Antisense strategies and therapeutics applications. *Am. J. Health Syst. Poharm.* 53: 151-160 (1996).
53. Bell, J. The new genetics. The genetics in clinical practice. *Br Med. J.* 316: 618-620 (1998).
54. Walters, L. The ethics of gene therapy. *Nature* 320: 225-227 (1986).
55. Anderson, W. Genetics and human malleability. *Hastings Center Report,* 20: 21-24 (1990).
56. P. Balbás, F. Bolívar. Los límites de la investigación genética. En: *Bioética y derechos humanos.* Instituto de Investigaciones Jurídicas, UNAM, México, pp. 151-159 (1992).
57. Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos, UNESCO. XXIX Reunión General de la UNESCO. *Ciencia* 48(4): 40-43 (1997).

Capítulo IV

SURGIMIENTO DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA MICROORGANISMOS TRANSGÉNICOS Y PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS

F. G. Bolívar Zapata

El nacimiento de la biotecnología moderna

A partir de mediados de los años setenta, el desarrollo y sofisticación de las técnicas de DNA recombinante, fueron profundamente estimulados por dos razones íntimamente relacionadas pero diferentes. La primera, como se ha reseñado en el capítulo anterior, indudablemente fue la convicción de poder avanzar en el conocimiento sobre la forma en que están organizados y se regulan los genes en el genoma del organismo vivo. La otra razón, fue la convicción de poder aislar, modificar y transplantar genes de un organismo a otro, transmitiendo con ello nuevas características genéticas al organismo receptor. El organismo que recibe material genético de otro organismo se denomina transgénico, y gracias a este nuevo DNA es capaz, en muchos casos, de producir proteínas novedosas llamadas heterólogas (ya que provienen de otra especie). Indudablemente, esta alternativa abre la oportunidad al diseño y desarrollo de organismos transgénicos para que produzcan proteínas de valor social y comercial y también al desarrollo de nueva tecnología biológica para la producción de proteínas recombinantes. En este sentido, James Watson comenta en su libro *Recombinant DNA* y se cita: "En 1976, nace la biotecnología moderna cuando las metodologías para clonación de DNA, síntesis química de oligonucleótidos y expresión genética, convergieron en un único experimento, en el cual una proteína humana fue expresada a partir de DNA sintético usando técnicas de DNA recombinante". La proteína fue somatostatina, un péptido neurotransmisor de 14 aminoácidos (figuras IV.1 y IV.2).

El gene que codifica para la somatostatina no era el gene natural, sino uno que fue sintetizado químicamente y clonado en un derivado del plásmido pBR322 utilizado además como vector de expresión en *Esche-*

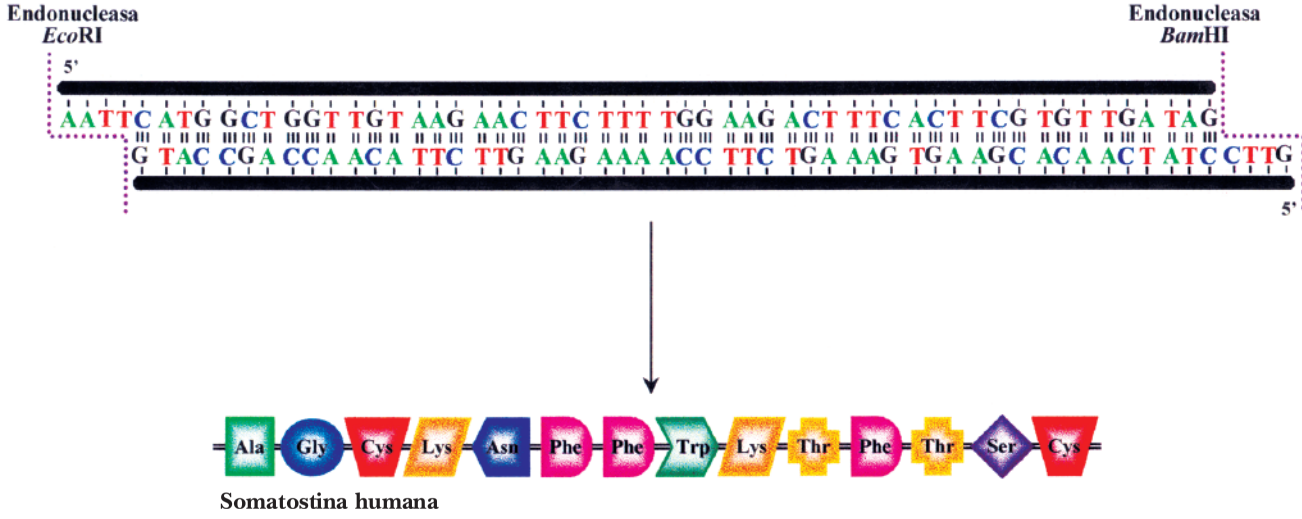


Figura IV.1

EL GENE SINTÉTICO QUE CODIFICA PARA LA HORMONA SOMATOSTATINA HUMANA

Este gene fue construido uniendo ocho fragmentos de DNA sintéticos. Estos fragmentos fueron clonados posteriormente en un derivado del vehículo pBR322 para su eventual expresión, lo que permitió la producción de esta hormona humana. Éste fue el primer gene sintético construido a partir de fragmentos de DNA que codifica para esta proteína humana que está compuesta por 14 residuos de aminoácidos.

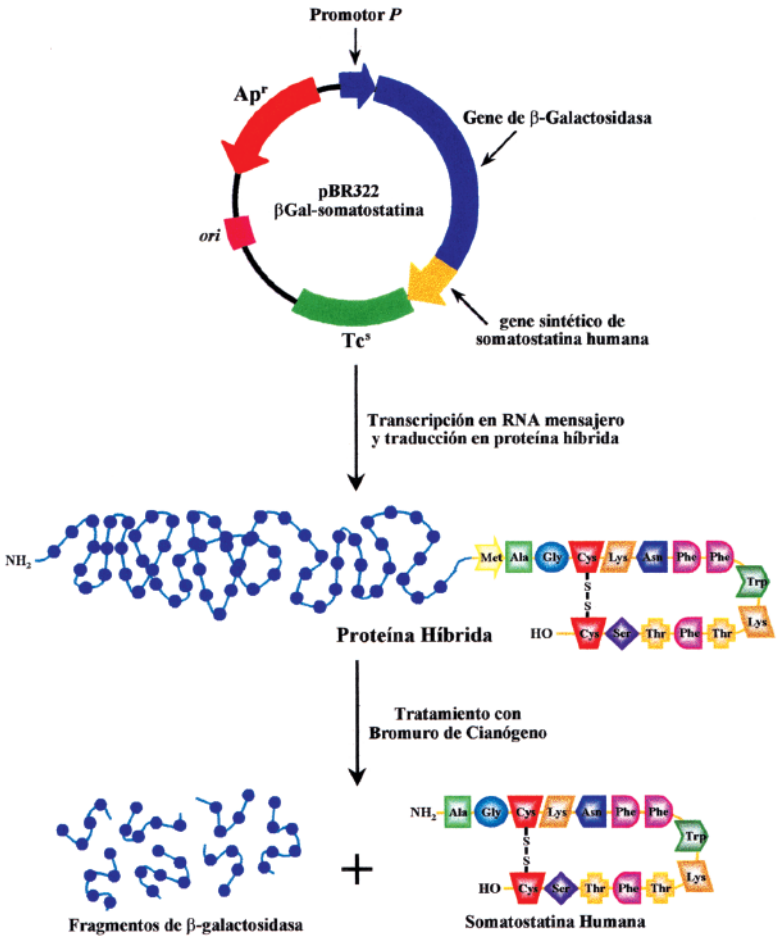


Figura IV.2

PRODUCCIÓN DE SOMATOSTATINA HUMANA EN BACTERIAS

Esquema en el que se muestran los procedimientos para sintetizar y clonar un gene híbrido que permitió la producción de la hormona humana somatostatina en la bacteria *Escherichia coli*. Este fue el primer experimento en que se demostró que es posible producir proteínas humanas en bacterias. En este caso, el gene sintético que codifica para la hormona, el cual estuvo construido a partir de ocho fragmentos de DNA sintéticos, fue unido al extremo del gene que codifica para la enzima β-galactosidasa de la bacteria *E. coli* y ambos fueron clonados en el plásmido pBR322. Después de transformar a la bacteria con el DNA recombinante, el plásmido híbrido permitió la síntesis de una proteína híbrida β-galactosidasa-somatostatina (con el segmento de somatostatina en el extremo carboxilo de la proteína), que al ser purificada y tratada con bromuro de cianógeno, permitió liberar a la hormona somatostatina, a la cual se le comprobó su actividad biológica.

richia coli. Inmediatamente a este experimento siguió, por el mismo grupo, la producción en bacterias de insulina humana, hormona que se utiliza para el tratamiento de la diabetes, y que por cierto es el primer producto comercial de la industria biotecnológica moderna. Hoy en día, en lugar de insulina obtenida de páncreas de cerdo y bovino, los diabéticos utilizan insulina recombinante idéntica a la humana" (1, 2, 3).

Estos experimentos, que fueron realizados en el lapso de dos años, de una manera y en un entorno ciertamente apasionantes, fueron realmente orientadores por muchas razones, además de las ya citadas en el libro de James Watson. Por un lado, se habían diseñado y construido genes sintéticos, a partir del conocimiento de la secuencia de los aminoácidos de estas hormonas humanas. Estos genes no existían en la naturaleza y sin embargo, funcionaron en la célula como verdaderos genes, codificando y permitiendo la producción de hormonas humanas en bacterias; esto, todavía hoy resulta increíble de asimilar. Otro aspecto realmente interesante, fue el de la organización misma del esfuerzo, en donde la coincidencia de experiencias, metodologías y conocimiento, dan lugar *de facto* como lo señala J. Watson, al nacimiento mismo de la biotecnología moderna.

La biotecnología moderna es una actividad multidisciplinaria que tiene como misión la utilización del conocimiento derivado de diferentes disciplinas y métodos, entre ellos los descritos en el capítulo anterior, para poder resolver problemas relevantes en diferentes áreas y sectores, como el de la salud, el industrial y el agrícola-pecuario, mediante el uso de los sistemas vivos, sus productos y sus partes. Las técnicas del DNA recombinante han permitido el desarrollo de una biotecnología moderna donde es posible diseñar organismos con nuevas propiedades, a través de incorporarles genes de diversas fuentes; y por ello lograr la producción de nuevas proteínas y metabolitos de interés comercial. Toda esta capacidad ha permitido el desarrollo de una nueva industria biotecnológica orientada a la producción masiva de una gran cantidad de moléculas y en particular proteínas recombinantes, muchas de ellas humanas, que antes no se podían obtener en cantidades importantes y que han tenido ya un impacto extraordinario principalmente en el sector de la salud, pero también en el agrícola-pecuario y en el industrial. Algunas de estas proteínas producidas por estas metodologías se muestran en la figura IV.3. Es importante señalar que el impacto de las técnicas de la ingeniería genética, a través del diseño y construcción de organismos genéticamente modificados, tendrán cada día un mayor impacto en la solución de problemas en todos los sectores mencionados. Finalmente,

Producto recombinante	*Uso*
Insulina humana	Diabetes
Interferón-a	Leucemia
Interferón-b	Infecciones bacterianas, cáncer
Interleucina-2	Inmunoterapia contra el cáncer
Hormona de crecimiento humana	Enanismo
Hormona de crecimiento bovina	Producción de leche y carne en ganado
Activador de plasminógeno celular	Infarto agudo del miocardio
Factor de necrosis tumoral	Cáncer
Factor VIII-C	Hemofilia
Entropoyetina	Anemia y falla renal crónica
Factor estimulante de crecimiento de colonia	Efectos de quimioterapia, SIDA
a-amilasa	Tratamiento de textiles
Lipasa	Detergentes
Subtilisina	Detergentes
Superóxido dismutasa	Transplante de riñón
Reninas	Producción de quesos
Enfermedad bovina de la boca	Vacuna bovina
Vacuna hepatitis B	Infección por virus de la hepatitis
Vacuna polio	Infección por virus de la polio
Anticuerpos de amplio espectro para diagnóstico	Pruebas diversas

Figura IV.3

ALGUNAS DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES PRODUCIDAS INDUSTRIALMENTE

Listado en el que se muestran algunas de las proteínas recombinantes que actualmente se utilizan en las industrias farmacéutica y alimentaria.

para aquellos interesados en profundizar en el impacto de las técnicas del DNA recombinante en la biotecnología moderna y en la importancia de estas técnicas para la solución de problemas nacionales relevantes en diferentes sectores, se recomienda la lectura de dos libros escritos por este mismo grupo de autores (4, 5).

Producción de proteínas recombinantes heterólogas de uso médico por métodos de DNA recombinante; los primeros ejemplos

Si bien la producción de somatostatina humana en bacterias reportada por Itakura y colaboradores en 1977 (2), fue *de facto* el primer ejemplo de síntesis de una hormona humana en microorganismos a partir de un gene sintético, esta proteína no se produce a nivel industrial. Como fuera mencionado, el primer producto recombinante que se produjo industrialmente y que fue autorizado por la Food and Drug Administration de los EUA, para su uso clínico en seres humanos, fue la insulina humana. Esta hormona es un compuesto formado por dos cadenas peptídicas A y B, unidas entre sí por puentes disulfuros (figura IV.4). El organismo humano la utiliza para regular el metabolismo del azúcar, y la incapacidad para producir la insulina, genera la enfermedad conocida como diabetes. Normalmente es producida en el páncreas y los diabéticos que no producen esta proteína, pueden contender con la enfermedad mediante la inyección de la hormona. Antes de que la insulina se produjera por métodos de DNA recombinante, se obtenía del páncreas de animales; sin embargo, la insulina de origen animal no es idéntica a la humana y en algunos individuos genera reacciones alérgicas.

Goeddel y colaboradores, en Genentech en 1977 (3), logramos por primera vez la producción de esta hormona humana en la bacteria *E. coli*. Para ello diseñamos y sintetizamos genes que codificaban para cada una de las dos cadenas (A y B) de aminoácidos que constituyen la insulina. Los dos genes sintéticos fueron insertados, de manera independiente e individualmente, en el extremo del gene que codifica para la proteína β-galactosidasa (proteína que hidroliza los galactósidos entre ellos la lactosa), de la bacteria *Escherichia coli,* de tal manera que las bacterias produjeran proteínas de fusión que tuvieran las secuencias de las cadenas de insulina unidas al final de la proteína β-galactosidasa (figura IV.5). Estas proteínas "híbridas" forman cuerpos de inclusión que se precipitan en el interior de las células bacterianas y por ello, se pueden puri-

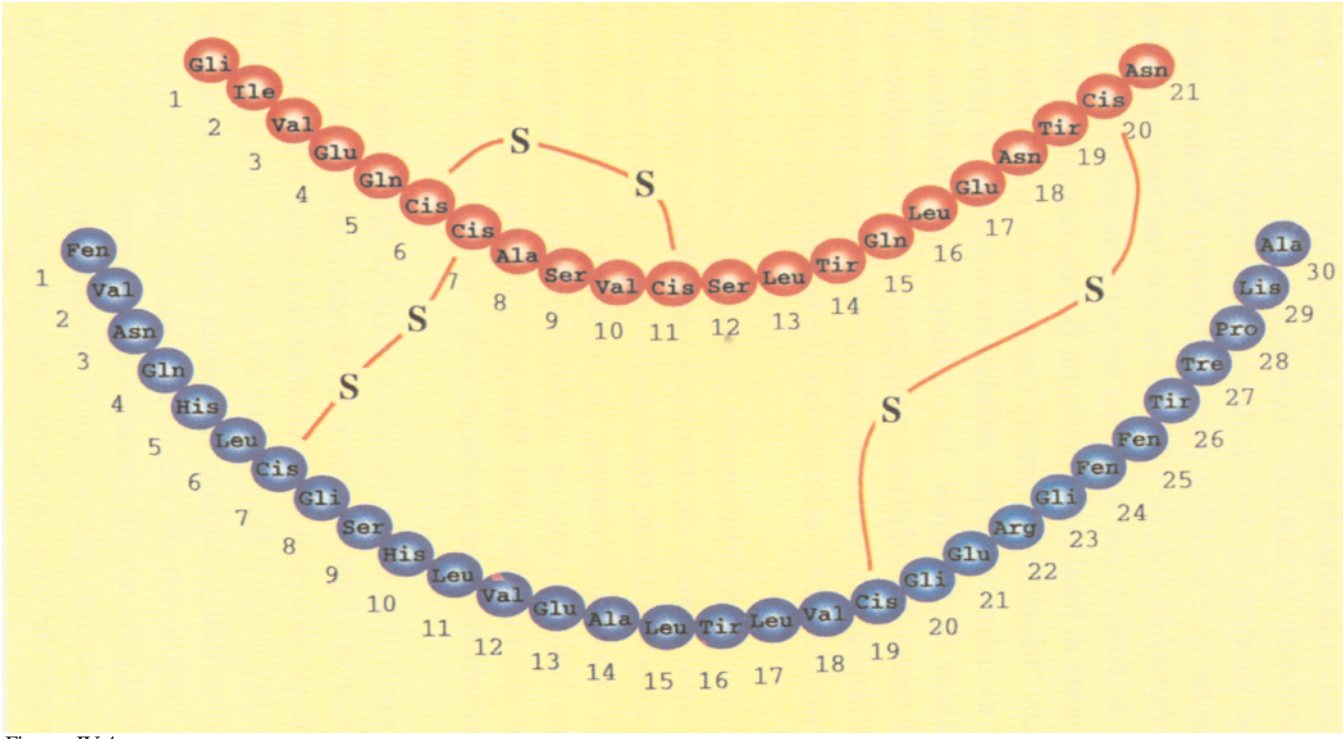


Figura IV.4

INSULINA HUMANA

La figura muestra la hormona insulina humana. Ésta es una molécula formada por dos péptidos llamados A y B, de 21 y 30 residuos de aminoácidos, respectivamente. Las dos cadenas A y B de insulina están unidas entre sí por dos puentes disulfuro. Existe además, un puente disulfuro adicional entre residuos de aminoácidos de la cadena A.

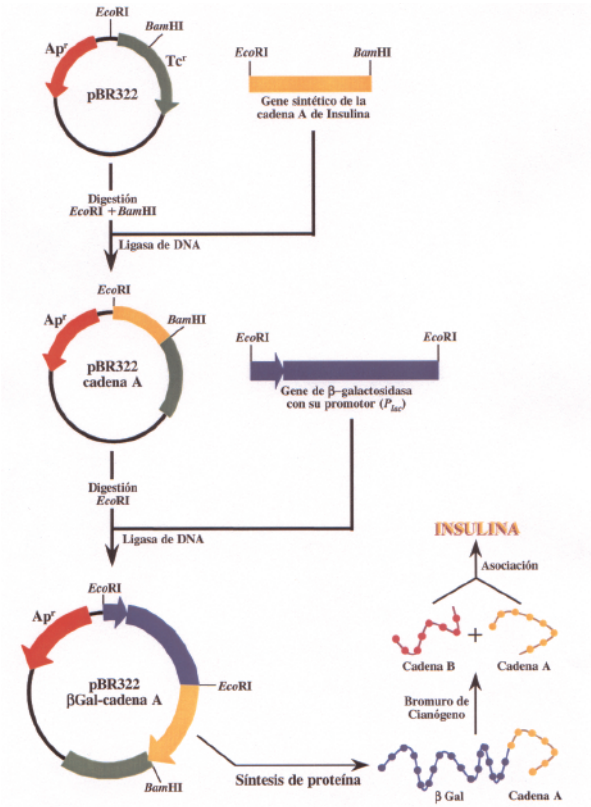


Figura IV.5

PRODUCCIÓN DE INSULINA HUMANA EN LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI*

La insulina humana recombinante fue la primera proteína recombinante producida comercialmente por estos métodos. Fue elaborada originalmente mediante la expresión, por separado, de los dos genes sintéticos que codifican para las cadenas A y B que forman esta hormona. Una vez sintetizadas cada una de estas cadenas por separado en cultivos diferentes de *E. coli*, fueron purificadas y unidas por métodos químicos para generar la insulina. Cada uno de los genes codificantes para cada cadena fueron sintetizados y ligados a un vector de expresión para que pudieran ser correctamente transcritos y traducidos en forma de una proteína de fusión con la enzima β-galactosidasa. El vector de expresión fue introducido en *E. coli*, y la proteína híbrida β-gal-cadena A o B de insulina se sintetizó y se acumuló en el citoplasma de las bacterias productoras. Las células se cosecharon y cada una de las proteínas de fusión se purificó por separado. Entre la región codificadora de las cadenas y el precursor de β-galactosidasa se agregó un triplete con el codón ATG el cual codifica para el aminoácido metionina, por lo que el tratamiento con bromuro de cianógeno que produce rompimiento de los residuos de metionina, libera intactas las cadenas de insulina. Las cadenas A y B se unen químicamente para producir insulina activa.

ficar fácilmente. Las cadenas de insulina fueron separadas del resto del péptido acarreador con tratamiento con bromuro de cianógeno, y posteriormente fueron purificadas y asociadas en condiciones adecuadas de oxidación para obtener insulina activa (figura IV.6). En el capítulo IX, se reseñan en detalle bioprocesos desarrollados desde punto de vista de la bioingeniería para la producción comercial de esta hormona.

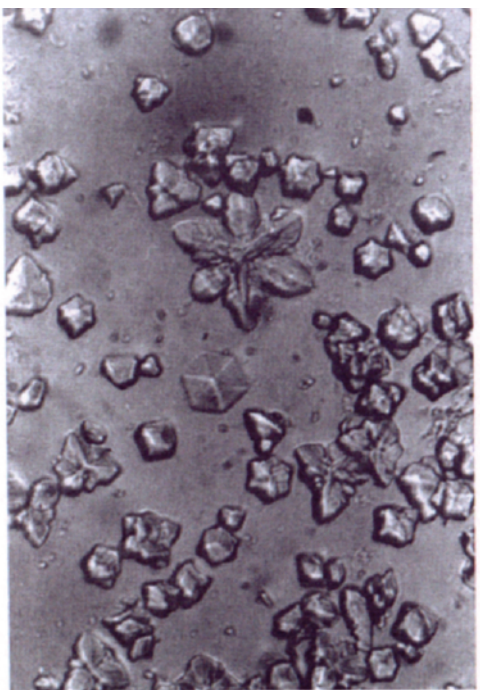


Figura IV.6

INSULINA HUMANA

Cristales de insulina humana producida en bacterias diseñadas y construidas en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, mediante el uso de técnicas de la ingeniería genética.

La insulina humana recombinante, se produjo comercialmente en una primera etapa, a partir de extractos bacterianos. Sin embargo, actualmente existe tecnología que también permite su producción en otros organismos. La siguiente proteína recombinante de origen humano que se sintetizó en microorganismos fue la hormona de crecimiento (6). Ésta es una proteína que se utiliza para el tratamiento de problemas de crecimiento y enanismo en niños.

Si bien los ejemplos de la insulina y de la hormona de crecimiento demostraron el uso de los microorganismos como sistemas sencillos para la producción de proteínas humanas recombinantes, ha sido necesario desarrollar, como se ha mencionado, otros sistemas para producir proteínas humanas más complejas, que en muchos casos requieren de cierto tipo de modificación a nivel postransduccional para ser funcionales en el cuerpo humano como por ejemplo, acetilación, glicosilación, metilación, proteólisis, etc. El primer ejemplo de una proteína recombinante producida en células de mamífero, fue el activador de plasminógeno de la sangre, llamado también tPA, que es una molécula que participa en el proceso de degradación de los coágulos de la sangre. Al ser administrado el tPA en cantidades y tiempos adecuados a pacientes con infartos del miocardio, ayuda a contender con la disolución de los coágulos, evitándose así muchos de los problemas de necrosis del corazón (7, 8).

Son muchos los ejemplos de sistema de células de mamíferos o de otros organismos como insectos o plantas que han permitido la producción de otras proteínas humanas de interés médico. Varios de estos ejemplos se muestran en la figura IV.3; sin embargo, es relevante señalar que son solamente un primer subconjunto muy pequeño aún, del numeroso grupo de proteínas humanas que actualmente están en proceso de diseño, producción y pruebas clínicas que incrementarán de una manera extraordinaria el arsenal de proteínas humanas con el que contaremos para contender con nuestras enfermedades (9, 10).

Vacunas y anticuerpos recombinantes

Uno de los avances más importantes de la biotecnología médica, ha sido, sin duda, la producción de vacunas para contender con muchas de las grandes plagas que ha sufrido la humanidad. Pasteur y Jenner son los padres de la inmunología moderna y a ellos se debe el desarrollo de las primeras vacunas utilizadas masivamente (11). Sin embargo, muchas de las vacunas usadas, inclusive hasta en fechas actuales, generan reacciones alérgicas importantes en muchos individuos, ya que para su fabricación se utilizan los propios agentes infecciosos o alguno de sus componentes, a los que previamente se les ha modificado para destruir su capacidad infecciosa, a través de tratamientos con productos químicos y condiciones fisicoquímicas adecuadas. Estos tratamientos, sin embargo, como se mencionara para cierto tipo de vacunas, siguen generando problemas inmunológicos en una pequeña fracción de la población vacunada.

Las técnicas de ingeniería genética y la biotecnología moderna han permitido contender con esta problemática, produciendo proteínas recombinantes puras, derivadas de organismos infecciosos, que puedan ser utilizadas como inmunógenos o antígenos para proteger el organismo vacunado. La primera de estas proteínas recombinantes utilizada con este propósito fue una de las proteínas que normalmente tiene el virus que provoca hepatitis B en su superficie o coraza externa. El grupo de Valenzuela y colaboradores clonaron el gene que codifica para esta proteína en la levadura y, a través de un sistema de expresión adecuado, lograron la producción a gran escala de esta proteína (12). Al inyectar en animales la proteína como inmunógeno, se determinó que permite producir anticuerpos específicos contra el virus de la hepatitis B. Esta proteína se utiliza actualmente como la primera vacuna de origen recombinante en humanos y permite la protección contra el virus que provoca la hepatitis B. En la actualidad se trabaja en el desarrollo de otras muchas vacunas recombinantes (9, 13, 14) (figura IV.3).

Otra área de gran interés para la medicina, en donde los métodos de la ingeniería genética han tenido y están teniendo un gran impacto, es el área de la producción de anticuerpos específicos dirigidos no sólo contra agentes infecciosos, como los virus y muchos microorganismos patógenos, sino también contra cierto tipo de tumores carcinógenos y también como sistemas de diagnóstico (15 16, 17, 18). Los anticuerpos son proteínas que se producen en el sistema inmunológico y que tienen la capacidad de asociarse, cada tipo de anticuerpo, con el antígeno específico que se utilizó para provocar su síntesis. En el ejemplo anterior de la vacuna contra el virus de la hepatitis B, la proteína recombinante de la coraza del virus funciona como antígeno y el cuerpo humano produce anticuerpos específicos contra esta proteína, generándose así la inmunidad o la protección contra este virus específicamente.

Las técnicas de ingeniería genética han permitido clonar los genes que producen los anticuerpos específicos, tanto de humanos como de otros animales como el ratón. A través de la recombinación *in vitro* del material genético de regiones específicas de estos genes, es posible fabricar anticuerpos de conejo o de ratón "humanizados", los cuales empiezan a utilizarse en el tratamiento de cierto tipo de cánceres, orientados a la destrucción de tumores (9, 16) (figura IV.3).

Los ejemplos de proteínas de interés médico que han sido mencionados, son el resultado del desarrollo de sistemas biológicos en los cuales se generan de manera permanente o transitoria, cultivos de células (de microorganimos o de organismos superiores) transgénicas (1, 19). Una bacteria transgénica, por ejemplo, es aquella que tiene el gene que codifica para insulina humana y mediante el cual esta bacteria y toda la población de células hijas que se generan de ella, es decir todas sus clonas, son capaces de producir insulina humana (2).

Las células de levadura que producen el antígeno del virus de la hepatitis son también levaduras transgénicas para este gene. La posibilidad de incorporar y en su caso expresar genes humanos (y de otro origen) en otros organismos, no sólo en microorganismos, es una alternativa para la producción de proteínas de interés. A la fecha, son muchos los ejemplos mediante los cuales ha sido posible producir proteínas humanas o de otros organismos en plantas y animales transgénicos. Los dos primeros ejemplos en el área de la salud que se tienen, son la generación de una vaca transgénica que produce hormona del crecimiento humano, y la construcción de un cerdo transgénico que produce hemoglobina humana. Para construir estos animales transgénicos, y en general para el diseño de todo organismo transgénico, es necesario definir cuál es el gene o conjunto de genes, que se desean expresar en el organismo receptor. Existen diferentes estrategias para diseñar y eventualmente obtener este tipo de organismos, aunque las dos más comúnmente utilizadas son: a) la de incorporar, mediante algún vector apropiado en alguno de los gametos (el esperma o el óvulo), el gene que se desea integrar y eventualmente expresar; y b) alternativamente, se puede intentar expresar genes específicos en animales u organismos adultos, integrando el gene en cuestión en el núcleo de células de algún órgano específico (páncreas, hígado, etc.) del organismo bajo estudio. Para ello es necesario desarrollar estrategias y herramientas, en particular vehículos moleculares adecuados, que aseguren la llegada del gene en cuestión al tejido u órgano que se desea modificar.

En otras áreas como la agrícola o la industrial, existen numerosos ejemplos que han permitido la creación de organismos transgénicos con propiedades novedosas y optimizadas para contender con diferentes problemas. Entre estos ejemplos, claramente resalta el caso de los cultivares

transgénicos para contender con problemas de resistencia a plagas y a condiciones ambientales extremas. Asimismo, existen varios ejemplos en el sector industrial en donde el uso de organismos transgénicos ha permitido desarrollar procesos optimizados y más atractivos, no sólo desde el punto de vista económico, sino también ambiental. Algunos de los ejemplos más significativos serán mencionados en los siguientes capítulos de este libro.

Es indudable que este tipo de estrategia para transformar y generar plantas y animales transgénicos, también puede ser aplicado al ser humano. La posibilidad de transformar tejidos en seres humanos que son incapaces de llevar a cabo alguna de sus funciones originales de una manera normal, por existir una deficiencia en uno o varios genes de este tejido, representa una alternativa importante para el tratamiento de cierto tipo de enfermedades genéticas. De hecho esta estrategia ya ha sido utilizada para este fin y en el caso de curación de enfermedades genéticas recibe el nombre de "terapia génica", tal y como ha sido señalado en el capítulo anterior.

La industria biotecnológica moderna está en su inicio y somos testigos también de la aparición de nuevos productos para uso no sólo médico sino industrial, agrícola y para el tratamiento de la contaminación ambiental, que sólo representan la punta del iceberg.

Los nuevos productos son el resultado de lo que hoy ya es una tecnología relativamente rutinaria de aislamiento, clonación y expresión de genes para adecuar y mejorar las capacidades de las células, de sus genes y de sus proteínas. Sin embargo, ésta es sólo la primera etapa de la biotecnología moderna, ya que la humanidad seguirá desarrollando técnicas poderosas que permitan cambiar y optimizar procesos industriales y de recuperación de ecosistemas contaminados (4, 5).

Bibliografía

1. Watson, J., M. Gilman, J. Wilkowski, M. Zoller. *Recombinant DNA;* Scientific American Books, Freeman, Co., NY, USA (1992).
2. Itakura, K., T. Hirose, R. Crea, Riggs, H. Heyneker, F. Bolívar, H. Boyer. Expression in *E. coli* of chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science,* 198: 1056-1063 (1977).
3. Goeddel, D., D. Kleid, F. Bolívar, H. Heyneker, D. Yansura, R. Crea, T. Hirose, A. Kraszewski, K. Itakura, A. Riggs. Expression of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 106-110 (1979).

4. Bolívar F. y coautores. *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: retos y oportunidades.* Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Fondo de Cultura Económica, México (2002).
5. Bolívar F. y coautores. *Recomendaciones para el desarrollo de la biotecnología en México.* Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Academia Mexicana de Ciencias, Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados, Instituto de Biotecnología, UNAM, México (2003).
6. Goeddel, D., H. Heyneker, T. Hozumi, R. Rentzen, K. Itakura, D. Yansura, M. Ross, G. Miozzari, R. Crea, P. Seeburg. Direct expression in *Escherichia coli* of DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature,* 281: 544-548 (1979).
7. Pennica, D., W. Holmes, W. Kohr, R. Harkins, G. Vehar, C. Ward, W. Bennett, E. Yelverton, P. Seeburg, H. Heyneker, D. Goeddel, D. Collen. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli. Nature,* 301: 214-221, (1983).
8. Paborsky, L., B. Fendly, K. Fisher, R. Lawn, B. Marks, G. McCray, K. Tate, G. Vehar, C. Gorman. Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen. *Prot. Eng.* 3: 547-553 (1990).
9. PhARMA. *New medicines in development: Biotechnology a 2000 Survey.* Pharmaceutical Association of Research Manufacturers of America (2000).
10. Dawson, J. *Biotechnology today. Performance and prospects to 2000,* chapter 2, The key sectors. A financial times management report, London (2000).
11. Pasteur, L. Methode pour prevenir la ragepres morsure. *C.R. Acad. Sci.*, 101: 765-780 (1885).
12. Valenzuela, P., A. Medina, W. Rutter, G. Mimerer, B. Hall. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature,* 298: 347-350 (1982).
13. Raychaudhuri, S., L. Rock. Fully mobilizing host defense: building better vaccines. *Nature Biotechnol.,* 16: 1025-1031 (1998).
14. Tsafrir, S.M., M.A. Gómez-Lim, K.E. Palmer. Perspective: edible vaccine a concept coming of age. *Trends in Microbiol.* 6: 449-453 (1998).
15. Winter, G., C. Milstein. Man-made antibodies. *Nature*, 349: 293-299, (1991).
16. Carter, P., L. Presta, C. Gorman, J. Ridgway, D. Henner, W. Wong, A. Rowland, C. Kotts, M. Carver, M. Sheppard. Humanization of an antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285-4289 (1992).
17. Houghton, A.N., D.A. Scheinberg. Monoclonal antibody therapies-a'constant' threat to cancer. *Nature Med.,* 6: 373-374 (2000).
18. Rosenberg, E.S., M. Altfeld, S.H. Poon, M.N. Phillips, B.M. Wilkes, R.L. Eldridge, G.K. Robbins, R.T. D'Aquila, P.J.L. Goulder, B.D. Walker. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature,* 407: 523-526 (2000).
19. Klug, W.S. Cummings M.R. Conceptos de Genética. Prentice Hall, Madrid (1999).

Capítulo V

MANIPULACIÓN GENÉTICA DE ANIMALES
TRANSGÉNESIS Y CLONACIÓN

H. Barrera Saldaña

Diseño y construcción de los primeros animales transgénicos

El funcionamiento de los organismos vivos está gobernado por conjuntos de genes. Diferencias en su contenido, variaciones e incluso la manera en que se organizan éstos a lo largo de los cromosomas, determinan las características de cada una de las especies. Alterando esta disposición, se puede modificar el desempeño original de los organismos. La posibilidad de alterar este proceso puede darse al transferir un gene responsable de determinada característica en un organismo hacia otro, al cual se le pretende incorporar la nueva característica. De allí el nombre de organismo transgénico o genéticamente modificado (OGM) (1).

Este tipo de tecnología permite transferir información genética de plantas, bacterias o virus hacia otros organismos, combinar genes de vegetales con otros vegetales, de animales entre sí o de vegetales con animales, superando las llamadas "barreras naturales" que diferencian a unas especies de otras. Las técnicas para construir microorganismos transgénicos han sido descritas en capítulos anteriores y en éste nos concentraremos inicialmente en describir las técnicas involucradas en la construcción de animales transgénicos, y continuaremos con la descripción del uso de estos organismos.

Los animales transgénicos son aquellos en los que al inicio de su desarrollo embrionario sus genomas fueron modificados por la inserción de fragmentos de DNA para introducir, eliminar, cambiar o combinar características genéticas deseables de la misma u otra especie (2). Los animales transgénicos se han empleado por años para estudiar la función de los genes o para generar modelos de estudio de enfermedades humanas. También han llegado a convertirse en biorreactores industriales produc-

tores de biológicos para uso humano, como son las hormonas y otras proteínas de importancia médica (3, 4); e inclusive se están empleando en la producción de órganos, diseñados especialmente para transplantes y que no presentan los problemas del rechazo inmune (5). También han sido empleados en investigaciones sobre el desarrollo, las patologías y el diseño de tratamientos, entre otros. Uno más de los campos donde se está investigando intensamente es en el área pecuaria, generando transgénicos para el mejoramiento de la calidad y cantidad de los alimentos de origen animal

En la actualidad, los animales transgénicos aún no han sido tan estudiados como sus equivalentes en plantas, que incluso ya están en el mercado. Sin embargo, resultan muy relevantes por las contribuciones que aportan al avance del conocimiento de la fisiología y genética de los animales y sus extrapolaciones a la raza humana.

En ciertos casos, los resultados que arrojan algunos modelos animales tradicionales empleados para investigar las causas y desarrollo de las enfermedades del hombre, no han sido favorables (6, 7), y por ello se tiene que recurrir a realizar la investigación en otra especie o modelo con alguna característica especifica; es aquí donde el estudio de los animales transgénicos se diversifica y se profundiza (8).

Los primeros adelantos que hicieron posible la transgénesis animal se remontan al desarrollo de las técnicas de ingeniería genética para la construcción de plásmidos recombinantes y de manipulación y cultivo de embriones (9). Los primeros ensayos para generar ratones transgénicos tuvieron su inicio en 1980 (10), y consistieron en la inyección de DNA de ratón en uno de los pronúcleos (generalmente el masculino por ser el de mayor tamaño) de un cigoto de la misma especie. Con esto se inició una nueva era en la manipulación genética de embriones de mamíferos (tabla V.1).

En 1981 se demostró la integración y transmisión estable a través de la línea germinal de genes inyectados en pronúcleos de cigotos de ratón obtenidos por fertilización *in vitro* (11). El paso siguiente consistió en demostrar que también se podían obtener ratones transgénicos que incorporaran en su genoma un gene de otra especie (12). Pero tal vez el experimento más dramático consistió en demostrar que el producto de un transgene, el correspondiente a la hormona del crecimiento (GH), inducía un cambio fenotípico dramático en el ratón transgénico (13) (figura V.1).

TABLA V.1 CRONOLOGÍA DE LAS MANIPULACIONES GENÉTICAS DE MAMÍFEROS

Año	*Autores*	*Aportación*
1938	Spemann y colaboradores	Plantean experimento de transferencia nuclear
1949	Hammond y colaboradores	Mantienen embriones de ratón en cultivo *in vitro*
1961	Tarkowski y colaboradores	Logran ratones quiméricos combinando embriones
1966	Lin y colaboradores	Describen la técnica de microinyección en embriones de ratón
1980	Gordon y Ruddle	Obtienen los primeros ratones transgénicos por microinyección de ADN en el pronúcleo de cigotos de ratón
1981	Evans y Kaufman	Obtienen células embrionarias totipotenciales de ratón
1982	Palmiter y colaboradores	Obtienen ratones transgénicos gigantes con el gene de la hormona del crecimiento de la rata
1983	Palmiter y colaboradores	Obtienen ratones transgénicos gigantes con el gene de la hormona del crecimiento humano
1983	McGrath y Solter	Desarrollan una nueva técnica para experimentos de transferencia nuclear en ratón
1985	Hammer y colaboradores	Obtienen animales de granja transgénicos (conejos, ovejas, cerdos) para el gene de la hormona del crecimiento humano
1987	Thomas y colaboradores	Obtienen los primeros ratones "Knock-out" por recombinación homóloga
1989	Clark y colaboradores	Obtienen ovejas transgénicas con el gene humano del factor IX de la coagulación de la sangre
1991	Wright y colaboradores	Obtienen ovejas transgénicas con el gene huma no de la l-antitripsina
1991	Ebert y colaboradores	Obtienen cabras transgénicas con el gene humano del activador tisular de plasminógeno
1991	Krimpenfort y colaboradores	Obtienen vacas transgénicas con el gene humano de la lactoferrina
1993	Nagy y Rossant	Obtienen ratones quiméricos por co-cultivo de embriones
1993	Schedl y colaboradores	Obtienen ratones transgénicos con cromosomas artificiales de levaduras
1994	Brinster y colaboradores	Obtienen ratones transgénicos por transplante de espermatogonias
1996	Campbell y colaboradores	Obtienen clones de ovejas por transferencia nuclear de células embrionarias en cultivo
1997	Wilmut y colaboradores	Clonan ovejas mediante técnicas de transferencias nuclear de células fetales adultas en cultivo
1997	Schnieke y colaboradores	Obtienen clones de ovejas transgénicas por transferencia nuclear a partir de células fetales diferenciadas
1998	Cibelli y colaboradores	Llevan acabo clonación de vacas transgénicas por transferencia nuclear a partir de células fetales
1999	Baguisi y colaboradores	Reportan la obtención de cabras transgénicas
1999	Yanagimachi y colaboradores	Obtienen ratones transgénicos mediante la co-inyección de cabezas de espermatozoides y ADN exógeno

Fuente: http://www.prodiversitas.bioetica.org/des18.htm

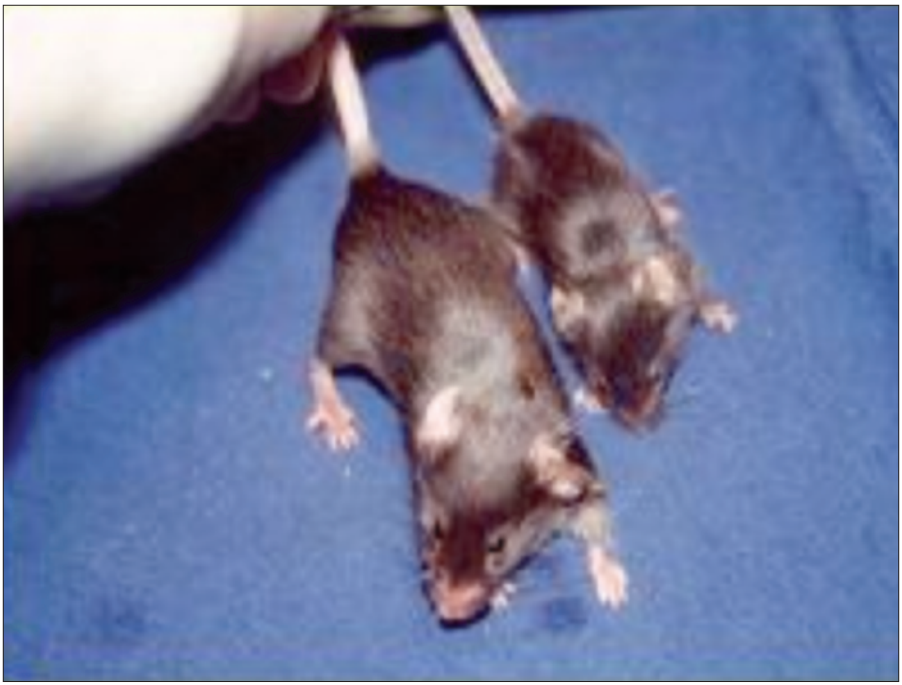


Figura V.1
RATONES TRANSGÉNICOS PARA LA HORMONA DEL CRECIMIENTO
El ratón de la izquierda es transgénico al portar el gene de la hormona del crecimiento de la rata, mientras que el de la derecha no lo es y pertenece a la misma camada.

Auge de la transgénesis experimental

Algunos reportes indican que entre 1990 y 1999, el número de animales transgénicos utilizados experimentalmente se incrementó en más de 1 000%. En contraste, el número total de los animales utilizados en todos los campos de investigación disminuyó en 17%, durante el mismo periodo. Los procedimientos que implican animales transgénicos ahora significan el 19% de todos los experimentos conducidos en animales (14).

Las estadísticas indican que el método de transgénesis más utilizado ha sido la microinyección de DNA en el pronúcleo de cigotos. Sin embargo, la eficiencia es baja, pues una proporción variable de animales transgénicos normalmente no presentan el patrón de expresión génica esperado. En algunos casos se detecta expresión ectópica del transgén y, lo

que es más frecuente, su silenciamiento o inactivación. Así pues, el intentar comprender cómo se puede mejorar y optimizar la expresión de un transgén, no es sólo importante desde el punto de vista de la biología básica, sino que es de gran relevancia para las aplicaciones en biotecnología y terapia génica, a tal punto de poder decir que solamente de 1 a 3% de los animales tienen las características buscadas. La razón de lo anterior es que la integración del transgén ocurre al azar en cualquier lugar del genoma y su expresión es dependiente del número de copias e influenciada por el sitio cromosómico del lugar de inserción (15).

A pesar de que las tecnologías de transgénesis han podido ser extrapoladas a otras especies, hoy en día 95% de todos los animales transgénicos son ratones. Sin lugar a dudas los modelos murinos siguen siendo excelentes alternativas para la investigación, por contener la mayoría de las características que se requieren en investigación y por su facilidad de manipulación (16).

Por otro lado, hay que tomar en cuenta que, mucha de la controversia que rodea a los animales transgénicos se ha centrado en su explotación comercial. El primer animal transgénico que se patentó fue un onco-ratón generado por la Universidad de Harvard en el año de 1988 (17).

El onco-ratón fue creado insertando el transgen humano de un tumor de cáncer en embriones de ratón. Actualmente dicho modelo se utiliza entre otros para protocolos preclínicos, pero es de resaltar que la patente está siendo revocada o al menos cuestionada en varios países (18).

Metodología para la construcción de animales transgénicos

La transgénesis es una herramienta muy útil para el estudio de la expresión tejido-específico de genes (19), el desarrollo de modelos de enfermedades del humano y para fabricar proteínas terapéuticas. Actualmente se puede llevar acabo por varias técnicas que presentan ventajas y desventajas. Dependiendo de lo que se quiera lograr, son los procedimientos a utilizar, que en general se dividen en tres grupos: físicos, químicos y biológicos; pero en la mayoría de las ocasiones es común la utilización de dos y hasta de tres de estos procedimientos a la vez.

a) Métodos físicos

Los métodos físicos de transgénesis se caracterizan por la utilización de adyuvantes como la corriente eléctrica directa (en el caso de la elec-

troporación) y ondas sonoras de baja frecuencia (como en el caso de la sonicación), por mencionar algunas de las técnicas integrantes de este apartado. Sin embargo, la técnica más utilizada tanto para transgénesis como para clonación es la microinyección directa (20).

Microinyección

La técnica de transferencia de genes más utilizada en mamíferos y que ha sido más exitosa es la microinyección directa de "DNA desnudo" en los pronúcleos del óvulo recién fecundado, o en el citoplasma en el caso de vertebrados inferiores e invertebrados (21) (figura V.2). Una vez realizada la microinyección, los óvulos se introducen en los oviductos de hembras receptoras en las que se han sincronizado las condiciones del oviducto mediante el apareamiento previo con un macho vasectomizado. Los ovocitos pueden tolerar la microinyección de genes y ser cultivados *in vitro* hasta un estado de desarrollo más avanzado (blastocisto) (22, 23). La principal ventaja de este método es la facilidad con que se aplica en una amplia variedad de especies, siendo los ratones los primeros organismos transgénicos obtenidos mediante este método.

Como se mencionó anteriormente, el caso que más atención llamó a nivel mundial fue el de los ratones transgénicos gigantes generados al inyectar en el pronúcleo de un cigoto de ratón el gene de la rata que co-

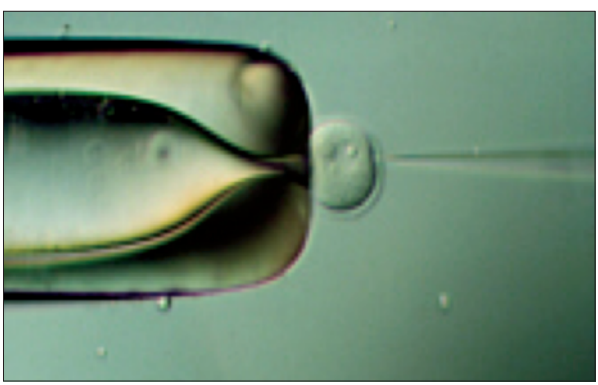


Figura V.2

MICROINYECCIÓN DE OOCITOS DE RATÓN PARA INSERTAR UN GENE FORÁNEO

Mientras un capilar succiona para fijar al oocito, otro en forma de aguja penetra hasta el pronúcleo masculino (el más grande) para depositar la solución con el gene de interés.

difica para la hormona del crecimiento. Incluso en otro experimento se observaron resultados similares cuando al modelo murino se le introdujo por esta técnica el gene humano que codifica para esta hormona (24).

La eficiencia inicial obtenida fue del 2% de integración génica en el total de embriones tratados, la que posteriormente ha aumentado a niveles del 30%. La obtención de embriones transgénicos mediante esta técnica también se ha logrado implementar en animales superiores como vacas (25), ovejas (26), cabras (27) y cerdos (28), pero con eficiencias bastante menores a las cifras señaladas en ratones.

Sonicación

La sonicación es un método relativamente nuevo de transferencia de genes en protoplastos y en células intactas de vegetales. El mecanismo de acción de la sonicación se cree está sustentado en las características acústicas de las ondas sonoras, particularmente a bajas energías (29).

Mediante sonicación se ha introducido de manera eficiente DNA plasmídico en protoplastos, lográndose una expresión transitoria de un gene. Aunque no se conoce el mecanismo preciso de permeabilización de la membrana inducido por la sonicación, el hecho de que pueda ser utilizada en ovocitos, células en suspensión y fragmentos de tejido, aunado a la sencillez del equipo requerido, hacen que esta técnica pueda tener potencial en el futuro en el área pecuaria. Sin embargo, los efectos de este proceso involucran la formación de radicales libres, daños en la pared celular, alteraciones en la permeabilidad de la membrana, y cambios de tipo fisiológico; por lo que aún está por verse si esta técnica llegó para quedarse (30, 31).

Electroporación

El uso de la electroporación llegó a ser muy popular en los años de la década de 1980, porque resultó ser una manera excepcionalmente práctica de introducir medicamentos, DNA u otras moléculas en las células. Al final de esa década, los científicos comenzaron a utilizar la electroporación para los usos en tejido fino multicelular (32) (figura V.3).

Los blastocistos incorporan eficientemente el DNA del medio si se les somete a electroporación. El propio proceso de aislamiento de blastocistos probablemente induce la formación de células competentes en el estado adecuado. Si se dispone de poblaciones de blastocistos que con-

tengan células competentes, el DNA exógeno es integrado fácilmente vía recombinación no-homóloga (33).

La investigación ha demostrado que la inducción de electroporos es afectada por factores importantes, tales como la variabilidad biológica que pudiera existir entre célula y célula, aunque los cambios tanto fenotípicos como genotípicos resultaran mínimos. Finalmente, tanto el voltaje, como el tiempo y el diámetro del poro, son también parámetros que se deben considerar al utilizar esta técnica para manipular cada uno de los diferentes tipos celulares, no sólo cuando se busca su aplicación con fines de transgénesis, sino en todas sus modalidades, pues a pesar de la poca explotación que tiene esta técnica, es una de las más socorridas en materia de aplicación (34).

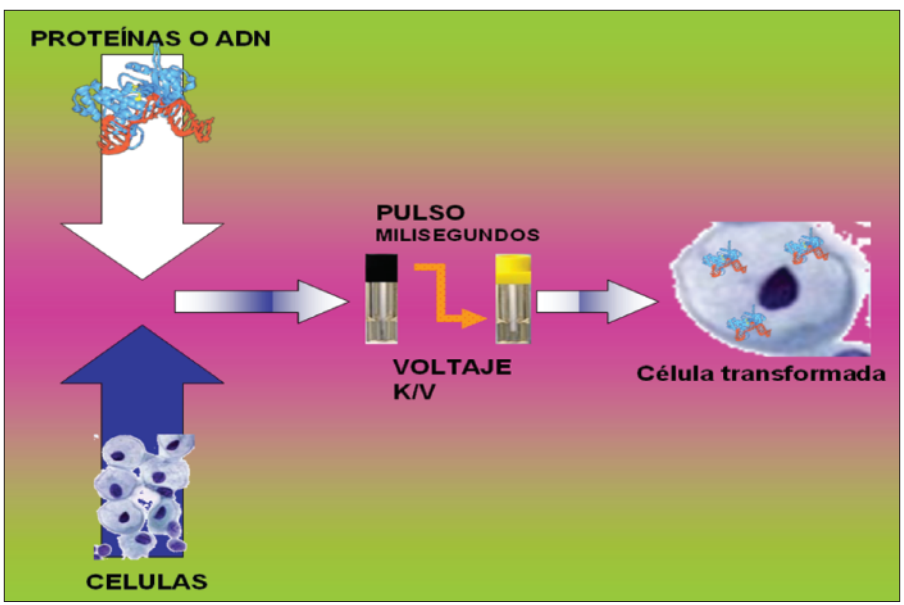


Figura V.3

DIAGRAMA DE FLUJO EN LA ELECTROPORACIÓN

La membrana celular es permeabilizada al DNA y a proteínas por el pulso eléctrico al que se someten por instantes.

b) Métodos químicos

Actualmente se está diseñando una serie de productos, tanto monoméricos como poliméricos, útiles en el acarreo del material genético al interior de la célula, para procesos de transformación genética.

Fibras

Recientemente se ha descrito un método de transferencia de DNA mediante fibras que actúan como micro agujas. Éste consiste en un bombardeo hacía los tejidos, células y órganos con partículas ya sean de oro o tungsteno cargadas o recubiertas con el DNA, mediante disparos de helio como si fuera una pistola dirigido hacia el blanco. El bombardeo del DNA se realiza y se obtiene la expresión transitoria del gene (35, 36). Este proceso es más o comúnmente conocido por su principio y del cual se deriva su nombre "gen-gun" o biobalística.

Aún falta elucidar los mecanismos moleculares que actúan en estas transformaciones, así como ensayar nuevos materiales fibrosos que incrementen la eficiencia del proceso.

Liposomas

Los métodos de transferencia mediados por liposomas ofrecen como ventaja con respecto a la transferencia directa de DNA, la protección contra las nucleasas que proporciona la membrana. Sin embargo, la baja eficacia de transfección, y un cierto grado de toxicidad celular pueden fungir como desventajas (37).

c) Métodos biológicos

La generación de animales transgénicos actualmente es menos complicada gracias a las técnicas de transfección celular y a la tecnología de transferencia nuclear (38).

Virus

Utilizando la eficiente capacidad de infección de algunos virus (por ejemplo los adenovirus), se les pueden emplear como vectores para introducir genes dentro de embriones (39). Esta estrategia ha sido pro-

bada con resultados interesantes principalmente en experimentos *in vitro* con embriones humanos, aunque se tienen también algunas experiencias con embriones de ratones y de aves (40, 41). En el futuro podría ser una alternativa para el desarrollo de animales transgénicos. Los retrovirus son capaces de transportar la secuencia génica que se quiera insertar hasta el núcleo de las células receptoras. Sin embargo, como con la microinyección, también aquí el gene se inserta al azar en el genoma (42). Puesto que el DNA se localiza en distintos lugares en células diferentes, los animales que nacen de esta forma suelen denominarse quimeras, pues no siempre expresan completamente la característica que aporta el nuevo gene insertado, porque no todas sus células lo portan (43). Por ello, es necesario realizar cruzas y selecciones hasta conseguir el animal completamente transgénico. La transmisión hereditaria del transgén sólo es posible si el retrovirus se integra en algunas de las células germinales.

Vectores espermáticos

La utilización de espermatozoides como vehículo de genes hacia el interior de los óvulos, ha permitido obtener animales transgénicos. Se han realizado varias construcciones en aves (44), peces (45), bovinos (46) y porcinos (47), con resultados todavía pobres y donde los transgenes han sufrido modificaciones severas en su estructura. No obstante, esta técnica ha dado buenos resultados en ovinos, con mayores rendimientos en la cantidad obtenida de embriones transgénicos y sin modificaciones aparentes en el genoma (48).

Células estaminales

Las células madre, estaminales (CE) o troncales son células indiferenciadas que tienen el potencial de convertirse en cualquier tipo de célula del organismo. Cultivadas en el laboratorio, las CE se pueden someter a modificaciones genéticas en forma predeterminada, para conseguir la eliminación o sustitución de un gene completo o de sólo un par de nucleótidos. Esto se logra con la selección en los cultivos de aquellas células en cuyos genomas se efectuaron los procesos de recombinación diseñados por los investigadores para conseguir al objetivo deseado (49). Las CE modificadas se inyectan en embriones, en etapa de blastocisto, y el animal resultante (quimera) se somete a cruzas, buscando que final-

mente alguno de los espermatozoides positivos para la modificación genética fertilice un óvulo igualmente modificado, con lo que se obtendrá el transgénico con las características deseadas (50).

Este método se ha llevado acabo con éxito en ratones, sobre todo para generar individuos que carecen de un gene determinado (llamados "knock out") y que son muy útiles en investigación, auque todavía no se ha extendido a otro tipo de animales superiores (51).

Animales transgénicos con fines de investigación básica y aplicada

Los genes se pueden alterar artificialmente para cambiar algunos rasgos hereditarios de los animales. La modificación del genoma, ya sea por la introducción, inactivación, retiro o reemplazo de genes en un animal, brinda posibilidades sin precedente tanto a nivel de investigación, como de producción. Así, las universidades e institutos de investigación están siendo requeridos por la industria farmacéutica para proporcionarles animales destinados a realizar estudios clínicos, fabricar proteínas recombinantes e intentar modificar órganos de animales (principalmente cerdos), destinados para transplantes o injertos en humanos; aunque hoy en día ya existen equipos de investigación dentro de las propias compañías para desarrollar por su cuenta animales transgénicos.

Dentro de los animales transgénicos que se han generado con el propósito de una aplicación destacan las vacas (mejores productoras de leche), las ovejas (mejores productoras de lana) y los peces (crecen más grandes o puedan sobrevivir en temperaturas más frías de lo normal). En la actualidad, la investigación en transgénesis aplicada a la producción animal está siendo abordada en tres temas principales:

a) Modificación de la utilidad de la leche mediante de la incorporación de proteínas foráneas

La producción de proteínas de interés farmacéutico a partir de individuos transgénicos, es una alternativa tremendamente interesante para esta industria, ya que se requieren sólo unos pocos animales para tales efectos y el costo de producción se estima en alrededor de cincuenta veces menor que los métodos clásicos de producción de tales compuestos (52). Cerca de 50 proteínas heterólogas para uso humano, tales como caseína, lactoalbúmina y proteínas que participan en la coagulación san-

guínea, entre otras, se han producido a partir de la leche de conejas (53), cerdas (54) y cabras transgénicas (55). Sin embargo, aún no han sido comercializadas porque no son completamente funcionales y se espera que el perfeccionamiento de las técnicas de transgénesis aplicadas a distintas especies, permitan que esta estrategia de producción sea pronto una realidad en la industria farmacéutica (56) (tabla V.2).

TABLA V.2 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN LA LECHE DE MAMÍFEROS TRANSGÉNICOS EN DIFERENTES ESPECIES

	Animales transgénicos producidos				
Especie	*% descendencia*	*% embriones inyectados y transferidos*	*Meses para obtener la F2*	*Costo en dólares estimado de cada animal transgénico*	*Proteína producida en la leche (por lactación)*
Ratón	17.3	2.6	7.5	$121	1g
Conejo	12.8	1.5	17		1Kg
Porcino	9.2	0.9	38	$25 000	200Kg
Ovino	8.3	0.9	52	$60 000	100Kg
Bovino	3.6	0.7	100	$546 000	1000Kg

Fuente:http://www.prodiversitas.bioetica.org/des 1.8 htm

b) Mejoramiento de respuesta inmunitaria a ciertas enfermedades

El control de enfermedades en producción animal se ha realizado tradicionalmente mediante erradicación, vacunación y selección genética. El uso de algunas técnicas de ingeniería genética aplicada, tales como la vacunación directa con DNA desnudo, parecen ser alternativas interesantes para este propósito (57).

Mejoramiento de ciertas funciones biológicas importantes, como la reproducción y el desarrollo

El conocimiento de la ubicación precisa de un gene y de sus efectos fisiológicos, permitiría aislarlo y transferirlo a otros animales de la misma u otra especie para mejorar su respuesta productiva. Casos en esta situa-

ción se encuentran en salmones, donde por ejemplo se aisló y transfirió a huevos fertilizados el gene responsable de la síntesis de la hormona del crecimiento, lográndose individuos transgénicos que en promedio crecieron de 20 a 30 % más que los individuos normales (58).

Los modelos en ratón son los más abundantes debido a su fácil manejo y sus bajos costos. Un buen ejemplo de su utilidad se refiere al logro de un equipo de especialistas de la Universidad de Rochester quienes han creado un tipo de animal manipulado genéticamente que muestra síntomas similares a los de los pacientes humanos con distrofia muscular miotónica, que es la forma más común de distrofia muscular en las personas adultas. La distrofia miotónica se caracteriza por una debilidad muscular progresiva. A menudo, los pacientes la notan cuando los músculos de sus manos se entumecen o cuando les cuesta trabajo soltar la mano después de un simple apretón de manos. Gradualmente, los músculos se debilitan y se desgastan y muchos pacientes llegan a tener dificultades para caminar, para tragar alimentos y hasta para respirar. La enfermedad afecta también a los ojos, el corazón y el cerebro. En la actualidad no hay tratamiento alguno para la distrofia miotónica y los médicos aún no entienden los mecanismos de cómo se produce (59).

El ratón es el primer modelo animal de esta enfermedad y ha permitido estudiar un mensajero molecular (RNAm), del que hasta ahora no se sospechaba que pudiera intervenir en la enfermedad, al considerarse un simple portador de información. Los autores de los experimentos informan que sin un modelo animal apropiado, la búsqueda del tratamiento adecuado para esta enfermedad podría llevar años. La generación de los nuevos ratones transgénicos acelerará el proceso del desarrollo para el tratamiento (60, 61).

Figura V.4

NACIMIENTO DE RATONES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

A pesar de los avances en múltiples especies, los mejores resultados obtenidos se han logrado con animales de laboratorio (ratones principalmente). Aquí se muestra unos ejemplares transgénicos para el gene de la proteína verde fluorescente.

Otra área en desarrollo de la transgénesis murina que interesa a la industria farmacéutica, es la relacionada con la evaluación de los productos químicos que se encuentran en nuestro medio ambiente y de aquellos que se utilizan como fármacos para tratar enfermedades. Actualmente estos productos se prueban en animales para saber si ocasionan efectos secundarios dañinos, lo que se conoce como prueba de toxicidad o de seguridad. Incluso se están generando animales transgénicos que llevan genes que los hacen más sensibles a dichas sustancias. Esto permitirá que los resultados se obtengan de manera más precisa, rápida y utilizando pocos animales (62).

Ejemplos de transgénesis con fines comerciales

Porcinos

Ya se han producido cerdos transgénicos para genes humanos relacionados en el sistema de histocompatibilidad, con la finalidad de proporcionar órganos para los pacientes que requieren un transplante (63).

Bajo circunstancias normales, un trasplante del órgano de un animal sería rechazado por el sistema inmune de un paciente, pues las células del órgano animal se detectan como extrañas y son destruidas. Sin embargo, insertando genes que sinteticen glicoproteínas idénticas a las humanas y que sean dirigidas hacia la superficie de las células animales, se espera que el órgano en cuestión sea reconocido como propio por el sistema inmune del paciente y que no sea atacado por las células que protegen al cuerpo. Estos cerdos pudieran ser la respuesta a la escasez actual de órganos disponibles para transplantes (figura V.5).

Aunque se han hecho múltiples intentos de transplantar órganos de monos (64), la diferencia de tamaños de los órganos entre las especies resultó un serio inconveniente (tabla V.3). Por eso se pensó en el cerdo como posible donante.

Hay que ser todavía muy cautos en relación con las expectativas creadas en torno a la utilización de cerdos transgénicos como reservorio de órganos para posibles trasplantes (xenotrasplantes) de corazón, riñón o hígado a pacientes humanos. El primer paso que se ha dado ha consistido en la obtención de cerdos transgénicos capaces de expresar el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) humano, eludiendo así el rechazo hiperagudo. No obstante, quedan por resolverse aún numerosas

Figura V.5
CERDO TRANSGÉNICO CON ÓRGANOS TRANSPLANTABLES
La creación y el diseño de modelos transgénicos porcinos alterados en los genes involucrados en la histocompatibilidad, está demostrando ser una alternativa viable para la generación de órganos "humanizados" para transplantes.

interrogantes, destacando la posibilidad de que se transmitan al hombre infecciones virales de origen animal, no descritas previamente (65, 66).

Ovinos

Los pacientes con enfisema pulmonar hereditario necesitan de grandes dosis de la enzima α-1-antitripsina para suplir su deficiencia en el plasma. Por esta necesidad, se han obtenido, por diversos procedimientos, ovejas transgénicas portadoras del gene humano que codifica para esta enzima, unida al promotor del gene de la β-lactoglobulina, a fin de que el transgene se exprese exclusivamente en las células de la glándula mamaria (67, 68).

TABLA V.3
TRANSPLANTE DE ÓRGANOS DE ANIMALES A HUMANOS

Donante	*Órgano*	*Sobrevivencia*	*Número de transplantes*	*Autor*	*Año*
Chimpancé	Riñon	Un paciente nueve meses	12	Reemtsma	1964
Mono mico	Riñón	10 días	1	Reemtsma	1964
Mandril	Riñon	4 días y medio	1	Hitchcok	1964
Mandril	Riñon	Un paciente dos meses	6	Starzl	1964
Chimpancé	Corazón	Extirpado	1	Ardí	1964
Chimpancé	Hígado	Un paciente 14 días	3	Starzl	1969-74
Mono	Corazón	fracasó (sin datos)	1	Yacoub	1975
Mandril	Corazón	Rechazo agudo	1	BaARNrd	1977
Chimpancé	Corazón	4 días	1	BaARNrd	1977
Mandril	Corazón	3 semanas	1	Bailey	1985
Mandril	Hígado	70 días	1	Starzl	1992
Cerdo	Hígado	34 horas	1	Nakowka	1992
Mandril	Hígado	26 días	1	Starzl	1993
Mandril	Médula ósea	El paciente vive, pero el transplante fracasó	1	Deeks e Ildstat	1995 1995

Así, el grupo escocés que dirige Ian Wilmut microinyectó más de 500 cigotos con el DNA de dicho gene híbrido obteniendo un centenar de crías, de las que cinco (un macho y cuatro hembras) fueron transgénicas. Las ovejas en al lactancia produjeron cantidades reducidas

(1 mg/ml) de la enzima humana en la leche. Sin embargo, una de ellas que presentaba un mayor número de copias del transgén integrados en su genoma, llegó a producir cantidades elevadas (63 mg/ml) durante la primera semana, para posteriormente estabilizarse en 35 mg/ml.

También se han obtenido ovejas transgénicas portadoras del gene humano que codifica para el factor IX de coagulación de la sangre (antihemofílico), primero mediante la técnica de microinyección en el pronúcleo del cigoto del correspondiente gene humano (DNAc), unido también a un promotor génico de origen ovino, y más tarde mediante el uso de la técnica de clonación por transferencia de núcleos de fibroblastos fetales genéticamente modificados para portar y expresar el citado transgene (69).

Caprinos

Las cabras también pueden constituirse en buenos biorreactores de proteínas humanas, puesto que producen cuatro litros de leche por día y sus periodos de gestación y de desarrollo son cortos (cinco y ocho meses, respectivamente).

Se han generado cabras transgénicas portadoras del gene humano que codifica para el activador tisular del plasminógeno (AtPH), el cual se le reemplazó su promotor génico por el del gene de la β-caseína de la cabra. Transgenes de este animal produjeron esta proteína (3 mg/ml) en la leche. La proteína pudo ser aislada con una gran pureza y una alta actividad específica (70).

Bovinos

En 1991, tres grupos de investigación de Holanda obtuvieron vacas transgénicas portadoras del gene humano de la lactoferrina, que es sintetizada en la leche del animal. En este caso el promotor génico empleado para dirigir la expresión del transgene en la glándula mamaria, fue el del gene que codifica para la α-S1-caseína bovina.

Para lograrlo, inyectaron cerca de 1 200 pronúcleos de otros tantos cigotos obtenidos por fecundación *in vitro*, de los cuales sobrevivieron cerca de 1 000. A la semana, transfirieron más de un centenar de embriones a vacas estimuladas hormonalmente (sincronizadas), quedando 21 de ellas preñadas y sólo 16 llevaron a término la gestación. Se obtuvo un macho y una hembra transgénicos. El macho dio positivo para la pre-

sencia del gene humano en todos los tejidos analizados (placenta, oreja y sangre), estimándose que era portador de varias copias (5 a 10) del gene humano (71).

La gran producción lechera de las vacas (10 000 litros/año, 35 g proteína/litro de leche) las convierte en poderosos biorreactores para la producción de proteínas humanas (72). De igual manera la cantidad de queso que se obtiene de la leche es proporcional al contenido de caseína. Se podría sobre-expresar el gene de la caseína para aumentar la cantidad de queso por animal modificado genéticamente (73).

También actualmente se puede lograr la expresión del gene que codifica para la lactasa, para tener leche libre de lactosa para las personas que tiene intolerancia a ésta. La lactasa descompone a la lactosa de tal modo que es posible que ésta pueda ser absorbida (74).

Aves transgénicas

Los pollos transgénicos pueden usarse para mejorar las líneas existentes frente a resistencia a virus, bacterias, mayor eficiencia de la nutrición, bajo contenido graso y en colesterol en los huevos, así como mejor calidad de la carne (75). También podría usarse el huevo como un biorreactor. Por ejemplo se ha propuesto usar la región de control del gene de la ovalbúmina para sobreexpresar la lisozima que es un antibiótico natural presente en la clara de huevo. La función de ésta es evitar la contaminación con microorganismos microbianos en los huevos en procesos de incubación y también como un preservativo de comestibles en las industrias alimentarias (76).

Una empresa biotecnológica estadounidense ha conseguido gallinas transgénicas capaces de poner huevos que sintetizan anticuerpos humanos, constituyéndose en un importante logro científico que permitirá producir de manera mucho más barata fármacos hasta ahora caros y de difícil producción (77).

A la fecha, son dos las compañías que se han dedicado a la producción y explotación de proteínas humanas en aves: Gene Works, y AviGenics. Ambas empresas tratan de convertir los oviductos de las aves en biorreactores y afirman que ya han logrado producir proteínas humanas de interés biomédico en los huevos de gallinas manipuladas genéticamente, por lo que también hacen mención de varios centenares de gallinas genéticamente modificadas y un número indeterminado de estas aves de corral especiales ponen huevos con concentraciones variables de un factor de crecimiento humano.

Para lograr estas gallinas transgénicas, los investigadores microinyectan genes humanos en el blastodermo de embriones con sólo un día de desarrollo, utilizando como vehículo de transferencia un virus desactivado (78). El objetivo es lograr que los genes humanos insertados alcancen las células primordiales del blastodermo, que posteriormente se convertirán en células espermáticas y ovocitos. De esta forma se garantizaría que la manipulación de las gallinas sea heredada a su descendencia. También aseguran que han producido en gallinas transgénicas el interferón humano, utilizado en el tratamiento del cáncer. Sus aves de corral manipuladas ofrecen una media de 200 huevos al año, cada uno con una alta concentración (100 miligramos) de este fármaco.

La inoculación con vectores retrovirales deficientes en replicación dio origen a pollos (79). Aunque algunas de estas aves transgénicas no produjeron virus, el uso de retrovirus para incorporar genes en un producto de consumo como alimento humano genera preguntas acerca de riesgo de contaminación, reales o imaginarios. Además, el tamaño del transgene está limitado a no más de 8000 pares de nucleótidos y la integración puede no ser permanente. Se deben buscar métodos alternativos (80).

No hay aún descritas CE en aves. Sin embargo, las células del blastodermo se pueden remover y luego transfectar con DNA con la ayuda de lípidos catiónicos, para luego ser reintroducidas en el espacio subgerminal del embrión de huevos recién puestos. En este caso, algunas progenies serán mezclas de células (quimeras). Algunas de las células transfectadas pueden llegar a ser parte de las células germinales. Luego se pueden obtener líneas transgénicas estables a partir de estas quimeras por ciclos de apareamientos. La proporción de células donantes se puede aumentar si las células receptoras se irradian previo a la transfección. Al destruirse las células del blastodermo es mayor el aporte celular de las células transfectadas para formar la masa del embrión (81).

Peces

Durante los últimos años un buen número de estudios han conducido a la generación de líneas de peces transgénicos (82). En éstas, la expresión de un gene reportero fue conducida por una variedad de promotores génicos (83). Estas líneas abrieron las verdaderas posibilidades de que el transgénico se pudiera utilizar para complementar el análisis genético del desarrollo del modelo a estudiar (84).

Tres líneas transgénicas de tilapia (*Oreochromis niloticus*) fueron generadas con una construcción que contenía como reportero el gene que codifica para la β-galactosidasa (*lac*Z), empalmado con una región promotora del gene β-actina de la carpa. Estas tres líneas contienen distintos números de genes incorporados, donde los niveles de expresión del gene *lac*Z se relacionan con el número de copias del transgene.

En estas tres líneas fueron observados patrones diferentes de expresión somática de *lac*Z. También se observó que la expresión del gene reportero en peces transgénicos homocigotos era mayor que la de los transgénicos heterocigotos (aproximadamente del doble). El análisis de la expresión del gene reportero *lac*Z demostró que ésta ocurre con intensidad variable en diversos órganos (85).

La tecnología desarrollada para usar peces transgénicos como modelos del laboratorio para investigar la biología del desarrollo, se está aplicando actualmente para acelerar el crecimiento de los animales en granjas acuícolas y mejorar su resistencia a las enfermedades. Gran variedad de modelos transgénicos de peces se pueden encontrar en laboratorios alrededor del mundo. La tecnología actual tiene limitaciones que afectan qué tipos de transgénicos pueden ser desarrollados. Ésta se ha limitado a construcciones cortas de genes que se insertan aleatoriamente en números variables de copias en los cromosomas de los especímenes. Esto genera una dificultad adicional para estabilizar las modificaciones genéticas en una población determinada. Sin embargo, la microinyección sigue siendo la alternativa más socorrida hasta para estas especies con pocas expectativas de manipulación. La sobrevivencia después de la microinyección es alta (35-80%) y la producción de peces transgénicos va de 10 a 70% (86). El transgene se puede detectar utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa PCR (87).

Muchos de los estudios iniciales de transgénesis en peces han sido para ver el impacto de la hormona del crecimiento sobre la velocidad de crecimiento del pez. En un estudio se introdujo el DNAc de esta hormona bajo el control del promotor del gene de la proteína "anti-freeze" del pez llamado "ocean pont" y también su señal de poliadenilación. Esta construcción se inyectó en salmón atlántico y se comprobó que efectivamente los salmones crecieron más rápido. El sistema de expresión en este caso fue escogido para aumentar la transcripción de dicha hormona en aguas frías, siendo una construcción apta para todo pez, evitando incompatibilidades biológicas por el uso de un gene de la hormona deri-

vado de una especie "no-piscícola". El comportamiento fisiológico de estos salmones transgénicos será de gran interés en el futuro (88, 89) (figura V.6).

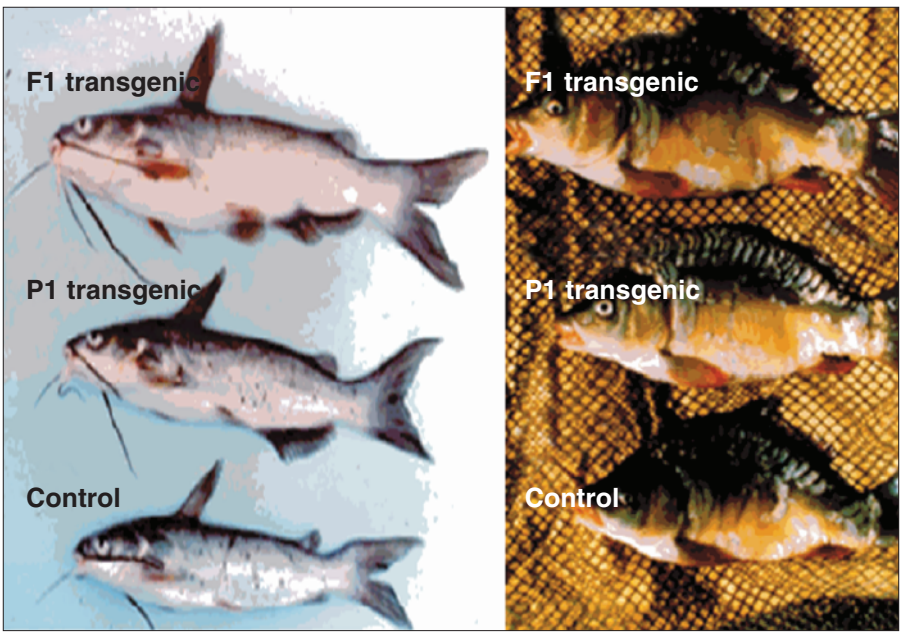


Figura V.6.

PECES TRANSGÉNICOS

Se ilustran bagres y carpas transgénicas por el gene de la hormona del crecimiento.

Industria biotecnológica de animales transgénicos

La tecnología para crear animales transgénicos está mejorando constantemente y pronto comenzará la reducción de sus actuales limitaciones. A su vez, la potencialidad de los animales transgénicos para su uso biotecnológico estriba en producir grandes cantidades de sustancias de las que nunca se había dispuesto con anterioridad, productos que se obtenían en diminutas cantidades, abaratamiento de los costos de producción, mayor seguridad en los productos obtenidos, y mejora de caracteres de resistencia a enfermedades.

La biotecnología ha aplicado estas técnicas experimentales de transgénesis y ya se están estableciendo las primeras granjas farmacéuticas en

las que se crían ovejas, cabras, vacas o cerdas transgénicas que producen en su leche proteínas terapéuticas humanas (90).

Las cifras económicas demuestran la importancia futura de las granjas farmacéuticas: el mercado de proteínas terapéuticas, que actualmente se obtienen principalmente mediante fermentación o cultivo de microorganismos o de células de mamíferos, sometidas a modificaciones genéticas, se estima en unos 7 600 millones de dólares anuales y se calcula que podrá llegar a ser de 18 500 millones de dólares al año (91).

Clonación animal

Klon es una palabra de origen griego que significa retoño, rama o brote. En el lenguaje científico, es el conjunto de individuos que desciende de otro por vía vegetativa o asexual. El clon no es algo nuevo ya que el fenómeno de la clonación existe en la naturaleza, paralelamente a la reproducción por la vía sexual. En el origen de la evolución, la reproducción de los seres vivos se llevaba a cabo asexualmente, de modo que los descendientes de los seres microscópicos con los que se inicia la vida, eran idénticos a sus padres. Biológicamente, pues, nuestros orígenes fueron clones.

La clonación de seres vivos ha sido responsable de un avance del conocimiento científico extraordinario que permitirá conocer con mayor precisión los mecanismos que determinan el desarrollo y la diferenciación de los seres vivos, en particular de los animales superiores. Asimismo, sustentará un avance en otras ramas de la ciencia, como la farmacología, genética y oncología, entre otras.

El principio de la clonación está fundamentado en la obtención de organismos idénticos genéticamente y por lo tanto morfológica y fisiológicamente muy similares, como en el caso de dos gemelos univitelinos. Esto ha sido el sueño de muchos ganaderos, que han deseado que todo su ganado las cualidades de algún ejemplar especial.

Métodos de clonación

En la actualidad los métodos de clonación son menos problemáticos gracias a la evolución que han tenido las técnicas de biología molecular

y celular. Los métodos de clonación han sido cuestionados por numerosas organizaciones utilizando un sinfín de argumentos, enarbolando consideraciones bioéticas. Lo cierto es que estos métodos como cualquier otro, facilitan y limpian el camino para el entendimiento de la diferenciación celular y para mejoramiento de las especies, a través de la explotación de las características de cada especie y a la rediferenciación del genoma. A continuación se mencionan los principales enfoques metodológicos de la clonación animal (92).

Disgregación celular

Se basa en el mismo principio por el que nacen gemelos de forma natural. Se pueden separar las células de un embrión en las primeras etapas del desarrollo, desde cuando lo integran únicamente dos células hasta el estado de mórula. Cada célula separada por ser una célula totalmente indiferenciada, puede trabajar como un cigoto, lo que le permite desarrollarse para dar lugar a un individuo completo (93).

Transferencia nuclear

En esta metodología se toman células embrionarias en fase de mórula o blástula obtenidas por disgregación, se cultivan *in vitro* y después se trasladan a ovocitos a los que se les ha quitado el núcleo. Se provoca la disolución de las dos células animales de modo que el núcleo de la célula embrionaria quede en el interior del ovocito, pudiendo éste funcionar como un cigoto (94).

Primeros ejemplos de clonación de animales

Los primeros informes de clonación fueron en anfibios, siendo una rana el primer animal clonado en el mundo, experimento realizado en 1952 por investigadores de la Universidad de Pennsylvania, y que por cierto al avanzar el clon sólo hasta la etapa de renacuajo, se estableció como dogma la imposibilidad de clonar animales adultos. Luego se lograron clonar mamíferos superiores como ratones, conejos, ovejas, vacas y otras especies domésticas. Sin embargo, en todos estos últimos

casos no se partió de células provenientes de organismos adultos, sino de células embrionarias. Megan y Morag fueron las primeras ovejas clonadas por medio de esta técnica en 1995 (95) y tiempo después se logró clonar el primer búfalo por el mismo método (96, 97).

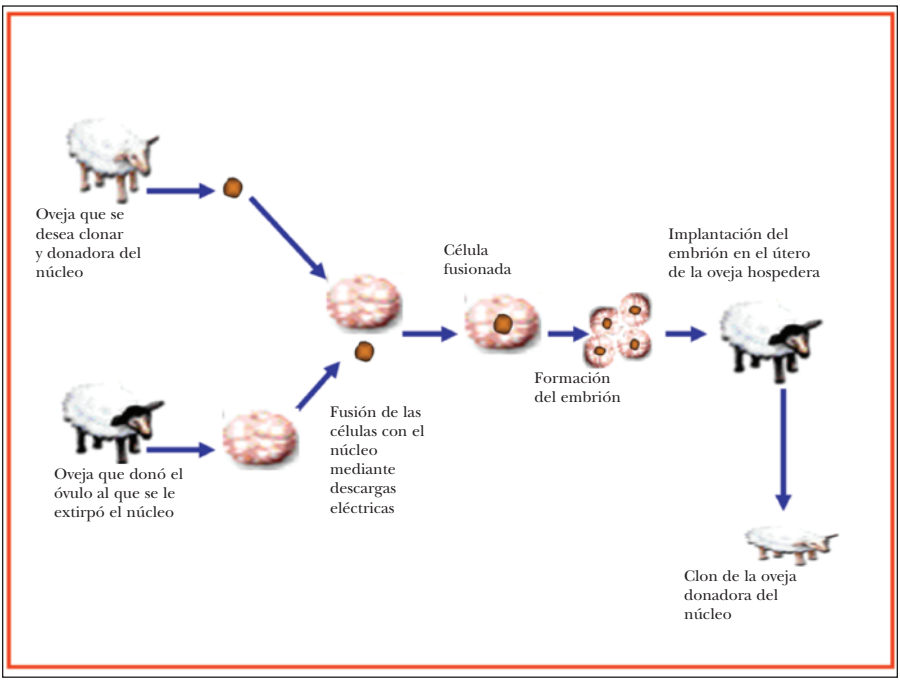


Figura V.7

TÉCNICA DE CLONACIÓN DE ANIMALES

Para generar a Dolly, participaron tres ovejas, una donó el material genético (núcleo celular), otra el entorno celular (célula sin su propio núcleo) y la última gestó al embrión clonado.

El dogma arriba citado fue superado en el año de 1997, cuando investigadores del Instituto Roslin de Escocia anunciaron la clonación de una oveja adulta a partir de una de sus células de la glándula mamaria (98, 99). Al producto de este exitoso experimento se le bautizó con el nombre de Dolly. Cuatro meses después estos mismos investigadores originaron a Polly (100) (figuras V.7 y V.8). De cualquier manera, es relevante señalar que las eficiencias de clonación de mamíferos a partir de núcleos de células diferenciadas, son extremadamente bajas y que hay mucho que avanzar para comprender las razones por las cuales se da este caso.

Figura V.8

LA PRIMERA GENERACIÓN DE MAMÍFEROS CLONADOS

La oveja Dolly (a la izquierda del panel izquierdo) fue el primer animal clonado y Polly (a la izquierda del panel de la derecha) el primer trangénico en serlo.

A estos resultados del Instituto Roslin le siguieron una cascada de reportes de animales clonados por la técnica utilizada con Dolly. Por ejemplo, investigadores en EUA anunciaron la clonación de ratones utilizando células somáticas de roedores adultos y un mes más tarde, científicos japoneses de la Universidad de Kinki reportaron la clonación de cerdos (101).

Así fue también el caso de la primera ternera llamada Pampa obtenida por clonación que logró sobrevivir al parto con aparente buena salud. De igual manera nacieron las primeras vacas clonadas transgénicas, que son copia de Pampa pero poseen el gene de la hormona de crecimiento humano, con el propósito de que las vacas produzcan durante la lactación entre 15 y 16 litros de leche diarios, conteniendo esta proteína en el fluido mencionado. Después de un proceso de purificación, este nuevo componente de la leche podría ser destinado a la elaboración de medicamentos para el tratamiento del enanismo hipofisario y otras patologías relacionadas (102).

Los resultados sobre los experimentos de clonación de mamíferos tienen un enorme interés biológico, por lo que respecta al conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que intervienen en la formación y en la diferenciación de estos organismos. Cada vez son más los animales que han sido clonados para diferentes intereses y con distintas técnicas; sin embargo, no en todas las áreas se avanza con la misma rapidez, pues en el Centro de Primates de Oregón (EUA) se hizo público recientemente, que un alto porcentaje de embriones de macacos habían sido sometidos a clonación sin resultados satisfactorios e incluso nacieron

varios con malformaciones. No cabe duda de que los monos se resisten a ser clonados porque al cabo de 135 intentos infructuosos, los científicos de este Centro para la Investigación con Primates comienzan a pensar que clonar simios será mucho más difícil que clonar ovejas, ratones u otras especies menos evolucionadas, y ni qué decir de la clonación de humanos, a pesar de los anuncios sensacionalistas de finales del año 2002.

Dichos resultados llevan a la conclusión inicial de que las técnicas hasta hoy utilizadas en la clonación no han funcionado en animales más evolucionados, como los monos. El Centro antes mencionado publica estadísticas con respecto a la suerte de los embriones sometidos a los procesos de clonación, destacando que el porcentaje de fusión entre la célula y el núcleo donante es de un 75%, pero que al pasar al proceso de implantación en las madres sustitutas termina el éxito del experimento, siendo los embriones clonados abortados al poco tiempo de la implantación.

De poderse llevar a cabo la clonación de monos, éstos serían candidatos idóneos para poder experimentar por ejemplo con la ansiada vacuna contra el sida, entre otras. Los monos también se resisten a la transgénesis. Tal es el caso de ANDi que ahora es el único fruto de 224 intentos para lograr el primer primate modificado genéticamente, lo que da una idea de lo difícil que ha sido crearlo (103). El gene extra que tiene ANDi se utiliza como marcador (el gene que codifica para la proteína verde fluorescente); sin embargo resultó que en este caso no genera la fluorescencia esperada aunque se ha demostrado que efectivamente es transgénico para este gene (figura V.9).

No se sabe por qué ANDi no expresa el gene de forma observable, y se piensa que quizás lo haga cuando crezca, aunque también es posible que esté ya produciendo la proteína correspondiente pero en muy poca cantidad.

Los monos son mucho más parecidos a los humanos que cualquier otro animal de laboratorio y tienen ciclos hormonales mensuales pudiendo sufrir de cáncer de mama como las mujeres. Es por eso que un número limitado de monos modificados podrían ayudar a avanzar en la lucha contra el cáncer. Sin embargo, la introducción de genes humanos en especies tan próximas genéticamente como son los monos, puede también plantear reparos éticos. En teoría, las modificaciones genéticas se transmitirán a los descendientes, es decir, se actúa sobre la línea germinal, algo que ha estado siempre vedado en los experimentos de terapia genética en humanos.

Figura V.9

"ANDi"

El primer mono transgénico creado en el mundo, a cuya línea germinal se le introdujo el gene de la proteína verde fluorescente.

Aplicaciones de la clonación

Amplias son las aplicaciones en que se vislumbra la utilización de la clonación, y a continuación se señalan algunas de las áreas de impacto.

- *Producción pecuaria.* La clonación permitirá obtener copias de animales de alto valor productivo y con mejores condiciones zootécnicas, tales como mayor producción de leche, mejor calidad de carne, mayor velocidad de crecimiento, etcétera.
- *Sanidad animal.* Se podrán copiar aquellos especímenes que demuestren mayor resistencia a ciertas enfermedades del ganado.
- *Resguardo y salvaguarda de especies animales en peligro de extinción.* Por ejemplo, el Instituto de Investigación de Ganado de Taiwán clonó en 1991 cinco cerdos de una especie en extinción. A partir de esta experiencia se espera que la preservación de variedades únicas por medio de la clonación permitirá hacer frente a problemas de la extinción de especies por diferentes motivos, como el calentamiento global, la contaminación y las nuevas enfermedades.

- *Biofarmacología.* Combinando la clonación con la modificación genética de animales se puede evitar el arduo trabajo que representa volver a generar un organismo genéticamente modificado o transgénico. Hay que tener en cuenta que, por ejemplo, una sola vaca lechera clonada y transgénica puede producir cada año unos 80 kilogramos de albúmina humana, una proteína muy importante de la sangre cuya demanda anual es de más de 600 toneladas destinadas al tratamiento de quemados y diversos traumatismos.
- *Nutrición.* La leche de la vaca es excelente para el ternero pero no necesariamente para los bebés humanos. En este sentido, podrían reemplazarse ciertas proteínas de la leche vacuna por otras propias de los humanos para aumentar su valor nutritivo o evitar reacciones alérgicas. La clonación de estas vacas transgénicas potenciaría sus ventajas.
- *Xenotransplantes.* La clonación de animales transgénicos permitirá obtener de ellos órganos como corazón, riñones e hígado que puedan transplantarse a los humanos. En la actualidad se está trabajando con cerdos a los cuales se les adiciona en su información genética proteínas humanas para engañar al sistema inmune de las personas y que no reconozca como cuerpos extraños a los órganos transplantados de los porcinos. Se estima que el mercado de este tipo de transplantes moverá alrededor de seis mil millones de dólares. Además de la obtención de órganos, podrán usarse animales clonados y transgénicos como fuente de células que serán de utilidad en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas humanas, como el mal de Parkinson o Alzheimer y otras patologías como la artritis o la diabetes.

De todas formas, la idea de usar animales transgénicos clonados para cualquiera de sus aplicaciones ligadas a seres humanos, está en el centro de una gran polémica debido a riesgos potenciales. Por el momento no existen evidencias científicas de esto, pero tampoco nadie se anima a asegurar qué pueda suceder en el futuro con estos órganos de animales "humanizados", aunque las ventajas virtuales son obvias. Ciertamente, el mayor riesgo se encuentra en el área de xenotransplantes, pues el riesgo de contagio y aparición de enfermedades hasta ahora desconocidas es alto.

El desarrollo de las técnicas de clonación aparentemente ha arrojado por la borda uno de los principales dogmas de la biología reproductiva por el cual se afirmaba que el crecimiento celular sólo podía darse en sentido unidireccional en la naturaleza. Luego que se fusionan el óvulo y el espermatozoide para dar lugar al cigoto, las células de éste comienzan a dividirse en dos, cuatro, ocho, y así sucesivamente hasta formar una esfera similar a una pelota de futbol con muchos gajos, llamada mórula. Cada una de esas células embrionarias posee la capacidad de transformarse, o diferenciarse, en cualquiera de los tipos celulares que integran los tejidos del futuro ser vivo. O sea que a partir de esas células se forman las células musculares, nerviosas, epiteliales y el resto de las que integran el organismo.

La capacidad que tiene una célula embrionaria para diferenciarse en otras más especializadas se conoce como totipotencialidad. Esto quiere decir que sólo unas cuantas de estas células almacenan toda la información suficiente para crear un nuevo ser. Durante muchos años se pensó que una vez que las células totipotenciales se diferenciaban en una línea celular con una función más específica, por ejemplo una célula muscular, ya no podían dar marcha atrás o frenar la diferenciación.

La clonación de seres vivos lograda en el laboratorio a partir de células de animales diferenciados, aparentemente cambió esta consideración. Ahora es posible lograr que una célula adulta se reprograme, es decir se desdiferencie, y vuelva a comenzar con el proceso de división celular que conducirá a un nuevo individuo con características genéticas idénticas a su madre, es decir un clon.

Sin embargo y para concluir señalando que aún falta mucho que conocer, vale la pena insistir en lo siguiente. Ciertamente, de la experiencia acumulada durante el desarrollo de las técnicas de clonación y de los productos de estas tecnologías, es posible señalar que estos métodos siguen siendo poco eficientes para generar animales clonados, sobre todo si los núcleos que se utilizan para producir los nuevos animales provienen de células diferenciadas, como el caso de Dolly. Además, el hecho de que no se hayan podido obtener primates clonados, después de muchísimos intentos, también indica que la posibilidad de clonar animales con sistemas nerviosos más diferenciados como los primates, hacen menos factible este propósito. Asimismo es importante señalar la necesidad de llevar a cabo un conjunto de análisis más detallados y cui-

dadosos a nivel celular y nuclear, para conocer qué tan normales son los animales producidos por las técnicas de clonación.

Finalmente, la baja eficiencia en la producción de animales clonados, debida a la muerte prematura de muchos de los productos, señala que puede haber anormalidades durante los procesos de diferenciación, en diferentes etapas del desarrollo del animal, resultado de estas tecnologías. Estas anormalidades pueden ser, a su vez, el resultado de problemas técnicos relacionados con la manipulación (y posible daño) de los núcleos, pero también con problemas existentes a nivel biológico, en el sentido de que una célula diferenciada tiene que reprogramarse genética y epigénitamente para poder dar lugar a un proceso de diferenciación que permita la formación de un animal normal. Hay, pues, todavía mucho que investigar.

Bibliografía

1. Gordon J.W., Ruddle F.H. Germ line transmission in transgenic mice. *Prog. Clin. Biol. Res.,* 85 Pt B:111-24 (1982).
2. Barrera-Saldaña, H.A. *Información genética: estructura, función y manipulación.* Conacyt Colección Ciencia Básica. México (1992).
3. Pursel V.G., Rexroad C.E. Jr, Bolt D.J., Miller K.F., Wall R.J., Hammer R.E., Pinkert C.A., Palmiter R.D., Brinster R.L. Progress on gene transfer in farm animals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 17(1-4):303-12 (1987).
4. Miller K.F., Bolt D.J., Pursel V.G., Hammer R.E., Pinkert C.A., Palmiter R.D., Brinster R.L. Expression of human or bovine growth hormone gene with a mouse metallothionein-1 promoter in transgenic swine alters the secretion of porcine growth hormone y insulin-like growth factor-I. *J. Endocrinol.,* 120(3):481-8 (1989).
5. Fiane A.E., Geiran O.R., Soreide O., Thorsby E., Aasen A.O. Transplantation of animal organs (xenotransplantation). Status y future development. *Tidsskr Nor Laegeforen* 117(8):1071-6 (1989).
6. Kola, J., Hertzog P.J. Down and mouse models. *Current Opinion In Genetics and Development* 8: 31-321 (1998).
7. Rosol T.J., Tannehill-Gregg S.H., LeRoy B.E., Mandl S., Contag C.H. Animal models of bone metastasis. *Cancer;* 97(3 Suppl):748-57 (2003).
8. Jeffery G., Brem G., Montoliu L. Correction of retinal abnormalities found in albinism by introduction of a functional tyrosinase gene in transgenic mice and rabbits. *Brain Res. Dev.* 99(1):95-102 (1997).

9. Itakura, K., T. Hirose, R. Crea, A.D. Riggs, H.L. Heyneker, F. Bolívar H.W. Boyer. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin, *Science* 198: 1056-1063 (1977).
10. Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A., Ruddle, F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 77:7380-7384 (1980).
11. Gordon, J.W., Ruddle, F.H. Integration and stable germ line transmissions of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214:1244-1246 (1981).
12. Costantini F., Lacy E. Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature* 294(5836):92-4, (1981).
13. Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E., Trumbauer M.E., Rosenfeld M.G., Birnberg N.C., Evans R. M. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 16: 300(5893):611-5 (1982).
14. http://www.frame.org.uk/Transgenics.htm.
15. Kearns M., Morris C., Whitelaw E. Spontaneous germline amplification and translocation of a transgene array. *Mutat Res.* 12; 486(2):125-36, (2001).
16. http : //www.cnb.uam.es/~montoliu/resintesp.html
17. Muller W.J., Sinn E., Pattengale P.K., Wallace R., Leder P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* 54(1):105-15, (1988).
18. Cornish K.V. European patent oppositions and biotechnology. *Nat. Biotechnol.* 18(8):899-900 (2000).
19. Behringer R.R., Mathews L.S., Palmiter R.D., Brinster R.L. Dwarf mice produced by genetic ablation of growth hormone-expressing cells. *Genes and Dev.* 2(4):453-61 (1988).
20. Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E. Jr., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D., Brinster R.L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 315(6021): 680-3 (1985).
21. Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 77(12):7380-4 (1980).
22. Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., van der Schans A., van den Broek S., Kooiman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper F., Strijker R. Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. *Biotechnology* 9(9):844-7, (1991).
23. Hoshi H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59(2):675-85 (2003).
24. Palmiter R.D., Norstedt G., Gelinas R.E., Hammer R.E., Brinster R.L. Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science* 222 (4625): 809-14, (1983).

25. Rexroad C.E. Jr., Hammer R.E., Behringer R.R., Palmiter R.D., Brinster R.L. Insertion, expression and physiology of growth-regulating genes in ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 41:119-24 (1990).
26. Murray J.D., Nancarrow C.D., Marshall J.T., Hazelton I.G., Ward K.A. Production of transgenic merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion genes. *Reprod. Fertil. Dev.* 1(2):147-55 (1989).
27. Wang B., Baldassarre H., Tao T., Gauthier M., Neveu N., Zhou JF., Leduc M., Duguay F., Bilodeau A.S., Lazaris A., Keefer C., Karatzas C.N. Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of in vitro derived zygotes. *Mol. Reprod. Dev.* 63(4):437-43 (2002).
28. Uchida M., Shimatsu Y., Onoe K., Matsuyama N., Niki R., Ikeda J.E., Imai H. Production of transgenic miniature pigs by pronuclear microinjection. *Transgenic Res.* 10(6):577-82 (2001).
29. Tomilov A.A., Tomilova N.B., Ogarkova O.A., Tarasov V.A. Insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana:* increase of germinating seeds transformation efficiency after sonication. *Genetika* 35(9):1214-22 (1999).
30. Ryman B.E., Tyrrell D.A. Liposomes - methodology and applications. *Front. Biol.* 48:549-74 (1979).
31. Monti J.A., Christian S.T., Schutzbach J.S. Effects of dolichol on membrane permeability. Biochim. *Biophys. Acta* 905(1):133-42 (1987).
32. Trezise AE. *In vivo* DNA electrotransfer. DNA *Cell Biol.,* 21(12):869-77, (2002).
33. Inoue K. Expression of reporter genes introduced by microinjection and electroporation in fish embryos and fry. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1(4-5):266-70 (2002).
34. Taghian D.G., Nickoloff J.A. Electrotransformation of Chinese hamster ovary cells. *Methods Mol. Biol.* 48:115-21 (1995).
35. Qiu P., Ziegelhoffer P., Sun J., Yang N.S. Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. *Gene Ther.* 3(3):262-8 (1996).
36. Dileo J., Miller T.E. Jr., Chesnoy S., Huang L. Gene Transfer to Subdermal Tissues via a New Gene Gun Design. *Hum. Gene Ther.* 14(1):79-87 (2003).
37. Carballada R., Degefa T., Esponda P. Transfection of mouse eggs and embryos using DNA combined to cationic liposomes. *Mol. Reprod. Dev.* 56(3):360-5 (2000).
38. Yao J.Y., An J., Li J. Techniques for producing transgenic animals and the recent development. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 22(1):78-81 (2002).
39. Rojas-Martínez A., Martínez-Dávila I. A., Hernández-García A., Aguilar-Córdova E., Barrera-Saldaña H. A. Genetic therapy of cancer. *Rev. Invest. Clin.* 54(1):57-67, (2002).
40. Inesi G., Lewis D., Sumbilla C., Nandi A., Strock C., Huff K.W., Rogers T.B., Johns D.C., Kessler P.D., Ordahl C.P. Cell-specific promoter in adenovirus vector for transgenic expression of SERCA1 ATPase in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol.* 274(3 Pt 1):C645-53 (1998).

41. MacKay K., Striker L.J., Pinkert C.A., Brinster R.L., Striker G.E. Glomerulosclerosis and renal cysts in mice transgenic for the early region of SV40. *Kidney Int.* 32(6):827-37 (1987).
42. Beddington R.S., Robertson E.J. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105(4):733-7 (1989).
43. Williams R.L., Courtneidge S.A., Wagner E.F. Embryonic lethalities and endothelial tumors in chimeric mice expressing polyoma virus middle T oncogene. *Cell* 52(1):121-31 (1988).
44. Vick L., Li Y., Simkiss K. Transgenic birds from transformed primordial germ cells. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 251(1332):179-82 (1993).
45. Jesuthasan S., Subburaju S. Gene transfer into zebrafish by sperm nuclear transplantation. *Dev. Biol.* 242(2):88-95 (2002).
46. Shemesh M., Gurevich M., Harel-Markowitz E., Benvenisti L., Shore L.S., Stram Y. Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. *Mol. Reprod. Dev.* 56(2 Suppl):306-8 (2000).
47. Chang K., Qian J., Jiang M., Liu Y.H., Wu M.C., Chen C.D., Lai C.K., Lo H.L., Hsiao C.T., Brown L., Bolen J. Jr., Huang H.I., Ho P.Y., Shih P.Y., Yao C.W., Lin W.J., Chen C.H., Wu F.Y., Lin Y.J., Xu J., Wang K. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol.* 2(1): 5, (2002).
48. Perry, A.C.F., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y., Yanagimachi, R. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science* 284:1180-1183 (1999).
49. Thompson S., Clarke A.R., Pow A.M., Hooper M.L., Melton D.W. Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell,* 56(2):313-21, (1989).
50. Gossler A., Doetschman T., Korn R., Serfling E., Kemler R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 83(23):9065-9, (1986).
51. Mansour S.L., Thomas K.R., Capecchi M.R. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 336(6197):348-52 (1988).
52. Brink M.F., Bishop M.D., Pieper F.R. Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology* 53(1):139-48 (2000).
53. Van den Hout J.M., Reuser A.J., de Klerk J.B., Arts W.F., Smeitink J.A., Van der Ploeg A.T. Enzyme therapy for pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk. *J. Inherit. Metab. Dis.* 24(2):266-74 (2001).
54. Wheeler M.B., Walters E.M. Transgenic technology and applications in swine. *Theriogenology,* 56(8):1345-69, (2001).

55. Goldman I.L., Kadulin S.G., Razin S.V. Transgenic goats in the world's pharmaceutical industry in the XXI century. *Genetika* 38(1):5-21 (2002).
56. Wilkins T.D., Velander W. Isolation of recombinant proteins from milk. *J Cell Biochem.* 49(4):333-8 (1992).
57. Mendoza R.B., Cantwell M.J., Kipps T.J. Immunostimulatory effects of a plasmid expressing CD40 ligand (CD154) on gene immunization. *J. Immunol.* 159(12):5777-81 (1997).
58. Mori T., Devlin R.H. Transgene and host growth hormone gene expression in pituitary and nonpituitary tissues of normal and growth hormone transgenic salmon. *Mol. Cell. Endocrinol.* 149(1-2):129-39 (1999).
59. Nitz J., Burke B. A study of the facilitation of respiration in myotonic dystrophy. *Physiother. Res. Int.* 7(4):228-38 (2002).
60. Seznec H., Agbulut O., Sergeant N., Savouret C., Ghestem A., Tabti N., Willer J.C., Ourth L., Duros C., Brisson E., Fouquet C., Butler-Browne G., Delacourte A., Junien C., Gourdon G. Mice transgenic for the human myotonic dystrophy region with expanded CTG repeats display muscular and brain abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* 10(23):2717-26 (2001).
61. Mankodi A., Logigian E., Callahan L., McClain C., White R., Henderson D., Krym M., Thornton C.A. Myotonic dystrophy in transgenic mice expressing an expanded CUG repeat. *Science* 289(5485):1769-73 (2000).
62. Blechinger S.R., Warren J.T. Jr., Kuwada J.Y., Krone P.H. Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line. *Environ. Health Perspect.* 110(10):1041-6 (2002).
63. Vanhove B., Renard J.P., Soulillou J.P. Genetic engineering in the pig. Gene knockout and alternative techniques. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 862:28-36 (1998).
64. Fricker J. Baboon xenotransplant fails but patient improves. *Lancet* 347 (8999):457 (1996).
65. Onions D., Cooper D.K., Alexander T.J., An approach to the control of disease transmission in pig-to-human xenotransplantation, *Xenotransplantation* 7:143-155, (2000).
66. Boneva R.S., Folks T.M., Chapman L.E. Infectious disease issues in xenotransplantation. *Clin. Microbiol. Rev.* 14(1):1-14 (2001).
67. Wilmut I., Archibald A.L., McClenaghan M., Simons J.P., Whitelaw C.B., Clark A.J. Production of pharmaceutical proteins in milk. *Experientia* 47(9):905-12 (1991).
68. Wilmut I., Archibald A.L., Harris S., McClenaghan M., Simons J.P., Whitelaw C.B., Clark A.J. Modification of milk composition. *J. Cell. Biochem.*, 64: 336-339
69. Schnieke A.E., Kind A.J., Ritchie W.A., Mycock K., Scott A.R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K.H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 278(5346):2130-3 (1997).
70. Ebert K.M., Selgrath J.P., DiTullio P., Denman J., Smith T.E., Memon M.A., Schindler J.E., Monastersky G.M., Vitale J.A., Gordon K. Transgenic produc-

tion of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology* 9(9):835-8 (1991).
71. Krimpenfort P., Rademakers A., Eyestone W., van der Schans A., van den Broek S., Kooiman P., Kootwijk E., Platenburg G., Pieper F., Strijker R. Generation of transgenic dairy cattle using *in vitro* embryo production. *Biotechnology* 9(9):844-7 (1991).
72. Wall R.J., Kerr D.E., Bondioli K.R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. *J. Dairy Sci.* 80(9):2213-24 (1997).
73. Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L'Huillier P., Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat. Biotechnol.* 21(2):157-62 (2003).
74. Zuelke KA. Transgenic modification of cows milk for value-added processing. *Reprod. Fertil. Dev.* 10(7-8):671-6, (1998).
75. Ivarie R. Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol.* 21(1):14-9 (2003).
76. Harvey A.J., Speksnijder G., Baugh L.R., Morris J.A., Ivarie R. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat. Biotechnol.* 20(4):396-9, (2002).
77. http://212.67.202.140/~biotech/News/t/Tranxenogen.htm
78. Shuman RM. Production of transgenic birds. *Experientia* 47(9):897-905 (1991).
79. Thoraval P., Afanassieff M., Cosset F.L., Lasserre F., Verdier G., Coudert F., Dambrine G. Germline transmission of exogenous genes in chickens using helper-free ecotropic avian leukosis virus-based vectors. *Transgenic Res.* 4(6):369-77 (1995).
80. Tanaka R., Ishibashi M., Tokunaga H., Tokunaga M. Secretion of hen egg white lysozyme from *Kluyveromyces lactis*. *Biosci. Biotechnol.* Biochem., 64(12): 2716-8, (2000).
81. Harvey A.J., Speksnijder G., Baugh L.R., Morris J.A., Ivarie R. Consistent production of transgenic chickens using replication-deficient retroviral vectors and high-throughput screening procedures. *Poult. Sci.* 81(2):202-12 (2002).
82. Zhu Z.Y., Sun Y.H. Embryonic and genetic manipulation in fish. *Cell Res.* 10(1):17-27 (2000).
83. Hamada K., Tamaki K., Sasado T., Watai Y., Kani S., Wakamatsu Y., Ozato K., Kinoshita M., Kohno R., Takagi S., Kimura M. Usefulness of the medaka beta-actin promoter investigated using a mutant GFP reporter gene in transgenic medaka *(Oryzias latipes). Transgenic Research,* 4(8): 120-130, (1996).
84. Tsai H.J., Wang S.H., Inoue K., Takagi S., Kimura M., Wakamatsu Y., Ozato K. Initiation of the transgenic *lacZ* gene expression in medaka *(Oryzias latipes)* embryos. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4(1):1-9 (1995).
85. Lin S., Yang S., Hopkins N. lacZ expression in germline transgenic zebrafish can be detected in living embryos. *Dev. Biol.* 161(1):77-83 (1994).

86. Chen T.T., Vrolijk N.H., Lu J.K., Lin C.M., Reimschuessel R., Dunham R.A. Transgenic fish and its application in basic and applied research. *Biotechnol. Annu. Rev.* 2:205-36 (1996).
87. Barrera-Saldaña, H.A., Ortiz-López, R., Rojas-Martínez, A. Resendez-Perez, D. Reacción en cadena de la polimerasa: una nueva época dorada en la Biología Molecular. *Ciencia y Desarrollo* (Conacyt) vol. XVIII, 108: 50-60, (1993).
88. Dunham R.A., Ramboux A.C., Duncan P.L., Hayat M., Chen T.T., Lin C.M., Kight K., González-Villaseñor I., Powers D.A. Transfer, expression, and inheritance of salmonid growth hormone genes in channel catfish, *Ictalurus punctatus,* and effects on performance traits. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1(4-5):380-9 (1992).
89. Male R., Lorens J.B., Nerland A.H., Slinde E. Biotechnology in aquaculture, with special reference to transgenic salmon. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 11:31-56 (1993).
90. Velander W.H., Lubon H., Drohan W.N. Transgenic livestock as drug factories. *Sci. Am.,* 276(1):70-4 (1997).
91. http://www.biotech.bioetica.org/ap29.htm.
92. J. Cibellie. *Principles of cloning*. Academic Press, NY, EUA.
93. Bertolini M., Mason J.B., Beam S.W., Carneiro G.F., Sween M.L., Kominek D.J., Moyer A.L., Famula T.R., Sainz R.D., Anderson G.B. Morphology and morphometry of *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology* 58(5):973-94 (2002).
94. Wolf D.P., Mitalipov S., Norgren R.B. Jr. Nuclear transfer technology in mammalian cloning. *Arch. Med. Res.* 32(6):609-13 (2001).
95. Tong W.F., Ng Y.F., Ng S.C. Somatic cell nuclear transfer (cloning): implications for the medical practitioner. *Singapore Med.* J. 43(7):369-76 (2002).
96. http://www.prodiversitas.bioetica.org/prensa45.htm
97. Kitiyanant Y., Saikhun J., Chaisalee B., White K.L., Pavasuthipaisit K. Somatic cell cloning in buffalo (*Bubalus bubalis*): effects of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning Stem Cells* 3(3):97-104 (2001).
98. Galibert F., Godet J., Kader J.C., Lepesant J.A. Advantage of knowing nature's secrets. *Nature* 385(6619):810-3 (1997).
99. Khan A. The pretty story of Dolly and Polly, the lambs of the transgenic revolution. *Rev. Infirm.* (34):60-3 (1998).
100. Moradpour D., Blum H.E. Dolly, Polly: cloning by somatic cell nucleus transfer *Dtsch Med Wochenschr* 124(9):255-6 (1999).
101. Yanagimachi R. Cloning: experience from the mouse and other animals. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187(1-2):241-8 (2002).
102. ¿Es posible la ganadería molecular? Barañao, L. Encrucijadas UBA, *Revista de la Universidad de Buenos Aires* 3: 50-57 (1995).
103. Dunnett S.B. Reverse transcription of inserted DNA in a monkey gives us ANDi. *Trends Pharmacol. Sci.* 22(5):211-5 (2001).

CAPÍTULO VI

PLANTAS TRANSGÉNICAS

L. Herrera-Estrella
M. Martínez Trujillo

La importancia de las técnicas de fitomejoramiento para incrementar la producción agrícola

La permanente necesidad de disponer de satisfactores que atiendan las demandas humanas de alimento, vestido y obtención de materias primas para la elaboración de diversos productos, ha sido la causa de que, desde el surgimiento de la agricultura, las plantas de interés para el hombre hayan sido cultivadas, seleccionadas y consecuentemente mejoradas en características tales como mayor rendimiento, calidad nutricional, facilidad de cultivo y resistencia a los agentes bióticos o abióticos que las afectan.

El fitomejoramiento tiene sus bases en los experimentos realizados hace más de un siglo por Gregor Mendel, en los que concluyó que las características de los organismos están dadas por factores discretos heredables (genes), y no son resultado, como se creía anteriormente, de la mezcla azarosa de las cualidades de los progenitores. Con este conocimiento comenzó, entre los cultivos de mayor importancia, el método tradicional de producción de cultivares mejorados mediante cruzas dirigidas entre individuos, de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas. Los individuos sobresalientes son seleccionados en ciclos subsecuentes de cultivo, hasta que después de numerosos eventos de cruzas y retrocruzas, aunadas a laboriosas pruebas de campo, se obtiene una generación portadora de la característica deseada que es reconocida como una nueva variedad. Todo el proceso de selección va acompañado de colectas, tanto de semillas como de plantas completas, que son almacenadas en bancos de germoplasma quedando a disposición para posteriores usos. Cabe destacar que una importante limitante de todo proyecto de producción de nuevas variedades vegetales es la incompatibilidad sexual entre las especies de plantas seleccionadas como progenitores y

que si la divergencia genética entre las especies involucradas es muy grande, la probabilidad de obtener semillas viables de tal cruza es demasiado baja y mayor será el número de generaciones requerido para incorporar en la progenie el carácter elegido.

La técnica descrita, también conocida como fitomejoramiento tradicional, se ha empleado ancestralmente y sus logros resultan innegables. Sin embargo, dichos métodos, además de resultar ya insuficientes para incrementar la producción agrícola a un ritmo que permita satisfacer la creciente demanda de alimentos impuestas por el permanente crecimiento demográfico, tienen el inconveniente de haber producido variedades vegetales extremadamente dependientes de agroquímicos, cuyo uso desmedido impacta negativamente al ambiente.

Los objetivos principales de los programas de fitomejoramiento actuales siguen siendo aumentar el rendimiento, disminuir las pérdidas ocasionadas por plagas y enfermedades y reducir los costos de producción. Sin embargo, ahora también se tiene interés de emplear los cultivos agrícolas para generar productos de alto valor agregado para usos en la industria química, alimenticia y farmacéutica. Así, hoy en día la ingeniería genética, definida como la manipulación en el laboratorio de la información genética de un organismo utilizando las técnicas de la biología molecular, se presenta como una poderosa alternativa para obtener cultivares transgénicos que superen en su productividad y calidad a sus contrapartes obtenidas por métodos tradicionales.

La ingeniería genética permite el acceso y la manipulación directa de la información genética de cualquier ser vivo, e incluso posibilita la creación de genes sintéticos. Por ello, esta tecnología, rompe con las barreras impuestas por la incompatibilidad sexual y hace posible introducir en plantas, genes provenientes no sólo de otras especies vegetales evolutivamente distantes, sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales; esta modificación se lleva a cabo en un ciclo. Lo anterior se basa en el principio de que el código genético de los organismos vivos es universal. Es por ello que la obtención de plantas transgénicas (portadoras de un gene ajeno o heterólogo) empleando alguna de las técnicas disponibles para tal efecto, representa hoy en día uno de los medios más versátil y preciso para producir variedades vegetales mejoradas.

Con las metodologías del DNA recombinante ahora es posible la producción de organismos modificados genéticamente o transgénicos, en los que se han insertado genes heterólogos mediante su manipulación en el laboratorio. Particularmente en plantas, el poder introducir nueva información genética requiere que se cumpla con los siguientes dos requisitos: a) disponer de un método para la regeneración *in vitro* de la especie de interés, y b) contar con un método de transformación eficiente para la misma.

Puesto que las técnicas de cultivo de tejidos hacen posible que a partir de cualquier célula o tejido se puedan regenerar plantas completas, su uso resulta indispensable para la regeneración de individuos transgénicos que contengan la nueva información genética. En lo que a transformación se refiere, es necesario contar con un método que permita tanto la introducción del material genético que se pretende incorporar, como su integración estable, funcional y heredable en el genoma vegetal.

Las plantas transgénicas que se han logrado obtener a la fecha, provienen del uso de diversos métodos de transformación genética. Entre ellos se tiene un método biológico y por lo tanto natural, basado en el empleo de una bacteria que vive en todos los suelos del mundo llamada *Agrobacterium tumefaciens*. Debido a que inicialmente se pensó que el sistema basado en *Agrobacterium* sólo se podía aplicar a un número limitado de especies vegetales (ahora se sabe que puede no sólo transformar todas las especies vegetales sino también otros organismos como hongos), surgió la necesidad de desarrollar métodos de transformación genética alternativos. Entre estos métodos alternativos se pueden mencionar protocolos fisicoquímicos de transformación directa, como la electroporación de protoplastos y los tratamientos con polietilenglicol y cloruro de calcio, y métodos físicos, como el bombardeo con micropartículas recubiertas de DNA.

El primer método diseñado para la transformación de células vegetales, que ha resultado el más exitoso y por consecuencia el más usado, surgió del estudio detallado del mecanismo de infección de la bacteria fitopatógena *Agrobacterium tumefaciens*. Desde entonces, los esfuerzos fueron enfocados a conocer los mecanismos de transferencia de este DNA, con la idea de adecuar este sistema para transferir genes a plantas.

Estudios orientados a establecer la funcionalidad de genes provenientes de otros organismos en sistemas vegetales, mostraron que los genes

procariónticos o eucariónticos heterólogos intactos no son reconocidos por la maquinaria de la planta, y por consiguiente, no son expresados. Esto llevó a la conclusión de que la expresión de genes heterólogos en sistemas vegetales, sólo sería posible si las secuencias codificantes de los genes foráneos se colocaban bajo el control de señales transcripcionales funcionales en plantas.

El primer ejemplo exitoso de la expresión de un transgén en células vegetales fue reportado en 1983 (1) y al año siguiente se obtuvo la primera planta de tabaco transgénica diseñada por ingeniería genética, tomándose estos avances como el nacimiento de la época del fitomejoramiento agrícola por ingeniería genética.

La supuesta incapacidad de *Agrobacterium* para infectar plantas monocotiledóneas, limitó por mucho tiempo la transformación de cultivos tan importantes como arroz, trigo y maíz. Este hecho impulsó la búsqueda de técnicas alternativas y así surgieron la introducción de DNA a células desprovistas de pared celular (protoplastos), utilizando sustancias permeabilizantes de la membrana plasmática, como el polietilenglicol, la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje que abren poros en la membrana (electroporación) y la microinyección, que no es otra cosa que la introducción directa de DNA en el núcleo de las células vegetales. La aplicación de estos métodos ha sido muy limitada, ya sea por las inconveniencias que representan el poder regenerar plantas completas a partir de protoplastos o por lo difícil e impráctico que resulta utilizar la microinyección con fines masivos y comerciales.

Las dificultades para la transformación de cereales fueron vencidas cuando, en 1987, se diseñó un acelerador de partículas con el cual es posible bombardear células o segmentos de tejido vegetal con micropartículas recubiertas de DNA. Este método, también conocido como biobalística, que permitió la transformación de maíz y arroz, también se ha empleado exitosamente para transformar diferentes especies vegetales de gran importancia alimenticia a escala mundial.

El sistema de *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens y *A. rhizogenes,* son bacterias que viven en la mayoría de los suelos y que infectan a un gran número de especies vegetales. Tales bacterias son los agentes causales de las enfermedades denominadas "agalla de la corona" (*A. tumefaciens*) y "raíz pilosa" (*A. rhizogenes*), que se

caracterizan por la formación de un tumor ("agalla de la corona") o por el crecimiento anormal de raíces ("raíz pilosa"), alrededor de zonas heridas.

El estudio detallado de estas enfermedades puso de manifiesto que *Agrobacterium* representa al ingeniero genético de la naturaleza, ya que su mecanismo de infección, que inicia con la penetración de las bacterias a las plantas a través de heridas, se caracteriza porque el microorganismo inserta un segmento de su DNA, denominado T-DNA (DNA transferido), en el genoma de las células infectadas. Dicho T-DNA, contenido en plásmidos llamados Ti (inductor de tumores) en *A. tumefaciens,* y Ri (inductor de raíces) en *A. rhizogenes,* contiene tanto genes responsables de la síntesis de reguladores del crecimiento vegetal, causantes del crecimiento anormal típico de las enfermedades causadas por estas bacterias, como genes para la síntesis de productos inusuales nitrocarbonados denominados opinas, que el microorganismo utiliza como alimento para su desarrollo y reproducción. En el mecanismo infectivo descrito, sobresale que los genes de origen bacteriano contenidos en el T-DNA, no sólo son capaces de integrarse en el genoma vegetal, sino que una vez integrados, son procesados eficientemente por la planta para producir proteínas funcionales.

Varios grupos de investigación sacaron ventaja de este conocimiento y en el laboratorio se dedicaron a modificar los plásmidos Ti/Ri, conservando en ellos las secuencias necesarias para la transmisión e integración del T-DNA en el genoma vegetal, pero removiendo los genes bacterianos responsables de la formación de tumores o raíces (cepas no oncogénicas o desarmadas). Es posible entonces integrar genes heterólogos entre las secuencias de integración del T-DNA, para que sean transferidos a los genomas de las plantas tratadas con *Agrobacterium.* Los bordes del T-DNA han sido transferidos a plásmidos relativamente pequeños (8-10 Kb) para poder insertar más fácilmente los genes heterólogos; éstos han sido denominados vectores binarios. De tal modo, la producción de plantas transgénicas se logra "infectando" con cepas de *Agrobacterium* desarmadas y vectores binarios, segmentos de una planta, que pueden ser de hoja, tallo o cotiledón, a partir de los cuales, mediante un proceso de regeneración por cultivo de tejidos, se recuperan plantas completas.

Durante el proceso de transformación frecuentemente se presentan eventos, como los efectos de la región genómica donde ocurre la inserción y el número de genes integrados, que alteran la expresión de los genes transferidos. Por tal razón, para garantizar que se recuperen plantas que expresen el transgén en un nivel adecuado al fin específico que se persigue, por ejemplo, la cantidad suficiente de bioinsecticida para

matar un insecto, y evitar usar plantas que hayan sufrido alteraciones debidas a la inserción del T-DNA, usualmente se obtienen entre 50 y 100 eventos independientes de transformación. Las diferentes plantas obtenidas a partir de estos eventos independientes de transformación son extensivamente probadas, primero a nivel de laboratorio e invernadero y después a nivel de campo, para poder identificar una o pocas plantas que expresan de la manera deseada la nueva característica genética y que se comporten de manera indistinguible de la planta original a nivel de campo en todas sus propiedades agronómicas y alimentarias.

El sistema de transformación de plantas basado en *Agrobacterium*, sigue siendo la primera opción cuando se piensa en recuperar plantas transgénicas de una especie sobre la que no existen antecedentes al respecto. La técnica ha sido aplicada con éxito para obtener plantas transgénicas de un gran número de especies vegetales dicotiledóneas y, recientemente, se ha logrado con él la transformación de maíz y arroz, por lo que se sugiere que el sistema es susceptible de emplearse para transformar cualquier especie vegetal (figura VI.1).

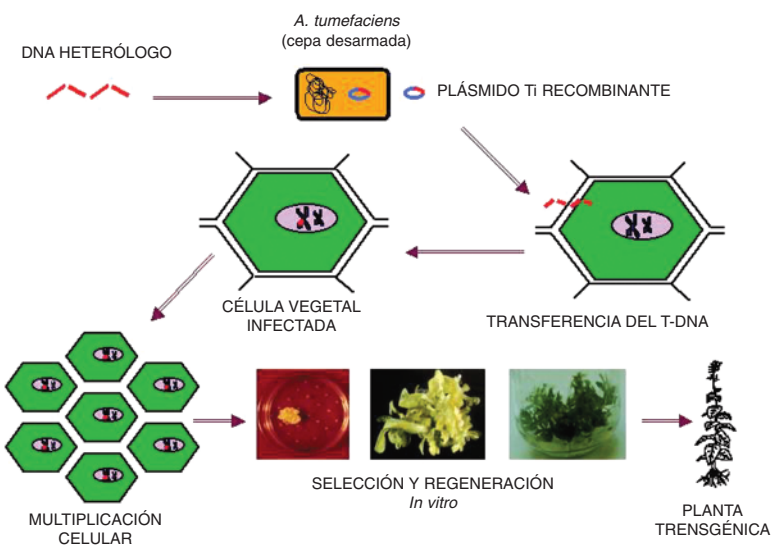


Figura VI.1

FITOMEJORAMIENTO MEDIANTE INGENIERÍA GENÉTICA

Gracias a la biotecnología podemos aislar y clonar genes de interés antropocéntrico. Mediante el empleo de alguno de los métodos de transformación disponibles, dichos genes pueden incorporarse en el genoma de las plantas en un solo ciclo de cultivo.

Otra de las herramientas que existen para la introducción directa de ácidos nucleicos a células vegetales es la biobalística. Dicha técnica representa un método físico de transformación y consiste en el bombardeo de tejidos con micropartículas cubiertas con DNA o con cualquier otra biomolécula que se pretenda introducir a células vegetales (2). Si bien diseñada recientemente, la biobalística es el método no biológico con el que se han obtenido los mejores resultados. Para el caso, se utilizan microproyectiles de oro o tungsteno (químicamente inertes), que gracias a un acelerador de partículas son disparados a velocidad supersónica, que les permite atravesar la pared y la membrana de la célula vegetal bombardeada sin causarle daños letales (figura VI.2).

Puesto que para el bombardeo es posible utilizar cualquier tipo de explante vegetal, desde células y protoplastos, hasta plántulas completas, pasando por tejidos organizados como embriones y meristemos, en ocasiones se puede incluso prescindir de los métodos de regeneración *in vitro* necesarios para recuperar plantas a partir de células o de segmentos de tejidos indiferenciados.

A pesar de la desventaja que representa el bajo número de transformantes producido por evento de bombardeo, la versatilidad de la aceleración de partículas para introducir transgenes en células vegetales ha superado muchas de las barreras asociadas a otros métodos de transformación, como son las dificultades inherentes al cultivo y regeneración de protoplastos. En realidad, la biobalística ha demostrado ser la mejor opción para la producción rutinaria de plantas transgénicas de cultivos tan importantes como soya, maíz, sorgo, papaya, espárrago, caña de azúcar, arroz y trigo, cuya transformación por otros métodos había sido más bien anecdótica.

Recientemente se ha objetado el uso de la biobalística para la transformación genética de plantas que van a ser destinadas a su uso comercial debido a que en general se incorporan segmentos de DNA no deseados y se integran en el genoma vegetal copias múltiples de los genes introducidos. Por esta razón se ha planteado que el sistema ideal de transformación es aquel basado en el plásmido Ti de *Agrobacterium,* ya que se integra un segmento muy bien definido de DNA y se pueden obtener con cierta facilidad plantas que contienen una sola copia de los genes introducidos.

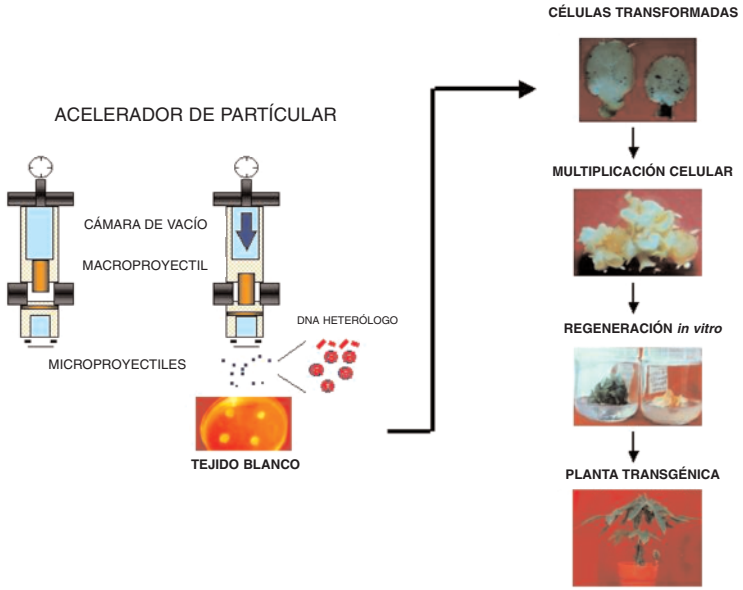


Figura VI.2

BIOBALÍSTICA

La aceleración supersónica de micropartículas de oro o tungsteno recubiertas de DNA, mediante el uso de una pistola de aire, permite la introducción de DNA a células vegetales y su eventual integración en los cromosomas. La regeneración de plantas transgénicas a partir de las células bombardeadas es posible gracias al uso de técnicas de cultivo de tejidos.

Aplicaciones de la ingeniería genética de plantas

Al igual que el fitomejoramiento tradicional, la biotecnología se ha enfocado principalmente a la búsqueda de incrementos en la producción y protección de cultivos agrícolas contra plagas y enfermedades. Sin embargo, los rápidos adelantos de las técnicas de biología molecular han ampliado los horizontes y en el futuro próximo la industria, el ambiente y la salud humana y animal, también se verán beneficiados por la aplicación de estas novedosas técnicas. Con ellas se intenta no sólo obtener variedades vegetales tolerantes a plagas, enfermedades y condiciones ambientales adversas que permitan mejorar los rendimientos, sino plantas capaces de producir insumos de alto valor económico y ambiental. La lista de productos susceptible de obtenerse en plantas transgénicas incluye enzimas, alimentos con alto valor nutritivo, productos farmacéuticos,

vacunas y plásticos biodegradables. Las expectativas de la producción y uso de plantas transgénicas se discuten a continuación.

Mejoramiento de la composición y cualidades de semillas y frutos

Las semillas representan la fuente de alimento más importante en las plantas, ya que contienen proteínas, lípidos y carbohidratos y pueden ser almacenadas y transportadas sin sufrir cambios considerables en sus propiedades nutricionales. Los humanos y los animales no pueden sintetizar diez de los veinte aminoácidos esenciales y por lo tanto deben obtenerlos como parte de la dieta. La composición de aminoácidos en las semillas es variable y ninguna especie vegetal produce semillas con la proporción óptima de aminoácidos necesarios en la dieta humana. Las fuentes principales de proteínas para una gran parte de la población humana son las semillas de cereales y leguminosas; sin embargo, una característica de éstas es la deficiencia de lisina en cereales y de cisteína y metionina en leguminosas. Aunque una solución a este problema sería el consumo de ambas clases de semillas en las proporciones adecuadas, en el caso de los humanos existen tradiciones y factores económicos que hacen poco práctica esta solución. Una alternativa consiste en cambiar la composición de las proteínas en algunas semillas ya sea por métodos convencionales de mejoramiento genético o mediante el uso de la ingeniería genética. Algunos esfuerzos de ingeniería genética orientados para este propósito son el incremento hasta en 33% en metionina en las proteínas de las semillas de plantas transgénicas de canola y lupino, mediante la expresión en semilla de una proteína de maíz rica en metionina en estos cultivos. El contenido de lisina en semillas de soya se incrementó hasta en 43%, mediante la introducción y expresión de un gene sintético que codifica una proteína rica en este aminoácido. Mediante la modificación de las propiedades regulatorias de las enzimas implicadas en la biosíntesis de aminoácidos esenciales se ha incrementado la lisina libre en soya y en canola. Estos éxitos permitirán posteriormente la modificación de otras plantas como maíz, arroz, y frijol.

Otra aplicación potencial de la ingeniería genética en el mejoramiento de la calidad nutricional de los alimentos, es la de aumentar el contenido de vitaminas. La deficiencia en vitamina A es un problema muy importante en varios países, especialmente en Asia, donde 124 millones de niños padecen la deficiencia de esta vitamina, lo cual conduce a la

ceguera. La aplicación oral de esta vitamina es problemática, debido principalmente a la carencia de infraestructura. Una alternativa es la producción de esta vitamina en la semilla de arroz, el cual es consumido preferentemente en estas poblaciones. Mediante la introducción de tres genes foráneos en plantas de arroz, ha sido posible la producción de β-caroteno (pro-vitamina A) en el endospermo de las semillas de este cereal (3). Debido a que el β-caroteno puede ser transformado en el cuerpo humano a vitamina A, este arroz transgénico tiene un enorme potencial de disminuir la avitaminosis que padecen muchos niños en Asia. El cultivo de esta variedad transformada o bien la transferencia de los genes a otras variedades mediante cruzamiento y selección permitirá el cultivo extensivo del arroz dorado (como se le conoce comúnmente) rico en pro-vitamina A (figura VI.3).

Se considera que los lípidos de origen vegetal tienen mejores cualidades nutricionales con respecto a los lípidos animales, principalmente debido a que no contienen colesterol y a que son ricos en ácidos grasos poli-insaturados. Con el propósito de mejorar aún mas la calidad de los aceites vegetales, sobre todo para disminuir la incidencia de enfermedades del corazón causadas por el consumo de grandes cantidades de ácidos grasos saturados, se han obtenido plantas de canola transgénicas, con una mayor proporción de ácidos grasos poli-insaturados (40% de ácido láurico) en estas semillas.

Figura VI.3

PRODUCCIÓN DE β-CAROTENO EN ARROZ TRANSGÉNICO

La introducción de tres diferentes genes heterólogos en arroz se llevó a cabo utilizando el sistema de *Agrobacterium*. Las enzimas codificadas por los tres genes introducidos transforman el geranil difosfato en β-caroteno y lo acumulan en el endospermo, produciendo el color amarillo del llamado arroz dorado. El β-caroteno puede ser transformado en vitamina A por el cuerpo humano y aliviar deficiencias de esta vitamina que causan ceguera. (Cortesía del doctor Ingo Potrikus.)

Alteración de la vida de anaquel de frutos

Puesto que el proceso de maduración de frutos es continuo e irreversible, otro de los graves problemas a los que se enfrenta el manejo de productos agrícolas en el área de fruticultura, es el reducido tiempo del que se dispone para el traslado y distribución de frutos frescos desde los lugares de cosecha a los sitios de venta y consumo. Por ello, la ingeniería genética ha intentado retardar la maduración y reducir las pérdidas poscosecha al aumentar la llamada vida de anaquel. Usando genes antisentido es posible transformar plantas y bloquear la expresión de genes importantes en el proceso de maduración, tales como los relacionados en la biosíntesis de etileno (hormona vegetal que dispara el proceso de maduración de muchos frutos) o de enzimas hidrolíticas directamente involucradas en el ablandamiento de los frutos. Usando estas estrategias se han producido tomates, melones y algunos otros frutos cuya vida de anaquel se ha prolongado desde unos días hasta varias semanas. En la actualidad los tomates de mayor vida de anaquel ya han sido comercializados por tres diferentes compañías. Esta estrategia tiene un potencial enorme para su aplicación en frutos tropicales, que son producidos principalmente en países en vías de desarrollo, donde las condiciones de almacenamiento y transporte son deficientes, ocasionando pérdidas severas.

Resistencia a virus, bacterias y hongos fitopatógenos

Una de las aplicaciones de la ingeniería genética que más ha sido explorada tanto en laboratorios públicos como privados es la generación de plantas resistentes a enfermedades. El éxito de estos estudios ha sido variable, por ejemplo plantas resistentes a más de 30 enfermedades virales han sido obtenidas con éxito, mientras que el desarrollo de resistencia enfermedades causadas por hongos es aún muy incipiente. A continuación se describen algunos de los avances obtenidos en este respecto.

Los virus, considerados entidades no celulares compuestos de ácidos nucleicos y proteínas, representan a los agentes fitopatogénicos más devastadores que se conocen porque no existe ninguna medida de control efectiva contra su ataque. Por esta razón, se piensa que el control de las enfermedades virales será el campo donde la ingeniería genética de plantas puede tener su mayor impacto.

El uso de genes virales y su introducción en plantas ha permitido el desarrollo de resistencia, lo cual se conoce como resistencia derivada del patógeno, y este fenómeno ha sido explicado considerando que la planta reconoce un exceso en la expresión de los genes virales introducidos y evita su expresión, impidiendo además la infección por el virus de la cepa utilizada y cepas relacionadas.

Usando el gene que codifica para la proteína de la cápside se obtuvieron en 1986 las primeras plantas de tabaco resistentes al virus del mosaico del tabaco. Usando una estrategia similar se obtuvieron plantas de calabacita amarilla y de sandía, resistentes a virus. La papaya ha sido severamente atacada por el virus de la mancha anular y los esfuerzos para generar plantas resistentes usando las técnicas convencionales de hibridación han fracasado, por lo que fue necesario transformar plantas con el gene que codifica para la proteína de la cápside de este virus. A partir de 1994 se obtuvieron plantas resistentes al virus y ha sido posible mantener cultivos redituables de papaya en diferentes lugares, como es el caso de Hawai. Actualmente, la papaya y la calabacita amarilla han sido comercializadas. Además, tomates transgénicos resistentes al virus del mosaico del tabaco, papas transgénicas resistentes a los virus X y Y de la papa y pepinos transgénicos resistentes al virus del mosaico del pepino, han sido producidos.

Las pérdidas derivadas de enfermedades bacterianas, a nivel global, son consideradas menos importantes que aquellas causadas por virus y hongos. Sin embargo, a nivel regional infecciones bacterianas causan pérdidas muy importantes en algunas especies. Diferentes estrategias han sido utilizadas para disminuir el daño causado por las enfermedades bacterianas, como es la producción de plantas transgénicas resistentes a toxinas o que expresan genes de resistencia a la infección bacteriana.

El arroz silvestre *Oryza longistaminata* es resistente a *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* (Xoo) causante de la enfermedad del tizón del halo, la cual causa importantes pérdidas en la producción comercial de arroz en Asia. En 1995 se identificó y aisló un gene de resistencia a esta bacteria (Xa21), el cual fue transferido posteriormente a variedades de arroz *Indica*, y éstas mostraron una mejoría en la resistencia a *Xoo*. Actualmente se están realizando ensayos para determinar la resistencia de las plantas de arroz en condiciones de campo, así como la conservación de características deseables de la semilla.

Aunque los hongos producen importantes pérdidas en cultivos de plantas, hay pocos logros importantes en la producción de plantas trans-

génicas resistentes a estos patógenos. La expresión de genes que codifican enzimas capaces de degradar los constituyentes mayores de la pared celular de los hongos (quitina y β-1,3 gucanos), ha sido usada como una estrategia para controlar a estos organismos. La expresión de dos genes que codifican para estas enzimas en plantas de tomate, mostró un nivel útil de resistencia al ataque por el hongo *Fusarium*.

Plantas transgénicas resistentes al ataque de insectos

En condiciones naturales, las interacciones planta-insecto son de vital importancia para ambos organismos. Particularmente, las plantas se ven beneficiadas en procesos como polinización, remoción de tejido muerto y eliminación de insectos dañinos. De tal modo, puede decirse que el control de insectos que se alimentan de plantas es un evento común en la naturaleza.

Sin embargo, la mayoría de las plantas cultivadas, al sembrarse en regiones diferentes a sus centros de origen, se vuelven susceptibles de ser atacadas por especies regionales de insectos, que de hecho, son una de las principales causas de pérdidas de productos agrícolas en todo el mundo. Sin duda, el problema es mucho mayor cuando se consideran las pérdidas que causan los insectos durante el periodo de almacenamiento de granos y semillas. Por tal razón, la obtención de cultivares resistentes a plagas, es una de las prioridades de cualquier programa de fitomejoramiento.

Para enfrentar este problema, la ingeniería genética se ha interesado en dos grupos de genes (4). Uno de ellos incluye a los provenientes de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt), que codifican para proteínas cristalinas con propiedades insecticidas conocidas como δ-endotoxinas. Cuando estas δ-endotoxinas son ingeridas por los insectos, éstas ejercen su toxicidad mediante la unión a células intestinales del tracto digestivo ocasionando una lisis osmótica. Estas proteínas manifiestan una actividad específica a diferentes grupos de insectos, por ejemplo, las proteínas llamadas CryI son activas contra lepidópteros (polillas y mariposas) y los CryIII solamente contra coleópteros (escarabajos).

Los genes que codifican para δ-endotoxinas inicialmente mostraron una expresión baja en plantas, por lo que tuvieron que ser modificados mediante cambios en el uso de codones, incremento en el contenido de GC y eliminación de algunas regiones. De esta manera ha sido posible la

generación de plantas transformadas que pueden efectivamente ser utilizadas para resistir el ataque de insectos específicos. El primer cultivo resistente a insectos fue el tabaco, en el año de 1987, y en la actualidad también se tiene tomate, algodón, papa, maíz, canola, soya y arroz. En el caso del maíz, las plantas transformadas con genes Bt muestran excelente protección contra el barrenador europeo inclusive usando poblaciones de insectos 100 veces mayores con relación a las que se presentan de manera natural. Aunque el maíz ha sido un éxito biotecnológico, los insectos que atacan este cultivo difieren de acuerdo con la región geográfica, y son necesarios ensayos de campo para evaluar la efectividad para el control de insectos en diferentes ambientes. Algunos ensayos ya han sido realizados en México por parte de algunas compañías privadas y se detallan en capítulos posteriores.

Recientemente (a partir del año 2001), se ha reportado la producción de plantas híbridas de arroz, que muestran resistencia a dos de las más importantes plagas de lepidópteros, sin una reducción en la productividad. Se han desarrollado en Cuba líneas transgénicas de caña de azúcar, resistentes al ataque de insectos, un cultivo importante para ese país y otros en vías de desarrollo.

Debido a que muchas especies de insectos no son sensibles a las proteínas cry, la búsqueda de otros genes cuyos productos tengan propiedades insecticidas, es una labor permanente en el campo de la biotecnología vegetal. Entre los candidatos más destacados se mencionan a los inhibidores de proteasas que interfieren con el funcionamiento de las enzimas digestivas de los insectos y que son parte del sistema de defensa de algunas plantas. Usando inhibidores de proteasas de origen vegetal ha sido posible obtener plantas transformadas de canola, papa, alfalfa y tomate, aunque en estos casos las plantas todavía no han sido comercializadas.

Plantas transgénicas con mayor tolerancia a factores ambientales

La sequía, salinidad y el frío son los factores abióticos más importantes que disminuyen la producción agrícola. Una de las estrategias para incrementar la tolerancia a tal estrés es la producción de compuestos osmoprotectores (osmolitos), tales como azúcares, alcoholes, aminoácidos y compuestos cuaternarios de amonio (glicinbetaína), los cuales incrementan el potencial osmótico de la célula y estabilizan membranas y estructuras macromoleculares. Algunas especies vegetales producen

estos osmolitos debido a que están naturalmente adaptadas a crecer en condiciones de sequía, alta salinidad o bajas temperaturas; sin embargo, muchas de las plantas cultivadas de importancia económica no acumulan suficiente cantidad de compuestos osmoprotectores que les permitan ser tolerantes al estrés, por lo que se han hecho esfuerzos encaminados a la producción de plantas transgénicas con un incremento en la producción de osmolitos. La glicinbetaína ha sido producida en plantas de tabaco y *Arabidopsis*, transformadas con un gene bacteriano y muestran una mejor tolerancia al estrés producido por NaCl y frío. Además, en tabaco se ha logrado la sobreproducción del azúcar trehalosa y se ha obtenido un incremento en la tolerancia a la sequía. Otros osmolitos, tales como el manitol han sido sobreproducidos en *Arabidopsis*, y se observa un mejoramiento en la germinación de las semillas en condiciones de alta salinidad (5).

Otra estrategia para incrementar la tolerancia al estrés es la sobreexpresión de genes que codifican transportadores de iones, por ejemplo el de Na^+/H^+ de la membrana vacuolar, que transporta Na^+ del citosol hacia la vacuola donde se acumula, permitiendo un balance osmótico adecuado. Plantas de *Arabidopsis* transformadas que sobreproducen el transportador Na^+/H^+ muestran un crecimiento sostenido en suelos con concentraciones de NaCl de hasta 200 mM. Recientemente (desde el año 2001) se han producido plantas de tomate sobreproductoras del transportador Na^+/H^+ de *Arabidopsis,* las cuales son capaces de crecer, florecer y producir frutos en la presencia de altas concentraciones de sal (200 mM), y además de preservar la calidad del fruto, ya que éstos muestran un contenido bajo de sodio.

En condiciones de estrés abiótico, los mecanismos de tolerancia que permiten el crecimiento de una planta bajo esas condiciones desfavorables, involucran el establecimiento de cambios bioquímicos y celulares, que requieren la participación coordinada de muchos genes. Esta expresión orquestada de genes está controlada por factores de transcripción. La manipulación de los factores de transcripción, que regulan la expresión de genes de tolerancia al estrés abiótico es, por ende, una estrategia muy prometedora para la generación de plantas con mayor tolerancia al frío y a la sequía.

Los suelos ácidos representan un problema en las regiones del mundo con alta precipitación, como los bosques tropicales lluviosos y bosques de coníferas. Se estima que 40% de la superficie arable del mundo presenta este problema (68% de América tropical, 38% de Asia tropical y 27%

de África tropical). El aluminio es el elemento metálico más abundante en el suelo y es tóxico para muchas plantas, en soluciones de baja concentración. De manera natural, algunas plantas presentan estrategias para tolerar las concentraciones tóxicas de aluminio, como la producción y exudación de ácidos orgánicos al suelo (citrato y otros), lo que permite la formación de compuestos quelados que carecen de toxicidad. El uso de un gene bacteriano que codifica para la enzima citrato sintasa, que se encarga de la síntesis de citrato, ha permitido generar plantas transgénicas de tabaco y papaya que producen cinco a seis veces más citrato en las raíces, y muestran tolerancia a concentraciones tóxicas de aluminio, diez veces mayores a las concentraciones toleradas por las plantas originales (6).

La contaminación de suelos con metales pesados producto de diversas actividades industriales cada vez se convierte en un problema ambiental y de salud más importante. Para tratar de resolver este problema, se han propuesto estrategias en las cuales organismos vivos sean utilizados para extraer los metales pesados que contaminan el suelo y así limpiarlo. Estos procesos han sido denominados como biorremediación. Debido a que las plantas producen raíces que penetran hasta capas muy profundas del suelo, el uso de plantas para eliminar la contaminación por metales pesados ha sido propuesta. La fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados es un problema complejo, lo que ha llevado a la búsqueda de estrategias menos costosas y más efectivas. El uso de plantas para remover selectivamente y reciclar los metales del suelo es potencialmente efectivo, como se ha demostrado con plantas transgénicas de *Arabidopsis*, que han sido transformadas con el gene bacteriano *merA* que codifica para la enzima reductasa del ion mercúrico, que permite transformar la forma catiónica del metal a Hg(0) una forma volátil y no tóxica de este elemento (7). Sin embargo, es necesaria una mayor investigación básica y aplicada en este campo con respecto a otros metales tóxicos.

Las plantas como biorreactores

La producción de proteínas heterólogas en plantas tiene varias ventajas, ya que su producción puede ser en semillas, frutos o tubérculos, con la posibilidad de colectarlos y almacenarlos, para ser consumidos directamente o ser procesados para obtener el producto de interés. Otras ventajas son: 1) el costo bajo a una escala agrícola; 2) reducción de los cos-

tos de capitalización con relación al uso de métodos de fermentación; 3) escalamiento relativamente sencillo de la producción; 4) producción de proteínas multiméricas complejas, tales como los anticuerpos, que son perfectamente ensamblados y 5) producción segura de las proteínas, considerando que las plantas no son hospederos naturales de patógenos de humanos (8, 9).

Los productos biofarmacéuticos son la mejor elección para ser producidos en plantas, por el alto costo de utilizar otros sistemas, como las células de mamíferos, para su producción. Algunos ejemplos se mencionan a continuación: 1) el b-interferón se ha producido en plantas de nabo y puede ser potencialmente utilizado en el tratamiento de la hepatitis B y C; 2) la ausencia de la enzima glucocerebrosidasa en el humano produce la enfermedad de Gaucher, un desorden heredado recesivamente, y la enzima ha sido tradicionalmente extraída de las placentas a costos muy altos; la producción de esta enzima en tabaco transgénico apoya fuertemente la viabilidad comercial en el futuro para esta terapia; 3) la hirudina, un anticoagulante para tratar la trombosis se produce actualmente en semillas de canola y se encuentra disponible en forma comercial; 4) la somatotropina, una hormona humana usada en el tratamiento del enanismo de personas, ha sido tradicionalmente producida en bacterias y recientemente su expresión en cloroplastos de tabaco en altos niveles convierte a este organelo como un eficiente vehículo para la producción de proteínas farmacéuticas.

Producción de vacunas orales en plantas transgénicas

Investigaciones recientes han demostrado que los frutos de plantas transgénicas tienen la capacidad de sintetizar y acumular proteínas antigénicas, y por lo tanto, eventualmente podrían ser usadas como vacunas orales contra agentes infecciosos como virus y bacterias. Los objetivos inmediatos son las infecciones gastrointestinales y respiratorias, que representan las principales causas de mortalidad infantil en los países en vías de desarrollo. Muchas enfermedades diarreicas son causadas por bacterias, como *Escherichia coli,* que producen toxinas responsables del cuadro clínico. Los genes de dichas toxinas se han aislado e introducido a plantas de papa lográndose su acumulación en tubérculos. Ratones alimentados con papas transgénicas, produjeron niveles elevados de anticuerpos contra la toxina y manifestaron resistencia a la infección. Los

ensayos en humanos con antígenos producidos en plantas, se encuentran en desarrollo, particularmente con la toxina termolábil de *E. coli,* virus de la hepatitis B y virus de Norwalk; en los tres casos mencionados existen respuestas sistémicas mucosales inmunes, sin efectos adversos demostrados, lo que permitirá en un futuro próximo su uso como vacunas (10).

Producción de plásticos biodegradables y nuevas fibras

Alcaligenes eutrophus y otras especies de bacterias producen polihidroxialcanoatos como fuentes de reserva de carbono, en medios con altas concentraciones de carbono. Estos compuestos tienen propiedades que van desde plásticos quebradizos a materiales parecidos al caucho, y debido a su biodegradabilidad son una fuente atractiva de plásticos y elásticos no contaminantes, para usos especiales. Debido a los altos costos de producción por fermentación bacteriana, se han producido plantas transgénicas de *Arabidopsis,* con tres genes foráneos de bacterias, y esto ha permitido la producción de polihidroxibutirato (PHB) hasta en 14% del peso seco, sin problemas en el crecimiento y la fertilidad, lo que abre la posibilidad de producir PHB en plantas de uso agronómico. La producción de PHB en plantas de algodón se ha logrado con el propósito de modificar las propiedades de las fibras, y aunque las cantidades obtenidas son pequeñas (0.34 % del peso de la fibra), existe un mejoramiento en las propiedades de aislamiento que puede tener aplicaciones en ropa de invierno; estos cambios positivos en las propiedades de las fibras demuestran el potencial de esta tecnología.

Uso comercial de plantas transgénicas

El primer producto transgénico liberado para consumo fue el tomate Flavr savr® de maduración retardada, en el año 1994 por parte de la compañía Calgene. En este caso no existe ningún componente adicional en la planta ya que solamente se inhibe la expresión del gene nativo mediante una estrategia de antisentido; no obstante la información en los medios de comunicación se manejó en el sentido de que las personas podrían tener problemas por su consumo. Este tomate se vendió durante el año 1995 en los EEUU, pero posteriormente se retiró del mercado debido a sus problemas de cultivo, por ser una cepa susceptible al ataque

de patógenos. Un tomate similar se lanzó al mercado por la empresa Zeneca en 1995 con propiedades nutritivas iguales al tomate convencional y sin problemas alergénicos y se vende actualmente como puré de tomate con un etiquetado que menciona su procedencia transgénica, y ha tenido un verdadero éxito entre los consumidores debido al mejor sabor por la utilización de temperaturas de procesamiento más bajas. Una situación similar se ha dado con la soya (Roundup) con tolerancia a un herbicida de rápida descomposición en el suelo, liberada para su consumo en 1996 y rechazada inicialmente por algunos países de la Unión Europea como Dinamarca, pero aceptada en la mayoría de los países considerando que no existen diferencias desde el punto de vista nutritivo con respecto a la soya producida de manera convencional. Esto demuestra que los consumidores no están en contra del empleo de la tecnología moderna si ellos pueden ver las ventajas y beneficios de la misma.

El área global de cultivos transgénicos comercializados se ha incrementado gradualmente: en 1996 se cultivaban 1.7 millones de hectáreas, 11 en 1997, 27.8 en 1998, 39.9 en 1999, 44.2 en 2000 y 52.6 en 2001, lo que representa un incremento de más de treinta veces en cinco años. Los países industrializados tienen las tres cuartas partes de la superficie cultivada con plantas transgénicas, principalmente EEUU (68%) y Canadá (6%) mientras que los países en desarrollo tienen una cuarta parte, destacando Argentina (22%) y China (3%). Por lo que respecta al número de países, en 1996 sólo seis aceptaban el cultivo de plantas transgénicas, y se ha incrementado a trece en 2001 (EEUU, Argentina, Canadá, China, Sudáfrica, Australia, Rumania, México, Bulgaria, España, Alemania, Francia, Uruguay e Indonesia). Las plantas transgénicas más cultivadas de acuerdo con reportes del año 2001 son la soya (63%), maíz (19%), algodón (13%), y canola (5%); en menor proporción se encuentran la papa, calabacita y papaya, con menos de 1% cada una de ellas. Los fenotipos de las plantas transgénicas que más se cultivan son la tolerancia a herbicidas (77%), resistencia a insectos (15%), combinación de tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos (8%), resistencia a virus y otros (menos 1%). Las superficies cultivables de plantas transgénicas con respecto a no transgénicas para algunos cultivos fueron en el año 2001: 46% de soya, 20% de algodón, 11% de canola y 7% de maíz; el área global de estos cuatro cultivos (transgénicos y convencionales) es de 271 millones de has., por lo que los cultivos transgénicos representan el 19% (una revisión completa sobre estos datos se encuentra en 11).

A principios de los años 90's la mayoría de los agricultores estaban escépticos respecto a los cultivos transgénicos y esto continúa en los países en desarrollo. No obstante, el hecho de que los agricultores de algunos países industrializados y en desarrollo hayan tomado la decisión de incrementar sus áreas de cultivos transgénicos hasta en treinta veces, habla del nivel de confianza que los agricultores han puesto en los cultivos transgénicos, que pueden hacer una contribución vital a la alimentación global.

La transferencia de la tecnología de plantas transgénicas a los países en desarrollo tiene aspectos económicos, políticos y sociales, no obstante que desde el punto de vista técnico los problemas son menores. La creación de centros de investigación agrícola en países en desarrollo (Filipinas, México, Colombia, Nigeria, India, Perú, Siria, Taiwán y Costa de Marfil) y la participación de organizaciones internacionales tales como la FAO, representan las etapas iniciales en la transferencia y el desarrollo local de esta tecnología.

Algunos aspectos de la bioseguridad relacionados con la siembra y consumo de productos transgénicos

Como siempre sucede, el surgimiento de nuevas tecnologías despierta inquietud, tanto entre la comunidad científica, como entre el público en general, y el uso generalizado de los productos de la ingeniería genética no podría ser la excepción. Un ejemplo lo tenemos en las campañas que grupos ambientalistas han realizado en contra de los productos de la biotecnología, por lo que la Unión Europea determinó que a partir del 31 de julio de 1997 queda prohibida la entrada a sus países de plantas transgénicas generadas en otros países, aunque parecería que existe un componente económico en esta decisión (12).

Un claro ejemplo del compromiso mundial de atender la problemática de la bioseguridad con respecto a las plantas transgénicas y otros organismos es el proceso de negociación de un protocolo sobre bioseguridad para el movimiento trans-fronterizo de organismos genéticamente modificados (OGM) en el marco del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Este proceso inició en 1994 y las dos primeras rondas de negociación tuvieron lugar en Montreal, Canadá (1998) y Cartagena, Colombia (1999).

Un análisis de los posibles riesgos y beneficios debe hacerse considerando el cultivo de plantas transgénicas y las plantas no transgénicas para

valorar y ponderar si los posibles riesgos ecológicos son mayores, menores o iguales. R. S. Hails (12), hace un análisis del debate que existe actualmente entre los defensores y detractores de las plantas transgénicas y sugiere que el mejor árbitro en la toma de decisiones debe ser el análisis científico a través de ensayos de campo, donde se analicen las diversas variables ecológicas que pueden ser alteradas. En principio, el análisis de los beneficios y riesgos de las plantas transgénicas debe considerar el fenotipo que se está modificando en la planta, ya que cada uno de los casos debe tratarse de manera diferente.

Las primeras pruebas en campo con cultivos transgénicos de tabaco se realizaron hace ya más de diez años en 1986, en Francia y Estados Unidos; a la fecha estas pruebas han sido numerosas y suman varios miles, principalmente en maíz, canola, papa, tomate, soya, algodón, tabaco, melón y pepino.

Otra inquietud se refiere a que los genes de resistencia a antibióticos, que se utilizan como marcadores de selección en el proceso de producción de plantas transgénicas, pudieran pasar a los microorganismos que habitan el tracto digestivo del ser humano y generarse agentes patógenos resistentes a dichos antibióticos. Particularmente este temor es infundado, ya que varios estudios realizados para evaluar esta posibilidad mostraron que o no ocurre, o sucede con una frecuencia extremadamente baja. En comparación, ha sido muy bien documentado que el intercambio genético entre muy diversas bacterias es muy común y la transferencia de genes de resistencia a antibióticos es muy frecuente, por lo que en todo caso, existe un riesgo mayor en el uso generalizado e indiscriminado de antibióticos que se utilizan en los hospitales, ya que esto permite la selección de bacterias patógenas portadoras de genes de resistencia a muchos antibióticos.

Más extrema aún ha sido la preocupación que han exteriorizado algunos grupos sobre la posibilidad de que el consumo de genes sea dañino a la salud o que los genes de plantas transgénicas pudieran incorporarse a las células del ser humano y causar cáncer. No hay evidencia alguna de que esto pudiera suceder y si así lo fuese, debe aclararse que las plantas normales contienen decenas de miles de genes y que si el DNA de las plantas causara daños a la salud o se pudiese incorporar en los cromosomas del ser humano, esto vendría sucediendo desde que el hombre apareció en la Tierra.

La posible generación de alergias por alimentos transgénicos también ha sido mencionada como un problema potencial para el consumo de

productos derivados de esta nueva tecnología. Aquí cabe mencionar que la gran mayoría de los productos que de manera natural causan alergias son de origen vegetal, primordialmente proteínas, y que ya se cuenta con mucha información sobre las características que hacen una proteína potencialmente alergénica. De tal modo que la introducción de genes en plantas que codifican proteínas que ya se sabe que no causan reacciones alérgicas, no debe causar preocupación. Para aquellas proteínas de las que no se tiene información, se debe hacer una evaluación previa a su aprobación para consumo humano ya que se cuentan con ensayos que permiten determinar si son potencialmente alergénicas. En este respecto, vale la pena mencionar que las plantas transgénicas representan una herramienta poderosa para eliminar componentes alergénicos de productos, tales como el cacahuate, que anualmente causan la muerte de algunas personas al ser consumidos por personas susceptibles. Recientemente se ha reportado que usando técnicas de ingeniería genética se ha tenido éxito en eliminar la proteína que constituye el principal alergeno en el frijol de soya.

Otro aspecto que se ha debatido es si la introducción de genes en los cromosomas de plantas puede causar efectos inesperados que puedan ser nocivos a la salud humana o los ecosistemas. Estos efectos inesperados o también llamados pleiotrópicos podrían generarse por dos factores principales: 1) que los genes introducidos de alguna manera afecten la expresión de genes de las plantas ubicados en regiones cercanas a donde ocurrió su inserción (por ejemplo que regiones reguladoras de la transcripción de los genes introducidos afecte la expresión de genes vecinos) y 2) que la proteína producida por algún gene introducido tenga funciones inesperadas que puedan alterar el desarrollo o composición química de la planta.

Si bien es importante considerar que estas posibilidades ciertamente pueden ocurrir, se debe analizar si estos fenómenos pueden presentarse de manera frecuente y si ocurren de manera natural en las plantas. En este contexto se debe mencionar que en la mayoría de las plantas y probablemente en todas existen elementos móviles llamados transposones que brincan de manera natural de una posición en el cromosoma a otra y aún a otros cromosomas. Estos transposones contienen elementos reguladores de la transcripción que se ha demostrado que alteran de manera positiva o negativa la expresión de genes ubicados en la inmediata vecindad de la nueva ubicación del transposón. Estudios recientes indican que los efectos de los elementos regulatorios de la transcripción

de un gene sobre la expresión de otros está limitada a distancias muy cercanas, debido a que existen de manera natural barreras o bordes naturales que flanquean a cada unidad transcripcional para precisamente evitar que genes vecinos sujetos a diferentes tipos de regulación o patrón de expresión tejido específica se afecten unos a otros. Por lo tanto sería relativamente fácil determinar si la inserción de genes en plantas transgénicas afecta la expresión de los dos genes ubicados a ambos lados del sitio donde se integró el segmento de DNA introducido. Es importante también considerar que muy probablemente este tipo de alteraciones en la expresión de genes ocurre con frecuencia en la mayoría de los genomas vegetales, cuando un transposón se mueve a una localización cromosómica distinta, y que hasta la fecha esto no ha causado alarma, ni se ha demostrado que cause problemas de salud o al medio ambiente. Finalmente se podría proponer que los genes a introducirse a variedades transgénicas fueran modificados de tal manera que quedaran localizados en medio de dos secuencias barrera para evitar que alteraran la expresión de genes aledaños al sitio de inserción.

La posibilidad de que la proteína codificada por un gene introducido en plantas transgénicas tenga una función adicional a la esperada es ciertamente real. Existe evidencia creciente de que muchas proteínas tienen funciones totalmente distintas a las que se les conocía, por lo que es necesario realizar un análisis profundo de las plantas transgénicas que se pretende liberar al medio ambiente y ser consumidas por humanos. Sin embargo, es necesario señalar que, con el creciente conocimiento de las funciones de los genes de plantas derivados de la caracterización de los genomas de las mismas, la mayoría de las variedades transgénicas que se producirán en el futuro serán derivadas del uso de genes de origen vegetal y muy probablemente del uso de genes de la misma planta, por lo que los riesgos potenciales derivados de funciones no conocidas de genes incorporados a variedades transgénicas sería equivalente a lo que sucede de manera natural cuando se generan nuevas variedades de plantas por mejoramiento genético convencional.

Una nueva preocupación externada por quienes consideran que la tecnología de transgénesis no debe ser usada en la agricultura es el riesgo potencial de que genes de plantas transgénicas sean transferidos a variedades criollas o especies silvestres y que esto pueda poner en peligro su viabilidad biológica o su integridad genética. Como muchos de los aspectos que se han comentado sobre bioseguridad, esta preocupación debe ser considerada seriamente y analizada con base en el conocimien-

to científico. Para este análisis debe tomarse en cuenta que genes de variedades comerciales e híbridos han sido transferidos a variedades criollas o especies silvestres desde hace muchas décadas y que la permanencia de dichos genes depende de muchos factores, pero primordialmente de que la planta receptora tenga una ventaja competitiva que le permita reproducirse y transmitir dichos genes más eficientemente que las originales. Es difícil imaginar que un solo gene pudiera tener un efecto catastrófico en la supervivencia de una especie vegetal o que la alterara de tal manera que la convirtiera en una supermaleza o una especie capaz de extinguir a otros organismos, ya que las interacciones en los sistemas biológicos son muy complejas y dinámicas, y la competitividad de una planta depende de muchos genes. En este sentido es mucho más peligrosa la introducción de organismos exóticos en un ecosistema donde no existen depredadores u otros factores que limiten su multiplicación.

Es importante comentar que mucho se ha discutido sobre los aspectos éticos de la producción y uso de las plantas transgénicas, y su posible efecto en la biodiversidad. Aunque este debate está lejos de terminar y de que se tenga un consenso sobre si es ético o no usar esta manipulación artificial del genoma de las plantas para crear satisfactores, hay varios aspectos que deben mencionarse:

- El ser humano lleva cerca de 10 000 años manipulando el genoma de plantas y animales, tanto para la producción de alimentos como por motivos de recreación.
- El genoma de todos los organismos es altamente dinámico y el intercambio de genes entre diferentes especies ocurre de manera natural. Tal vez en este aspecto, el ejemplo más dramático sea el mismo origen de las plantas; los organismos fotosintéticos superiores tuvieron su origen en la evolución mediante un proceso de endosimbiosis entre una bacteria fotosintética y una célula eucarióntica, que significó la transferencia masiva de genes de origen bacteriano al genoma de la célula eucarióntica.
- La agricultura es probablemente la actividad humana más altamente nociva para la biodiversidad, ya que representa el reemplazo de la gran mayoría de la biodiversidad nativa por una o pocas especies cultivadas y el uso de compuestos químicos como son los fertilizantes, pesticidas y herbicidas, que contaminan el medio ambiente, ha tenido efectos muy nocivos que hay que reducir.

Teniendo en cuenta éstos y otros factores se debe determinar si el uso de plantas transgénicas puede ayudar a establecer una agricultura menos dañina al medio ambiente y la biodiversidad, así como hacer un análisis sobre el balance costo-beneficio que representaría el uso de plantas transgénicas. Para hacer esto es importante que se tomen en cuenta tanto los beneficios económicos potenciales del uso de esta tecnología en cada país, así como sus posibles repercusiones tanto sociales como culturales.

Por lo que respecta a los alimentos derivados de plantas transgénicas, se utiliza como criterio para su consumo lo sugerido por la FAO y OMS, y que se refiere a la equivalencia sustancial por lo que se comparan las propiedades del alimento transgénico con respecto al no transgénico, y cuando no existen diferencias en sus propiedades nutritivas y alergénicas se sugiere la aprobación del alimento transgénico para el consumo. En México la Secretaría de Salud es la encargada de la aprobación del consumo y comercialización de alimentos transgénicos y hasta el año 2000 se habían autorizado los siguientes: jitomate *(Lycopersicum esculentum)* de maduración retardada, papa *(Solanum tuberosum)* resistente a la catarinita de la papa, canola *(Brassica napus)* resistente al herbicida glifosato, soya *(Glycine max L)* resistente al herbicida glifosato, canola *(Brassica napus)* resistente al herbicida glufosinato de amonio.

Perspectivas y conclusiones

La generación de plantas transgénicas ha dependido principalmente de dos factores, el desarrollo de métodos de transformación de plantas cultivadas y el conocimiento de nuevos genes y su función. Actualmente existen protocolos de transformación para cereales, leguminosas, pastos y plantas ornamentales y medicinales.

El conocimiento de los genes de plantas y su función se ha llevado a cabo mediante mutaciones que afectan diferentes procesos, tales como la fotosíntesis, respuesta a luz, desarrollo de flores y semillas; esta estrategia ha permitido disectar procesos importantes de las plantas. Aunado al trabajo anterior se suman los proyectos conocidos como genómicos, que consisten en una primera etapa en secuenciar el genoma completo de algunas plantas y posteriormente analizar la expresión de miles de genes a la vez (utilizando la tecnología de microarreglos), en condiciones ambientales y fisiológicas particulares, como estrés ambiental, desarrollo de la semilla, etc. Se cuenta actualmente con la secuencia com-

pleta de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y del arroz, con conclusiones interesantes que serán aplicadas a muchas especies de interés agrícola. Basándose en este nuevo conocimiento será posible el diseño de plantas transgénicas usando primordialmente genes de origen vegetal, particularmente genes de la misma especie, que tengan una mayor productividad, mayor calidad alimentaria o que toleren mejor factores ambientales adversos como son la salinidad y la sequía. Estas nuevas generaciones de variedades trangénicas, por contener genes de origen vegetal deberían tener una mucho mayor aceptación por aquellos grupos preocupados en la transferencia de genes de microorganismos a plantas.

Finalmente, conviene puntualizar que la ingeniería genética de plantas es una realidad, pero es todavía un área en experimentación cuyas expectativas de aplicación han despertado un enorme interés en el ámbito mundial. Asimismo, si bien aún no se demuestra plenamente lo contrario, no hay bases sólidas para asegurar que sus productos sean peligrosos. Por lo tanto, los llamados de alarma deben ser escuchados con prudencia, pues resulta evidente que los productos transgénicos solamente serán utilizados masivamente cuando hayan satisfecho rigurosas pruebas que garanticen que su liberación no representa riesgos, ni para la salud, ni para el ambiente.

Bibliografía

1. Herrera-Estrella, L., Depicker, A., Van Montagu, M., Schell, J. 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti- plasmid-derived vector. *Nature* 303:209-213.
2. Sanford, J.C. 1988. The biolistic process. *Trends in Biotechnology* 6:299-302
3. Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287:303-305.
4. Estruch, J.J., Carozzi, N.B., Desai, N., Duck, N.B., Warren, G.W., Koziel, M. 1997. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nature Biotechnology* 15:137-141.
5. Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D., Hanson, A.D. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 2:128-134.
6. De la Fuente, J.M., Ramírez-Rodríguez, B., Cabrera-Ponce, J.L., Herrera-Estrella, L. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276:1566-1568.

7. Chaney, R.L., Malik, M., Li, Y.M., Brown, S.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Baker, A.J. 1997. Phytoremediation of soil metals. *Current Opinion in Biotechnology* 8:279-284.
8. Larrick, J.W., Thomas. D.W. 2001. Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418.
9. Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., Carter, A. 2000. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* 18:1151-1155.
10. Walmsley, A.M., Rnatzen, Ch.J. 2000. Plants for delivery of edible vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 11:126-129.
11. James, C. Global review of commercialized transgenic crops. ISAAA Briefs.
12. Hails, R.S. 2000. Genetically modified plants-the debate continues. *Trends in Environmental Ecology* 15:14-18.

Capítulo VII

INGENIERÍA DE PROTEÍNAS Y EVOLUCIÓN DIRIGIDA

X. Soberón Mainero
G.M. Montero Morán

Las proteínas como herramientas moleculares

A partir del concepto básico que establece la correspondencia entre un gene y una proteína específica, se pudo anticipar que las primeras aplicaciones, conceptual y metodológicamente más simples de la ingeniería genética consistirían en la expresión de proteínas heterólogas (es decir, codificadas por genes provenientes de organismos distintos) en células bacterianas. En los albores de la ingeniería genética, el paso de obtener un gene cuyo producto fuera interesante representaba un reto en sí mismo, pero hoy en día esta situación ha cambiado radicalmente. Por otra parte, el simple hecho de contar con un gene y la capacidad de introducirlo a una célula capaz de expresarlo, no implica que se disponga de un sistema de producción eficiente de la proteína respectiva, ya que existe una multitud de variables que pueden afectar los niveles de expresión de una proteína dada. De cualquier manera como se ha señalado en capítulos anteriores, la clonación y expresión de la mayoría de los genes específicos, de cualquier origen, natural o sintético, es una operación razonablemente rutinaria con las herramientas disponibles hoy en día.

Las proteínas no son solamente el producto primario de los genes, sino que son moléculas que intervienen de manera directa en la realización de la mayoría de las reacciones biológicas. Las proteínas pueden tener funciones estructurales, de síntesis y degradación de compuestos (enzimas), señalización (hormonas, proteínas de superficie), defensa (anticuerpos), realización de trabajo mecánico, etc. En este sentido, la capacidad de estudiar proteínas expresadas de manera controlada en sistemas manipulados a través de DNA recombinante ha constituido, desde hace cerca de 30 años, un área efervescente de la investigación biológica

experimental. Por ejemplo, a través de una de las herramientas fundamentales de las metodologías de la ingeniería genética, se tiene la capacidad de modificar de manera precisa la secuencia nucleotídica de los genes, utilizando DNA sintetizado químicamente en el laboratorio. Así, aunque las proteínas han sido estudiadas desde hace mucho tiempo, como productos naturales, la era de la ingeniería genética ha permitido materializar una etapa verdaderamente "experimental" en el estudio de las proteínas. Esto es, ha permitido enfocar este estudio al modificar el nivel básico de identidad en una proteína, que es su secuencia de aminoácidos, en lo que constituye el enfoque denominado "ingeniería de proteínas".

Debe señalarse, como se ha presentado en el capítulo I, que una proteína puede ser definida de manera simple e inequívoca por su estructura primaria, o secuencia de aminoácidos, pero sus propiedades químicas y su función biológica resultan de un nivel de organización que va mas allá de esta secuencia, a través del plegamiento espontáneo en tres dimensiones (estructura terciaria) (figura I.15). El proceso por el que el sistema molecular que constituye una proteína típica, es decir una cadena de cientos de aminoácidos (y, por lo tanto, miles de átomos), se pliega en el espacio es un problema aún no resuelto por la ciencia contemporánea. En este sentido, la capacidad de modificar a voluntad la secuencia de aminoácidos de una proteína no significa que tengamos la capacidad de predecir las implicaciones estructurales y funcionales de dichos cambios.

Más de 25 años después del establecimiento de las técnicas básicas de la ingeniería genética, el estudio fundamental de la relación entre la secuencia, la estructura y la función de las proteínas continúa siendo un campo muy activo de investigación. El concepto de ingeniería de proteínas constituye un enfoque experimental cuya utilidad se manifiesta desde este nivel de generación de conocimiento fundamental. En esencia, un investigador analiza la información de que dispone acerca de una proteína de interés, desde su secuencia de aminoácidos y la secuencia de otras proteínas relacionadas evolutivamente, hasta la función descrita para la misma, las condiciones en que funciona, la estructura tridimensional de la misma, la identidad y posición en la secuencia de los aminoácidos que juegan un papel especialmente importante en la función de la misma. Con esta información se generan hipótesis específicas sobre el papel que puede jugar un cambio de algún aminoácido en la proteína; se introduce el cambio diseñado en el gene que codifica para la proteína

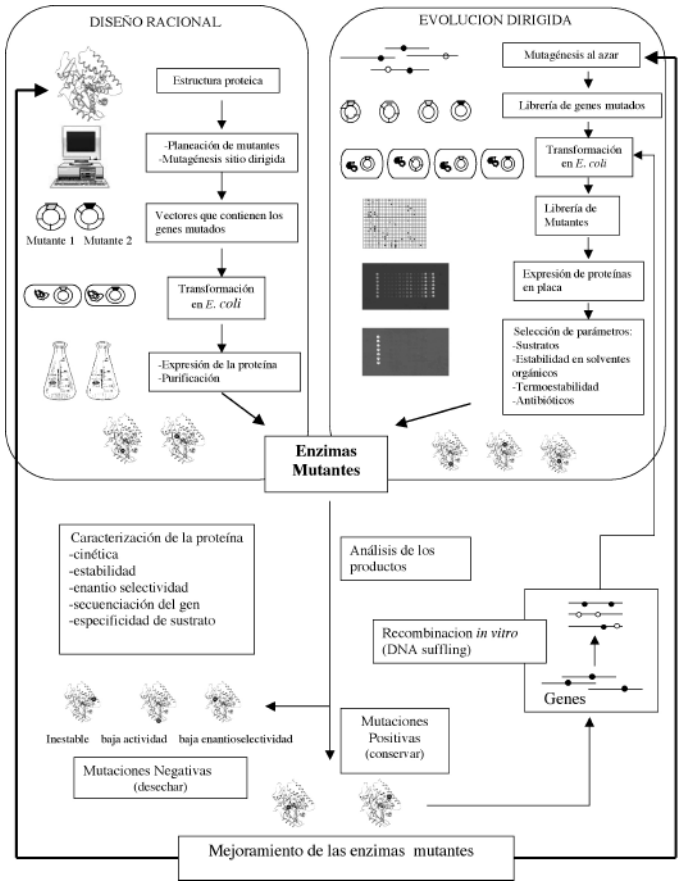


Figura VII.1

COMPARACIÓN ENTRE EL DISEÑO RACIONAL DE PROTEÍNAS Y LA EVOLUCIÓN DIRIGIDA

Durante el diseño racional de proteínas, las mutaciones se planean con base en su estructura y son generadas por mutagénesis sitio dirigida. Después de la transformación en el organismo huésped, la variante es expresada, purificada y analizada para las propiedades deseadas.

La evolución dirigida empieza con la preparación de las librerías de los genes mutantes por mutagénesis al azar, las cuales son, entonces, expresadas en el organismo huésped. Las librerías de proteínas son usualmente evaluadas en placas de microtitulación, usando ciertos parámetros de selección. La caracterización de la proteína y el análisis del producto permite seleccionar las mutaciones deseadas y no deseadas. La recombinación *in vitro* por "DNA shuffling", por ejemplo, puede ser usada para mejorar las propiedades. Los dos enfoques de ingeniería de proteínas pueden ser repetidos y combinados hasta que el biocatalizador con las características deseadas sea generado.

y se analiza su comportamiento en un sistema de expresión (típicamente en células bacterianas). Con base en los resultados obtenidos se generan nuevas hipótesis y se repite el ciclo (figura VII.1).

Traslademos ahora sólo por un momento, nuestro centro de atención de las técnicas básicas de la ingeniería genética para considerar el destino que depara la biotecnología a uno de los grupos de proteínas más importantes del mundo: las enzimas. Para estimar la importancia de estas moléculas es indispensable saber que controlan las innumerables reacciones químicas cotidianas de todos los organismos vivos, desde antes de la concepción hasta después de la muerte. Su papel como catalizadores consiste en acelerar las reacciones químicas, formándose o destruyéndose moléculas en el proceso. Colaboran en la transmisión de los impulsos nerviosos, evitan la pérdida de la sangre que brota de las heridas e incluso regulan la fabricación de la materia básica de la vida: el DNA. Trabajan muy de prisa, tardando menos de una millonésima de segundo en realizar su trabajo. Actualmente, su poderosa actividad biológica se ha aprovechado con fines industriales. Son importantes en las industrias alimenticia y química, a causa de su especificidad, eficiencia y potencia a temperaturas y acidez moderadas. Las enzimas se extraen tradicionalmente de plantas y animales, pero su producción a partir de bacterias, levaduras y hongos está aumentando rápidamente a medida que se dispone de más organismos de este tipo y que la ingeniería genética mejora los rendimientos y procesos.

Si consideramos el ámbito aplicado de la ingeniería de proteínas, el esquema planteado se implementa tomando en cuenta objetivos funcionales específicos, que confieren una mayor utilidad a la proteína o enzima en cuestión, con la finalidad de mejorar el producto o proceso biotecnológico en el que interviene. En lo que resta de este capítulo se hará una descripción de los retos, las limitaciones, los enfoques y el potencial de la ingeniería de proteínas en el ámbito aplicativo.

Biocatálisis y biotecnología moderna

Como se ha señalado, ya avanzada la segunda mitad del siglo XX, la biotecnología se encontraba asociada a una industria productora de bienes y servicios basada en el uso de microorganismos o partes de ellos, relacionada fundamentalmente con las industrias farmacéutica y alimenticia, y sólo en menor grado con las industrias química y del medio

ambiente. Esto es lo que podríamos denominar como biotecnología "tradicional o clásica" que ha permitido a la humanidad hacer vino o cerveza, producir queso o yogur, a partir de leche, fabricar pan o conservar carnes, así como producir antibióticos o ácidos orgánicos. Conforme surge el conocimiento científico se perfeccionaron estos procesos y se incluyeron otros como la mejora genética de animales y plantas.

La industria química, todavía cimentada en las reservas petroleras del planeta, ha visto en la biotecnología apenas una alternativa futura para la producción de materias primas, obtención de energéticos y el desarrollo de procesos más limpios para hacer frente al problema de la degradación del medio ambiente y de la destrucción de la biodiversidad.

Pero es claro que existe una tendencia hacia el desarrollo de una bioindustria sustentada en la capacidad de transformación, mediante células vegetales, animales o microbianas, actuando tanto en reactores industriales como en el campo y la granja. Como consecuencia de esta integración, la industria irá sustituyendo paulatinamente los combustibles fósiles por renovables, provistos por la propia industria biotecnológica. También cabe destacar que a este campo tecnológico lo caracteriza una necesidad moderada de inversión, la existencia actual de recursos humanos capacitados, y la ventaja natural para aquellos países que, como México, cuentan con regiones de diversas características climáticas y sobre todo con una gran riqueza de recursos genéticos debido a su biodiversidad.

Ahora bien, como se ha señalado en capítulos previos, la biotecnología moderna está basada en los avances científicos que se iniciaron en la década de los setenta, especialmente en biología molecular, que han permitido aislar y modificar información genética de los organismos, mediante las técnicas de DNA recombinante. Así, los alcances de la nueva biología permiten visualizar un nuevo concepto de industria y un nuevo concepto de la actividad industrial con el que sin duda culminaremos el siglo XXI. Se trata de una industria que, abarcando todas las esferas de la actividad económica, estará caracterizada por el conocimiento profundo y la capacidad de modificación y de la reingeniería misma de la célula viva, la cual tenderá a transformar a la industria química basada en el petróleo y las transformaciones químicas, a una industria bioquímica, basada en las biomasas, en las transformaciones biológicas y en la biocatálisis (procesos que utilizan enzimas para acelerar las reacciones químicas).

Toda esta nueva generación de conocimiento permite definir a la biotecnología moderna tal y como ha sido previamente señalado como "la utilización de organismos vivos, o parte de los mismos, para obtener

o modificar productos, mejorar animales o plantas, o desarrollar microorganismos para objetivos específicos". En este concepto se incluyen la biotecnología tradicional y la moderna. En la moderna se incluye el uso industrial de las técnicas de DNA recombinante, la producción de anticuerpos monoclonales, los bioprocesos, la ingeniería de proteínas y el uso de enzimas. Este último concepto, que consiste en el uso de enzimas en los procesos de la industria química, es el objeto primordial de este capítulo.

Retos a resolver. Mitos y realidades

La mencionada convergencia entre la maduración de tecnologías establecidas y la aparición reciente de tecnologías habilitadoras potenciará fuertemente el desarrollo de la biotecnología en el campo industrial. Adicionalmente, la batería de herramientas contribuida por el DNA recombinante ha hecho posible el tránsito hacia el conocimiento de los genomas completos de microorganismos, plantas y animales. Como consecuencia, el número de especies y procesos en los que es viable pensar en aplicaciones biotecnológicas crece constantemente.

En este contexto general, se observa un despegue importante del ámbito industrial como una tercera fase de aplicaciones de la biotecnología, debido a la inserción del potencial de la biocatálisis y las tecnologías habilitadoras que impactan su desarrollo.

En la actualidad, a pesar de representar una proporción muy pequeña de la actividad industrial, ya se emplean las enzimas en un buen número de procesos (tabla VII.1).

Cabe preguntarse en este punto: ¿por qué es hasta ahora que se espera un impacto importante de las tecnologías biológicas en la industria química en general? Parecería obvio que en muchos procesos químicos industriales, la tecnología biológica ofrecería una alternativa limpia y eficiente. Después de todo, una observación superficial de la materia viva que nos rodea muestra elocuentemente su enorme capacidad de síntesis de toda una diversidad de compuestos químicos. Hasta la más simple bacteria alberga en su interior literalmente miles de compuestos químicos distintos. Vale la pena reparar en que los seres humanos seguimos mostrando un aprecio especial por las materias primas naturales, tales como el algodón, la lana, las pieles y las maderas, aun cuando estamos

por ingresar al tercer milenio. Asimismo, casi la totalidad de los medicamentos que hoy utilizamos y la mayoría de los que se están desarrollando tienen su origen en productos naturales, notablemente de plantas medicinales. Por otra parte, existe un sinnúmero de compuestos sintéticos cuyas propiedades y bajo costo de fabricación los hacen difícilmente sustituibles por productos naturales. Dentro de este juego de fuerzas, aparentemente encontradas, debemos ubicar el potencial de la tecnología biológica en el ámbito de la industria química.

Podemos hacer un recuento esquemático de las ventajas y desventajas de los procesos enzimáticos y de las percepciones que de ellas tienen los actores principales en este campo. En el lado de las ventajas (algunas de las cuales ya se han esbozado arriba) se citan frecuentemente las siguientes (1).

— Se pueden lograr niveles de especificidad muy altos, especialmente útiles cuando se trabaja con materias primas complejas.
— Típicamente operan en condiciones relativamente suaves de temperatura y presión. Las instalaciones y equipos utilizados en los procesos fermentativos y biocatalíticos son independientes del producto particular de que se trate. Como consecuencia, la inversión realizada en estos equipos puede ser, en principio, reutilizable en nuevos procesos conforme surgen demandas y oportunidades.
— En algunos casos, los bioprocesos son la única opción para la síntesis de compuestos complejos. Esto es particularmente cierto para compuestos asimétricos (quirales), cada vez más necesarios en estado puro en el sector farmacéutico y alimentario, por razones regulatorias o nutrimentales.
— Los bioprocesos son inherentemente benignos con el ambiente y de hecho son parte integral de los ciclos de asimilación de la materia orgánica en el planeta.

En el lado de las desventajas, podemos contar las siguientes (algunas de las cuales tienen que ver más con la percepción que actualmente se manifiesta en gran parte de la industria química que con desventajas inherentes o insalvables):

— Las enzimas son caras.
— Las enzimas son inestables.

Tabla VII.1
ENZIMAS DE USO INDUSTRIAL Y SUS APLICACIONES
Estas enzimas fueron manipuladas genéticamente para mejorar
o modificar sus propiedades de unión, catálisis o especificidad de sustrato

Industria	*Enzima*	*Aplicación*
Detergentes	Proteasa	Removedor de manchas de proteínas
	Amilasa	Removedor de manchas almidón
	Lipasa	Removedor de manchas de grasas
	Celulasa	Limpiador, clarificación de color
	Mananasa	Removedor de manchas que reaparecen
Almidón y energía	Amilasa	Licuefacción de almidón y sacarificación
	Amiloglucosidasa	Sacarificación
	Pululanasa	Sacarificación
	Glucosa isomerasa	Convierte la glucosa en fructuosa
	Ciclodextrina-glucosil transferasa	Produce ciclodextrina
	Xilanasa	Reducción de viscosidad
	Proteasa	Proteasa
Comida	Proteasa	Sabor, textura de la leche, fórmulas infantiles
	Lipasa	Saborizante de quesos
	Lactasa	Eliminación de la lactosa
	Pectinmetil esterasa	Mejoramiento de productos frutales
	Pectinasa	Productos frutales
	Transglutaminasa	Modificación de propiedades visco-elasticidad
Panadería	Amilasa	Textura del pan y volumen y ajuste de harina
	Xilanasa	Acondicionamiento de la masa
	Lipasa	Emulsificador, estabilidad de la masa
	Fosfolipasa	Emulsificador, estabilizador de la masa
	Glucosa oxidasa	Fortalecimiento de la masa
	Lipo-oxigenasa	Blancura de la masa y fortalecimiento
	Proteasa	Galletas y bisquets
	Transglutaminasa	Dureza de la masa laminada

Alimento de animales	Fitasa	Degradación del fitato
	Xilanasa	Digestión
	Beta-glucanasa	Digestión
Bebidas	Pectinasa	Eliminación de pectina, trituración
	Amilasa	Tratamiento de jugos y cerveza de bajas calorías
	Beta-glucanasa	Trituración
	Acetolactato descarboxilasa	Maduración de la cerveza
	Lacasa	Clarificación de jugos, saborizante de cerveza, tratamiento del corcho
Textil	Celulasa	Textura de algodón, terminado de la mezclilla
	Amilasa	Aprestamiento, reductor del tamaño
	Pectato liasa	Limpieza
	Catalasa	Tratamiento de blanqueado
	Lacasa	Blanqueado
	Peroxidasa	Remoción de exceso de tinta
Papelera	Lipasa	Control de resinas y contaminantes
	Proteasa	Remoción de biopelícula
	Amilasa	Desteñimiento del color
	Xilanasa	Aumento en el blancura
	Celulasa	Modificación de fibras, desteñimiento
Grasas y aceites	Lipasa	Transesterificación
	Fosfolipasa	Producción de liso lecitinas, desespesamiento
Síntesis orgánica	Lipasa	Resolución de alcoholes quirales y amidas
	Acilasa	Síntesis de penicilina semisintética
	Nitrilasa	Síntesis de ácidos carboxílicos enantiopuros
Curtido de cuero	Proteasa	Eliminación de residuos
	Lipasa	Desencurtido
Cuidado personal	Amiloglucocidasa	Antimicrobiano (combinado con glucosa oxidasa)
	Glucosa oxidasa	Antimicrobiano y blanqueador
	Peroxidasa	Antimicrobiano

— Su productividad es baja.
— Las reacciones redox requieren cofactores difíciles de reciclar.
— Las enzimas no catalizan reacciones interesantes para la industria.

Desde nuestro punto de vista, más que hablar de desventajas podríamos enfocarnos en los retos a vencer para la utilización más generalizada de las enzimas y los elementos tecnológicos que pueden ir contribuyendo a resolverlos.

Hasta épocas recientes la disponibilidad de enzimas había sido bastante limitada. Sin embargo, en los últimos veinte años, esta situación está siendo rápidamente revertida por las dos manifestaciones de las técnicas del DNA recombinante mencionadas anteriormente. Por una parte, la posibilidad de clonar los genes e introducirlos en sistemas que permiten su expresión abundante y controlada ha permitido ir dejando atrás la limitación de materia prima inherente a los sistemas naturales (por ejemplo, cuando la fuente de la enzima útil era un tejido poco abundante de una especie rara). Por otra parte, el desarrollo de los proyectos genómicos, aunado a la capacidad de aislar genes directamente de muestras ambientales como aguas y suelos (sin necesidad de cultivar los microorganismos ahí presentes), ha multiplicado, literalmente por miles, el número de enzimas que pueden potencialmente utilizarse.

Otro obstáculo importante se deriva de la historia natural de los sistemas vivientes. Los atributos de los catalizadores biológicos han sido moldeados por la selección natural. En consecuencia, la función, estabilidad y respuesta a factores ambientales de una enzima están directamente relacionados con su función y ambiente biológicos. De ninguna manera se puede esperar que sean óptimos para funcionar en procesos industriales, con miras a la obtención de productos provenientes de la demanda del mundo moderno. Es entonces evidente que se necesita, virtualmente en todos los casos, modificar las propiedades de las enzimas para adaptarlas, inclusive en grados bastante drásticos para los requisitos de estabilidad, especificidad, etc., planteados en función del proceso industrial en cuestión (figura VII.2) (2). En este ámbito, el impacto del conocimiento científico se ha mostrado de manera más lenta. Como se explicará más adelante, la modalidad de ingeniería de proteínas por evolución dirigida está contribuyendo de manera notable a vencer esta limitación.

Finalmente, es crucial tomar en cuenta que, independientemente de los horizontes de aplicación que se perciben o pronostican desde el sector científico/académico, la asimilación de los mismos por parte de la

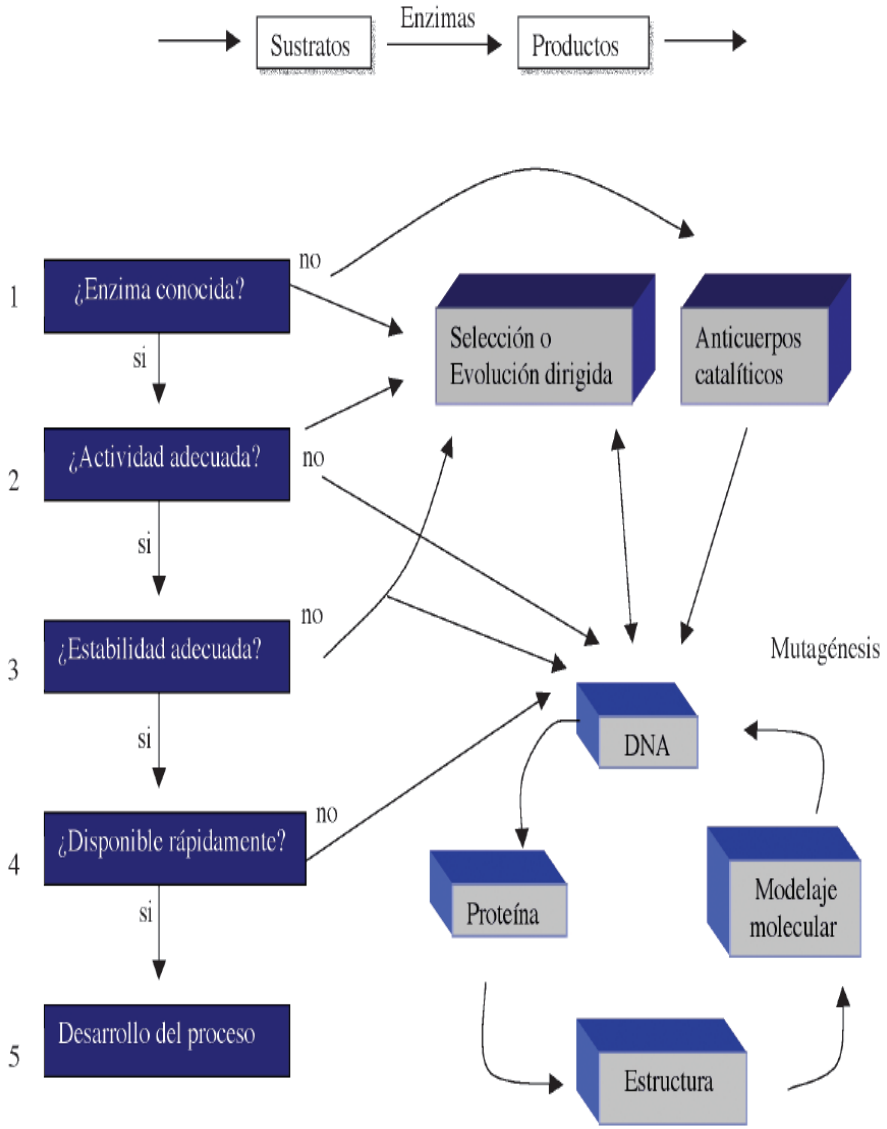


Figura VII.2

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE ENZIMAS DE ALTA EFICIENCIA

Los puntos claves para que la enzima cumpla con los requisitos del desarrollo del proceso son cubiertos por métodos moleculares, entre ellos, mutagénesis al azar y evolución dirigida de proteínas.

industria está dominada por los aspectos comerciales y las fuerzas del mercado. En otras palabras, los procesos comerciales que se vayan planteando tienen que resultar económicamente viables. En este ámbito, vale la pena observar que las empresas productoras de productos químicos han hecho cuantiosas inversiones en sus plantas actuales, mismas que deben ser amortizadas en periodos de tiempo largos. Por ello, cualquier proceso nuevo, biológico o no, que pretenda sustituir a uno ya establecido, se enfrenta no sólo a la necesidad de presentar viabilidad técnica, sino que tiene que remontar a las inercias e inversiones previamente establecidas (figura VII.3).

Enfoques

La ingeniería de proteínas "clásica"

Como ya se mencionó, es factible emitir hipótesis concretas sobre los efectos que se esperan de algún cambio específico y discreto en la secuencia de aminoácidos de una proteína. Es también relativamente sencillo implementar estos cambios, a través de ingeniería genética, de manera que se produzca la proteína alterada y se observe la concordancia entre la predicción y la realidad.

Un prerrequisito para el estudio de la ingeniería de proteínas es que la enzima ya haya sido clonada y expresada (figuras II.15 y IV.2).

La metodología ideal para confirmar el papel de un residuo de aminoácido en particular, previamente identificado por otros métodos (modificación química, predicción, cristalografía, resonancia magnética nuclear [RMN]), ya sea en la estructura o en la función, es la mutagénesis dirigida. Ésta se realiza mediante la técnica conocida como mutagénesis por oligonucleótido, desarrollada inicialmente por Hutchinson y colaboradores y modificada por Kunkel, en la que un oligonucleótido sintético se emplea como mutágeno altamente específico (3). La mutagénesis dirigida consiste en cuatro pasos fundamentales (figura VII.4) (4).

Debe notarse que el enfoque clásico de la ingeniería de proteínas que se muestra en la figura VII.1 se describe como un ciclo, es decir, se destaca que es poco probable que en un solo intento se logre el resultado deseado, debido a que la capacidad predictiva de la que disponemos actualmente es muy limitada.

De cualquier manera, existen un buen número de casos exitosos de mejoras en las propiedades de proteínas útiles valiéndose de este enfoque.

Figura VII.3

ENFOQUE DE BIOPROCESOS

El primer paso en el desarrollo de un proceso es identificar la reacción. Con base en ésta, se define el biocatalizador ideal, se caracteriza y modifica el proceso. Subsecuentemente el biocatalizador es producido, se aplica en el bioproceso y el producto se recupera.

Podemos considerar que hay dos tipos generales de información en las que se basan los diseños empleados en ingeniería de proteínas. Por una parte, se encuentran los que provienen del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas de los sistemas proteicos. Por otra parte, se pueden incorporar en el análisis los datos aportados por las secuencias de aminoácidos de varias proteínas similares a la que es objeto de la experimentación, es decir, inferir posibles alteraciones a partir de las soluciones que la naturaleza ya ha ensayado. Por ejemplo, a partir de conceptos fisicoquímicos, se han logrado estabilizar proteínas implementando puentes disulfuro (enlaces covalentes que fortalecen la estructura tridimensional), puentes salinos o tratando de optimizar el empaquetamiento de los residuos internos. En la proteasa subtilisina se identificó mediante mutagénesis al azar, que la modificación de los residuos de los aminoácidos Lys211 y Arg212 aumentan su termoestabilidad (5,6).

Por otro lado, Liebeton y col. 2000 (7), aumentaron la enantioselectividad de una lipasa de *Pseudomonas aeruginosa,* sugiriendo que el cambio en esta propiedad se debe a un aumento en la flexibilidad de las asas lejanas al sitio de unión del sustrato (8). Otro caso exitoso en la modificación de las propiedades enantioselectivas se realizó en una enzima hidantoinasa, donde la sustitución de un solo residuo de aminoácido de D-metionina a L-metionina fue suficiente para invertir la enantioselectividad de la enzima (9). En la industria de los detergentes se han modificado amilasas para aumentar su actividad a bajas temperaturas y a pH alcaninos sin comprometer su estabilidad. Existen muchos ejemplos de enzimas que son utilizadas a nivel industrial que han sido modificadas; algunos ejemplos de las enzimas más utilizadas en diferentes campos de la industria y sus usos se muestran en la tabla VII.1 (10). Similarmente, se han logrado implementar sitios de ligación a metales en proteínas que originalmente no lo hacían. En cuanto al uso de secuencias similares (información filogenética), hay ejemplos notables en los que secuencias inexistentes en la naturaleza (por ejemplo secuencias consenso) resultan tener propiedades útiles distintas a cualquiera de las proteínas naturales, sin pérdida de la especificidad y actividad catalítica. También ha sido útil el análisis de proteínas homólogas para diseñar cambios de especificidad a cofactores a través de un número pequeño de cambios de ciertos residuos de aminoácidos (11).

Incluso varias enzimas ya han sido manipuladas genéticamente para mejorar la catálisis en los procesos industriales (tabla VII.2). Éstos incluyen proteinasas, celulasas, lipasas, α-amilasas y glucoamilasas. Uno de los

Tabla VII.2
Se muestran algunas de las enzimas más utilizadas a nivel industrial y las características enzimáticas que han sido modificadas por ingeniería de proteínas.

Enzima	*Industria*	*Característica deseada*
Xilanasa	alimentos papel y su pulpa	Estabilidad térmica, actividad a pH ácidos Estabilidad térmica y a pH alcalinos
Glucoamilasa	almidón	Aumento en el pH óptimo
Glucosa isomerasa	fructosa	Especificidad de sustrato Estabilidad a pH ácido Termoestabilidad
Proteinasa	detergentes	Termoestabilidad Estabilidad a pH alcalino Estabilidad oxidativa

mejores ejemplos es una enzima xilanasa, la cual necesita ser estable a altas temperaturas y ser activa a temperaturas y pH fisiológicos cuando es utilizada como un aditivo de alimentos y en condiciones alcalinas cuando es usada en el blanqueo en la industria del papel.

Uno de los organismos en que se produce la enzima xilanasa a nivel industrial es el hongo del género *Trichoderma*. Ésta ha sido purificada y cristalizada. Su estabilidad térmica ha sido incrementada cerca de 2 000 veces a 70 ºC, y su pH óptimo fue desplazado una unidad de pH hacia la alcalinidad por mutagénesis racional. La estrategia consistió en la modificación de una región alfa hélice y del amino terminal.

La inspección de los logros obtenidos hasta ahora nos indica que la capacidad de diseñar verdaderamente cambios útiles, a partir de los conocimientos disponibles, es todavía limitada. Especialmente tomando en cuenta que, con toda certeza, existe un gran número de intentos fallidos que ni siquiera aparecen en la literatura científica. Sin duda, en los próximos años el número de ejemplos exitosos deberá ir aumentando, como resultado del correspondiente aumento en nuestro conocimiento sobre los sistemas proteicos. Es notable que la capacidad de cálculo de los sistemas computacionales siga aumentando de manera geométrica, dando la posibilidad de implementar algoritmos cada vez más demandantes y precisos para la predicción de la relación entre secuencia, estructura y función en las proteínas, sugiriendo un futuro brillante.

La capacidad de comprender los sistemas proteicos al grado de diseñarlos es, claramente, una meta fundamental de gran mérito científico. Pero es claro que los resultados más recientes siguen siendo de interés para quienes desarrollan los métodos y enfoques, sin tener aún un efecto notable en el sector aplicativo, dada la pobre capacidad predictiva. Como se ha señalado, en la figura VII.1, panel izquierdo, se muestra un diagrama del proceso básico de la ingeniería de proteínas, y se le compara con los elementos del enfoque alternativo, llamado evolución dirigida.

Evolución dirigida

En vista del enorme reto que significa el diseño racional de proteínas, basado en el conocimiento estructural y mecánistico, y de lo distante que aún se ve el logro de esta meta en un nivel tecnológicamente útil, ¿qué alternativa queda hoy para avanzar?

En los últimos 10 o 15 años, se ha desarrollado notablemente la experimentación basada en un concepto intuitivamente sencillo, que implica imitar al proceso natural que, para empezar, ha dado origen a las enzimas existentes hoy en día. Es decir, se trata de imitar el proceso evolutivo que ocurre día a día en la naturaleza. Para comprender los enfoques que se han adoptado debe tenerse en cuenta que el proceso natural se ha dado en el transcurso de miles de millones de años, operando sobre cantidades vastas de materia viva. Así, aun cuando desde hace muchos años se han llevado a cabo experimentos de evolución en condiciones de laboratorio, los alcances de estos procedimientos dependen del grado en que el proceso evolutivo se pueda compactar y acelerar. El surgimiento de las técnicas del DNA recombinante estableció las bases para avanzar dramáticamente en esta dirección, en particular cuando el objeto de evolución está en el nivel molecular, como es el caso de las enzimas. La aplicación de los procesos evolutivos para mejorar las características de biomoléculas se ha llamado evolución dirigida (también evolución forzada o, simplemente, evolución *in vitro*).

Se puede decir que la evolución dirigida de proteínas *in vitro* se inició desde el trabajo pionero de Spiegelman en 1967 cuando demostró que se podía reproducir *in vitro* el proceso darwiniano propuesto como hipótesis del origen de la evolución (12). Esta idea, que originalmente nace en un esquema de investigación básica para tratar de entender el origen del proceso evolutivo, fue posteriormente explotada para generar, de manera acelerada, proteínas con propiedades modificadas. El grupo

de Arnold, uno de los pioneros en este campo, demostró que llevando a cabo ciclos iterativos de mutagénesis y selección se podía evolucionar una proteína en cuestión de meses o incluso semanas (6, 13). La evolución dirigida, como área, tiene dos retos por afrontar: el primero es la generación de diversidad y el segundo es la selección de las mutantes. En ambos casos, los procesos implementados en el laboratorio se inspiran en los procesos naturales, pero difieren de ellos en razón de las posibilidades tecnológicas y de la necesidad de lograr la compactación y aceleración referidos anteriormente.

En el proceso natural de evolución, el material genético sufre mutaciones (figura I.13), inherentemente aleatorias, a través de diversos mecanismos. Los más sencillos serían los errores cometidos al replicar el DNA y los causados por las lesiones en esta macromolécula por efecto de agentes físicos (por ejemplo radiación) o químicos (compuestos mutagénicos, como nitritos entre otros muchos).

Existen desde luego otros muchos fenómenos que contribuyen a la generación de diversidad genética, notablemente los procesos de recombinación, que juegan un papel preponderante en la variabilidad observada en la reproducción sexual. En el caso de la evolución *in vitro,* es factible emplear agentes físicos y químicos, pero la principal adaptación que se hace es concentrar la acción de estos agentes en segmentos específicos de DNA, concretamente en genes clonados. En la actualidad, estos métodos han sido virtualmente suplantados por los que se sustentan en la acción de enzimas replicativas de DNA, pero en condiciones en las que la tasa de error se ha logrado aumentar en gran medida (hasta cerca de 1%, comparado con 0.04% en condiciones biológicas típicas). La mayor versatilidad y eficiencia la da la utilización de DNA sintético, que permite la introducción de variabilidad en las secuencias genéticas de manera muy controlada, tanto en la tasa de mutación (que puede llegar a ser de 100%) como en la zona o región del gene de interés a la que se quiere modificar (figura VII.4).

Adicionalmente, en los últimos años se han establecido métodos que permiten incluir el elemento de recombinación, de importancia fundamental en la reproducción sexual, a los procesos de generación de variabilidad *in vitro* (figura VII.5).

El entremezclado de genes o "DNA shuffling", consiste en digerir al azar una colección de genes hasta obtener pequeños fragmentos de DNA de aproximadamente 100 pares de nucleótidos para reconstruir a partir de ellos el gene mediante la técnica de PCR (figura II.12). En esta técnica

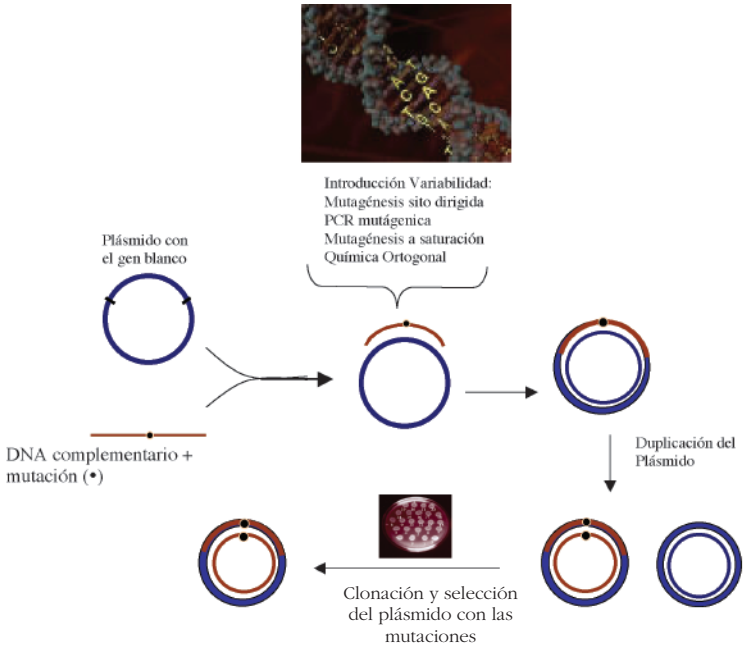


Figura VII.4

REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA TÉCNICA
DE LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

El plásmido con una hebra de DNA del gene que va a ser mutado, es apareado con un fragmento de DNA complementario que contiene la mutación que será incorporada (-•-). Esta mutación puede ser el reemplazo, eliminación o inserción de uno o más nucleótidos; el único requerimiento es que los segmentos complementarios flanqueantes de los oligonucleótidos sean suficientes para permitir que se apareen específicamente al plásmido. En este punto se introduce variabilidad que puede ser desde un cambio sencillo que genera un solo cambio a nivel de codón, o bien, a saturación logrando producir hasta 1 013 variantes. La variabilidad puede crearse con técnicas como: PCR mutagénica, entremezclado de genes (DNA-shuffling), Itchy y química ortogonal. Ésta ultima consiste en un nuevo método de mutagénesis ejecutado a nivel de codón que permite combinar codones silvestres y mutantes a lo largo de la ventana que se quiere modificar, lo cual es imposible con los métodos convencionales de oligonucleótidos degenerados (NNGC), además tiene la ventaja de que no hay redundancia como en el código genético. Por otro lado, los métodos enzimáticos y químicos están limitados a generar principalmente mutaciones puntuales y cada aminoácido silvestre puede cambiar a sólo una fracción de los otros 19 diferentes aminoácidos.

Una segunda cadena de DNA se sintetiza enzimáticamente a partir de la primera cadena, usando el oligonucleótido como iniciador para incorporar la mutación. El plásmido híbrido resultante es utilizado para la transformación de las células y generar DNA de doble cadena. Las moléculas de DNA que contienen la mutación en ambas cadenas pueden ser seleccionadas o identificadas por la secuenciación de su DNA.

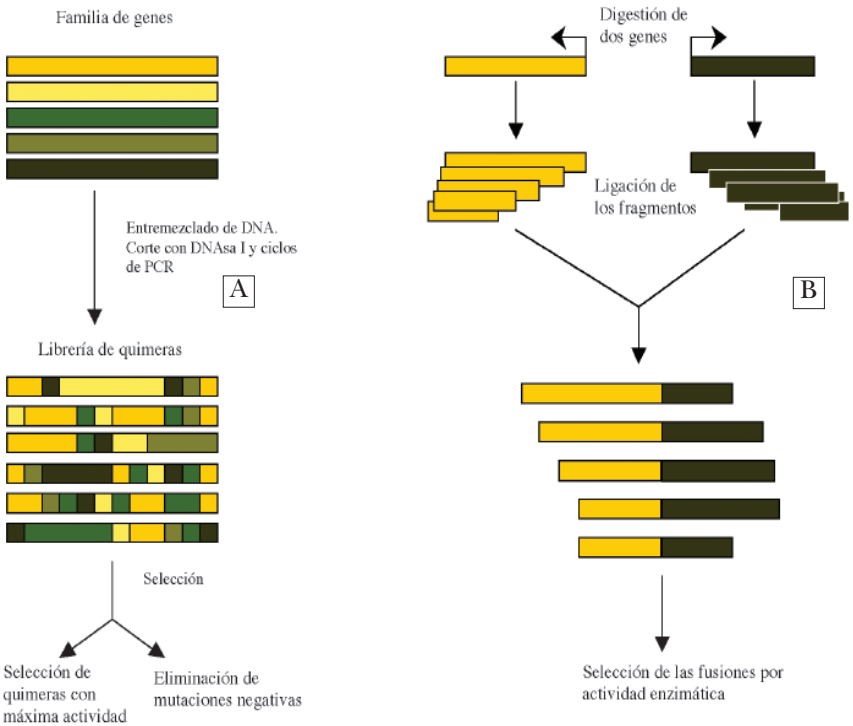


Figura VII.5

RECOMBINACIÓN DE SECUENCIAS DE GENES Y GENERACIÓN DE VARIABILIDAD

Representación esquemática de algunas estrategias *in vitro:* A) "DNA shuffling" o entremezclado de genes para la recombinación de miembros de una familia de genes con secuencias de alta homología. El primer paso de este método consiste en fragmentar con DNAsaI una población de genes relacionados. Los fragmentos de DNA generados de diferentes longitudes se reensamblan, es decir, se unen los extremos 5' de un fragmento con los extremos 3' de otro. Los fragmentos con extremos 5' pueden ser extendidos mediante PCR con la enzima *Taq* DNA polimerasa dejando los fragmentos con extremos 3' intactos. Como una consecuencia de esta extensión, la longitud promedio de cada fragmento se incrementa durante cada ciclo (figura II.15). La recombinación ocurre, entonces, cuando un fragmento derivado de un templado sirve como oligonucleótido iniciador en un templado con una diferente secuencia.

B) Estrategia "ITCHY" para la recombinación de dos genes con poca o ninguna secuencia homóloga. Itchy o método de truncamiento cíclico o repetido se utiliza para la creación de enzimas híbridas. Se basa en la generación de librerías de fragmentos amino o carboxilos terminales de dos genes por eliminación progresiva de las secuencias codificantes por la enzima exonucleasa III seguida por la ligación de los productos para generar una librería híbrida.

de entrelazado de genes, se intercambian fragmentos de genes homólogos generando un camino eficiente para crear proteínas con nuevas características (figura VII.5).

Una variante de este método es el llamado truncamiento por prueba y error para la creación de enzimas híbridas (ITCHY), el cual está basado en la generación de librerías de fragmentos de DNA que codifican para las regiones aminos o carboxilo terminales de dos genes por truncamiento progresivo de las secuencias nucleotídicas codificantes por medio de la acción de la enzima exonucleasa III seguido por ligación de los productos (14, 15).

Por medio de estos sistemas es factible, y relativamente sencillo, generar en un pequeño tubo de ensayo, millones de millones (10^{12}) de genes distintos. El reto fundamental consiste en diseñar el tipo de variabilidad que se quiere explorar, que siempre será una fracción muy pequeña del total de variantes posibles en los sistemas genéticos (baste decir que un gene de tamaño típico consiste en unos 1 000 pares de nucleótidos, y que el número de combinaciones posibles para una secuencia de esta longitud es mayor al número de átomos del universo conocido). Adicionalmente, la variabilidad que hoy día es factible generar con los sistemas *in vitro* no permite aún implementar eficientemente algunos de los esquemas de intercambio de segmentos que han estado presentes en los sistemas naturales.

En lo que se refiere a la selección de las mutantes obtenidas por estas metodologías, ésta opera en la naturaleza a nivel del éxito reproductivo de la población. La mayoría de las mutaciones sencillas son, para estos efectos, ya sea neutrales o perjudiciales. Ocasionalmente aparece alguna modificación con efecto positivo, la cual tiende a prosperar en la población. Los sistemas usados en evolución dirigida pueden ser similares, por ejemplo creando células microbianas que sólo puedan sobrevivir cuando expresan un gene (proveniente de una colección de mutantes), con la característica deseada. Desafortunadamente, esto sería factible solamente en una mínima proporción de los casos para los que se requerirán enzimas con atributos modificados. Por esta razón, en evolución molecular dirigida se recurre no sólo a la selección verdadera, sino también a diversos sistemas de tamizaje, los más eficientes posibles. Evidentemente, si se tuviese que inspeccionar la actividad catalítica de las enzimas variantes una por una, no estaríamos hablando de evolución dirigida, sino de ingeniería de proteínas clásica (y sería totalmente inútil generar 10^{12} variantes). Así, en el ámbito de la selección, se ha tenido que recurrir también

a una buena dosis de imaginación y a la incorporación de los mayores avances tecnológicos para ampliar la gama de reacciones que pueden evaluarse de manera rápida y paralela. Específicamente, se ha recurrido a sistemas de detección muy simplificados basados en el aspecto (color, por ejemplo) de las colonias bacterianas surgidas de una colección numerosa de variantes. En el siguiente nivel, se utilizan sistemas robóticos para implementar las reacciones enzimáticas en formatos de placas (por ejemplo, las utilizadas desde hace tiempo en ensayos para anticuerpos en contextos clínicos). Estos sistemas se han ido perfeccionando y sofisticando, hasta lograr lo que se conoce hoy día como HTS (*High Throughput Screening* o tamizado de alta productividad).

Un importante reto en la evolución dirigida de proteínas es lograr un ensayo de alta productividad en el que se detecten precisamente los atributos deseados, que pueden ser varios simultáneos (por ejemplo estabilidad y especificidad) y de cierta complejidad.

Ámbito de oportunidades

Retomemos la referencia a la diversidad natural de compuestos químicos, mencionada previamente en este capítulo. Es evidente que los seres vivos han logrado fabricar todo tipo de sustancias y materiales con base en procesos biocatalíticos. Paradójicamente, aunque estos productos naturales se cuentan por millones, y cumplen funciones variadísimas, la actividad humana ha requerido la creación de muchas sustancias y materiales nuevos, pues el desarrollo de las sociedades tecnológicas ha ido planteando sus propias necesidades. Evidentemente, muchos de los artefactos usados por la sociedad se basan en productos que no son naturales (notablemente aleaciones de metales y plásticos). De toda la variedad de compuestos que requieren las sociedades modernas, ¿cuáles serán los más susceptibles de ser producidos mediante procesos biológicos? Como se sugiere en la figura VII.6, realmente existe una buena diversidad de aplicaciones para los procesos biológicos. Podemos aproximarnos a la vasta gama de procesos clasificándolos desde el punto de vista del valor del producto y el volumen de su mercado. Los productos farmacéuticos son, usualmente, compuestos cuyos precios son muy altos y de un requerimiento relativamente pequeño. En este campo, es rentable una cuantiosa inversión en investigación y la implementación de procesos complejos de síntesis y purificación. Estas aplicaciones se pueden

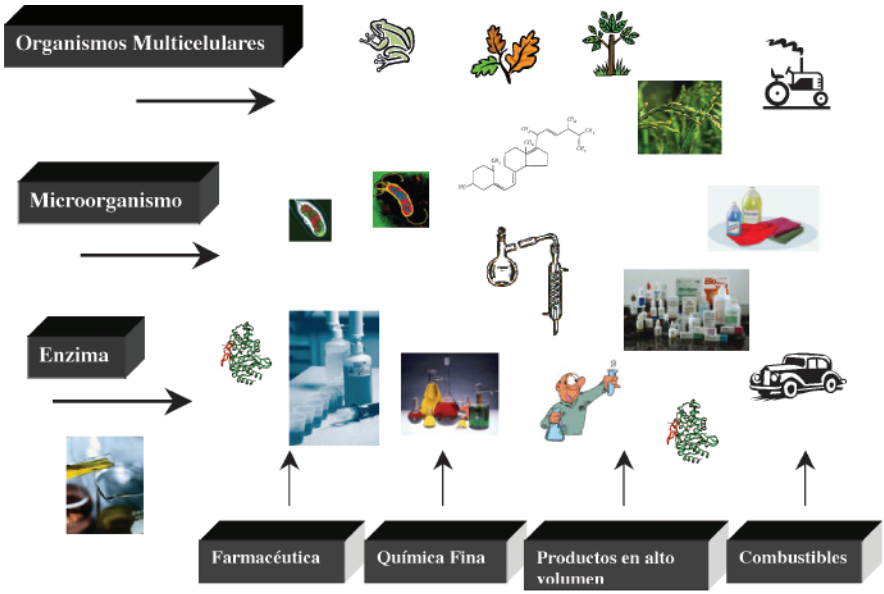


Figura VII.6
LA BIOCATÁLISIS AMPLÍA EL RANGO DEL USO DE ORGANISMOS Y SUS APLICACIONES
Se muestran algunos ejemplos de los diferentes procesos biológicos y sus aplicaciones a nivel industrial.

satisfacer típicamente con componentes biológicos purificados, tales como enzimas aisladas. En un siguiente nivel encontramos los productos de la llamada química fina, es decir productos que se utilizan en cantidades relativamente pequeñas, con precios intermedios. En estos casos, el volumen de producción puede requerir la intervención de procesos más simples, por ejemplo los que utilizan microorganismos completos, ya sea como biocatalizadores, para llevar a cabo una sola reacción, o como "biorreactores", en los que el producto resulta directamente del metabolismo celular. A medida que nos movemos hacia los productos de mayor volumen y menor valor, los llamados "commodities" o productos de alto volumen, se puede requerir la intervención de sistemas mucho más baratos, tales como sistemas agronómicos, en los que la biosíntesis del producto se asocia a procesos tradicionales de gran escala y bajo costo. Existe una continuidad en cuanto al empleo de estos diversos sistemas, dependiendo de la aplicación concreta, y en la actualidad existen ejemplos para cada uno de estos enfoques.

Un escenario ideal podría consistir en que todos los productos químicos y materiales fueran "productos naturales", en cuanto a que surgieran de procesos biológicos limpios. Para acercarse a esta situación, requerimos un manejo cada vez más sofisticado de los organismos vivos tratados como sistemas. Se trata de comprender y modificar los sistemas metabólicos, de manera que el flujo de materia y energía esté adaptado para la producción del insumo requerido. A este enfoque, que utiliza a la ingeniería de vías metabólicas y la ingeniería de proteínas, lo hemos denominado "ingeniería celular" y se describe en el siguiente capítulo.

Es indudable que la intervención en los procesos vivientes, en la medida en que son cercanos a lo que comemos y a aquello de lo que nosotros mismos estamos hechos, genera una buena dosis de ansiedad y miedo en varios sectores de la sociedad. Es claro, por otro lado, que los procesos biológicos son casi siempre inherentemente más promisorios en su respeto al entorno que los procesos tradicionales. Se debería proceder tomando las debidas precauciones, al tiempo que, con decisión y visión realista, vayamos hacia la consecución de estos fines.

Bibliografía

1. Rozzell D., Commercial Scale Biocatalysis:Myths y Realities. *Bioorg. Med. Chem.* 7: 2253-2261 (1999).
2. Kathryn M., M. Koeller, Chi-Huey Wong. Enzymes for chemical synyhesis. *Nature Insight* 409: 232-239 (2001).
3. Kunkel T. The use of oligonucleotide-directed mutagenesis to probe molecular mechanisms of mutagenesis. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.* 19: 43 (1988).
4. Carter, P. Site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 237: 1-7 (1986).
5. Bornscheuer W., M. Pohl. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Curr. Opin. in Chem. Biol.* 5: 137-143 (2001).
6. Miyazaki K., F. Arnold. Exploring nonnatural evolutionary pathways by saturation mutagenesis: rapid improvement of protein function. *J. Mol. Evol.* 49: 716-720 (1999).
7. Liebeton K., A. Zonta, K. Schimossek, M. Nardini, D. Lang, B. Dijkstra, M. Reetz, K. Jager. Directed evolution of an enantioselective lipase. *Chem. Biol.* 7: 709-718 (2000).
8. Nardini M., D. Lang, K. Liebeton, K. Jager, B. Dijkstra. Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation: the prototype for family 1.1 of bacterial lipases. *J. Biol. Chem.* 275: 31219-25 (2000).

9. May O., P. Nguyen, F. Arnold. Inverting enantioselectivity by directed evolution of hydantoinase for improved production of L-methionine. *Nat Biotechnol.* 18: 317- 320 (2000).
10. Kirk O., T. Borchert, C. Fuglsang. Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 4: 345-51 (2002).
11. Hart, H., R. Feeney. A specific, highly active malate dehydrogenase by redesign of a lactate dehydrogenase ramework. *Science* 242: 1541-1544 (1988).
12. Mills, D., R. Peterson, S. Spiegelman. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 58: 217-24 (1967).
13. Moore, J., H. Jin, O. Kuchner, F. Arnold. Strategies for the *in vitro* evolution of protein function: enzyme evolution by random recombination of improved sequences. *J. Mol. Biol.* 272: 336-47 (1997).
14. Stemmer, W.P. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* 370: 389-91 (1994).
15. Michnick, S., F. Arnold. Itching for new strategies in protein engineering. *Nature Biotech.,* 17: 1159-1160, (1999).

Capítulo VIII

INGENIERÍA CELULAR MICROBIANA

G. Gosset Lagarda
F.G. Bolívar Zapata

La producción de bebidas y alimentos por procesos de fermentación; el nacimiento de la biotecnología

Los procesos de fermentación con cultivos microbianos son responsables, desde hace muchos años, de la producción de muchas y diferentes moléculas de origen biológico de interés social y comercial. Aún sin saberlo, desde tiempos prehistóricos, el hombre ya empleaba a los microorganismos en la modificación de sus alimentos. De esta manera, se desarrolla la biotecnología clásica a través de la implementación de métodos para la producción de bebidas alcohólicas, queso y pan entre otros. Los trabajos pioneros de científicos como Antonie van Leeuwenhoek y Louis Pasteur, demostraron la existencia de los microorganismos y su participación en la transformación de sustancias orgánicas. Éstos y otros descubrimientos son los sustentos iniciales de la biotecnología.

Uno de los primeros logros de la biotecnología consistió en el desarrollo de métodos para generar cultivos bacterianos puros, es decir, aquellos en los cuales crece una sola especie microbiana. Éste y otros conocimientos permitieron el establecimiento de procesos de fermentación industrial durante los inicios del siglo xx.

Tradicionalmente, la fermentación industrial se realizaba utilizando los microorganismos tal y como se aislaban de la naturaleza. Sin embargo, durante la década de los años cuarenta iniciaron los esfuerzos por mejorar las cepas microbianas de producción. Los procedimientos utilizados consistían en someter al microorganismo a tratamientos químicos o físicos que ocasionaban mutaciones al azar en su material genético. Mediante el empleo de métodos de selección fue así posible aislar mutantes con una mayor capacidad de producción. Es importante recalcar que estos métodos se comenzaron a usar cuando aún se desconocía

la naturaleza química del material genético. Los métodos basados en mutagénesis al azar dieron buenos resultados en algunos casos, como por ejemplo, en el mejoramiento de un organismo particular (cepa) para la producción de penicilina. Sin embargo, estos métodos son sumamente laboriosos, ya que implican la búsqueda de una cepa mejorada entre miles que no lo son. Otra desventaja adicional es la frecuente inestabilidad genética de cepas así obtenidas y el desconocimiento del cambio ocurrido por la mutación.

Los descubrimientos sobre el funcionamiento y la estructura de la célula y sus componentes, en los campos de la genética y de la bioquímica, sentaron las bases de la biología molecular. Como se ha señalado en el segundo capítulo de este libro, durante el periodo de los años setenta en el siglo pasado, se acumula conocimiento molecular de los componentes celulares y a partir de esto, surge la ingeniería genética, como un conjunto de herramientas celulares y técnicas que permiten la manipulación del material genético de los organismos y con ello la capacidad de aislar, sintetizar y mutagenizar genes específicos y también de generar organismos transgénicos.

Estas capacidades metodológicas, sumadas al conocimiento acumulado sobre el metabolismo celular, son responsables del surgimiento de la biotecnología moderna y permiten actualmente al microbiólogo molecular, diseñar estrategias encaminadas a la modificación de la célula microbiana de una manera completamente diferente a lo que podía lograrse hace unos cuantos años.

En los albores de nuestro siglo, nos encontramos ante un escenario extraordinario en cuanto a las posibilidades existentes para diseñar, manipular y orientar la maquinaria celular en procesos específicos de producción de moléculas de interés comercial. Con ello, estamos entrando y construyendo una nueva área a la que podríamos definir como la ingeniería celular.

Por un lado, estamos capacitados para hacer ingeniería de las moléculas biológicas informacionales: los ácidos nucleicos y las proteínas. A través de la ingeniería genética podemos no sólo construir organismos transgénicos que produzcan proteínas de interés como la insulina humana. En ciertos organismos, y en particular microorganismos, podemos también modificar los genes responsables de la incorporación de la glucosa y del metabolismo de los esqueletos de carbono (que se derivan de este carbohidrato) y "canalizar" estos esqueletos de carbono hacia la producción de moléculas de interés comercial en el interior de la célula.

Esta capacidad, a la que se ha denominado "Ingeniería de vías metabólicas", permite *de facto,* pensar en la célula como un verdadero "catalizador biológico" especializado en la producción de moléculas específicas. Asimismo y mediante la ingeniería y la evolución dirigida de proteínas, es posible diseñar modificaciones específicas de aquellas proteínas estratégicas que son responsables de los diferentes pasos catalíticos de las vías metabólicas. Las modificaciones pueden ser tan simples como escindir el dominio responsable de una regulación autógena por el producto de la catálisis, hasta diseños muy complejos, de nuevas capacidades catalíticas tal y como ha sido señalado en el capítulo pasado.

Aunado a lo anterior, es posible también pensar en transplantar genes y conjuntos de genes de diferentes orígenes a un microorganismo como *E. coli* para lograr así, diseñar, construir y diversificar vías metabólicas específicas de avanzada para producir metabolitos novedosos y de interés comercial que naturalmente no son producidos por esta bacteria. El uso de la biodiversidad mexicana en este aspecto permite suponer ventajas muy importantes para la selección de las vías metabólicas deseadas.

Fisiología celular microbiana

Sin embargo, un requisito indispensable para poder realizar el mejoramiento racional, o la ingeniería de cualquier sistema vivo, es un conocimiento profundo sobre los componentes que lo constituyen y sus interacciones. Un organismo vivo es un sistema muy complejo con propiedades únicas como las de crecer, reproducirse y responder a estímulos externos. Estas propiedades son el resultado de la acción coordinada de un conjunto de procesos celulares a los cuales se les agrupa con el nombre de fisiología. Según el tipo de función que realizan, es posible dividir los procesos fisiológicos de la célula en tres grandes grupos: transporte, metabolismo y regulación genética.

Transporte

Los microorganismos y todas las células de cualquier organismo se encuentran rodeados de una membrana formada principalmente por lípidos. Esta membrana, debido a su composición química, es impermeable a la mayoría de nutrientes que requiere la célula. La manera

como ésta logra hacer a la membrana permeable a estos compuestos, es incorporándole proteínas que forman poros (figura VIII.1). Estas proteínas especializadas reciben el nombre de transportadores o canales. Si el transportador participa en la internalización de una molécula, se le llama importador. Por otro lado, si favorece la salida de moléculas, recibe el nombre de exportador. Las proteínas importadoras tienen un papel esencial en los procesos de internalización de los nutrientes celulares. Asimismo, en el caso de organismos superiores, algunos canales son los responsables de generar gradientes iónicos que dan lugar a la excitabilidad del tejido nervioso y muscular. Otra función importante de los mecanismos de transporte en todos los organismos es la generación de energía metabólica en forma de la molécula llamada adenosín trifosfato (ATP) (1).

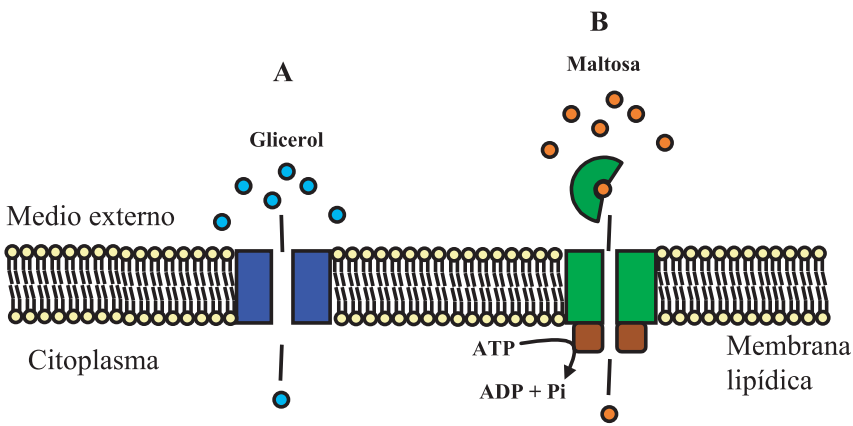


Figura VIII.1

PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

La célula se encuentra rodeada de una membrana formada principalmente por lípidos y proteínas. Los transportadores son proteínas que forman poros en la membrana y la hacen permeable a compuestos nutrientes. El transportador para glicerol llamado, GlpF se muestra en color azul. Esta proteína facilita la entrada de glicerol mediante difusión pasiva. El transporte del azúcar maltosa depende de varias proteínas. La proteína MalE (color verde obscuro) une a una molécula de maltosa y la pone en contacto con el transportador MalF (color verde claro). El transporte de la maltosa al interior de la célula requiere de energía la cual es suministrada por ATP en una reacción catalizada por la proteína MalK (color café).

Existen dos mecanismos generales de transporte a través de la membrana: difusión facilitada y transporte activo. En la difusión facilitada, el transporte ocurre en el sentido de mayor a menor concentración del

compuesto. En este caso, el papel de una proteína transportadora consiste en formar un poro en la membrana que permita el paso del compuesto particular. Por otro lado, en el transporte activo, el compuesto puede ser transportado en contra de un gradiente de concentración. Este proceso depende del consumo de energía metabólica.

En una bacteria como *Escherichia coli* se han identificado aproximadamente 182 diferentes proteínas con función transportadora, siendo la mayoría de ellas importadoras. Normalmente, existe en la célula al menos un transportador para cada compuesto nutriente. Un ejemplo de difusión facilitada es el transportador para el carbohidrato glicerol, llamado GlpF (figura VIII.1, A).

Este transportador es una proteína que forma un poro en la membrana que permite la entrada de glicerol mediante difusión pasiva. En la figura VIII.1, B, se muestra el sistema de transporte para el azúcar maltosa, un ejemplo de transporte activo. Este sistema está compuesto de una proteína soluble llamada MalE que une a la maltosa y la lleva al transportador de membrana MalF. La internalización (ó translocación) de este azúcar requiere del consumo de energía, la cual es proporcionada por la hidrólisis de ATP. Este último paso es catalizado por la proteína MalK. Este sistema de tres proteínas posee la capacidad, debido al consumo de energía, de poder transportar la maltosa aun en contra de un gradiente de concentración. Esto permite a la célula internalizar a la maltosa cuando ésta se encuentra en concentraciones muy bajas en el exterior.

La célula también posee proteínas específicas para controlar la salida o excreción de metabolitos. En el caso de las bacterias, recientemente se han descubierto algunas de las proteínas que funcionan como exportadores de los aminoácidos lisina y treonina. Estos exportadores ayudan a evitar que se acumulen niveles elevados y por lo tanto tóxicos de estos aminoácidos, en el citoplasma celular.

Sistemas similares a los descritos forman el conjunto de transportadores que permiten a la célula controlar qué compuestos pueden ser internados al citoplasma o secretados al exterior. Asimismo, la célula puede controlar si el transporte ocurre de manera pasiva, por difusión facilitada o de forma activa, empleando alguna molécula que proporcione la energía necesaria. Un gran número de los genes que codifican para transportadores de azúcares y otros nutrientes son controlados por regulación transcripcional. Debido a esto, la célula sólo produce una proteína

transportadora cuando su respectivo substrato se encuentra presente en el medio externo.

Metabolismo y redes metabólicas

Al ingresar a la célula, los nutrientes sufren una serie de transformaciones químicas. El conjunto de herramientas que tiene la célula para este propósito se denomina metabolismo celular y su función es convertir los nutrientes que fueron incorporados del medio externo, en nuevos componentes celulares (2). Una bacteria como *E. coli* está constituida por agua y una serie de moléculas en la proporción presentada en la figura VIII.2. El metabolismo de esta bacteria debe generar estos compuestos en la proporción necesaria para permitir el crecimiento del organismo, lo cual da lugar a la formación de nuevas células.

Composición química de *Escherichia coli**

Compuesto	*% del peso seco*	*Moléculas por célula*
Proteína	55.0	2 350 000
RNA	20.5	255 480
DNA	3.1	2.1
Lípidos	9.1	22 000 000
Lipopolisacáridos	3.4	1 430 000
Peptidoglicano	2.5	1
Glucógeno	2.5	4 300
Poliaminas	0.4	6 600 000
Cofactores, iones	3.5	1 100 000

* Esta es la composición de *E. coli* B crecida a 37 ºC en condiciones aeróbicas en un medio de cultivo compuesto de sales minerales con glucosa como fuente de carbono. Datos tomados de Neidhardt *et al.,* 1996 (21).

Figura VIII.2

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *ESCHERICHIA COLI**

Los cambios químicos que ocurren a las moléculas nutrientes durante su procesamiento o metabolismo se deben a la acción de proteínas llamadas enzimas, las cuales tienen la capacidad de acelerar reacciones químicas específicas. Durante el metabolismo, las moléculas van sufriendo transformaciones químicas secuenciales que dan lugar a uno o varios productos. A un conjunto de reacciones que inician con un metabolito

como sustrato y terminan con otro(s) como producto(s), se le llama vía o ruta metabólica. En una célula existen varios cientos de vías metabólicas, cada una constituida por un número diferente de pasos enzimáticos. Generalmente el producto de una vía metabólica es el sustrato de una o más vías metabólicas. De esta manera, los metabolitos enlazan a las diferentes vías que en conjunto forman el metabolismo. Es importante aclarar que la clasificación del metabolismo en vías específicas tiene el propósito de facilitar su estudio, ya que en realidad el conjunto de reacciones del metabolismo forma una gran red metabólica en la célula (2, 3).

Esta red metabólica celular tiene varias funciones, que se pueden agrupar en dos tipos de procesos: el catabolismo y el anabolismo (figura VIII.3). Las reacciones de las vías catabólicas generalmente tienen como sustrato a los azúcares. Entre los nutrientes, los azúcares juegan un papel muy importante ya que son la fuente principal de los átomos de carbono con los cuales se sintetizan la mayoría de los componentes celulares.

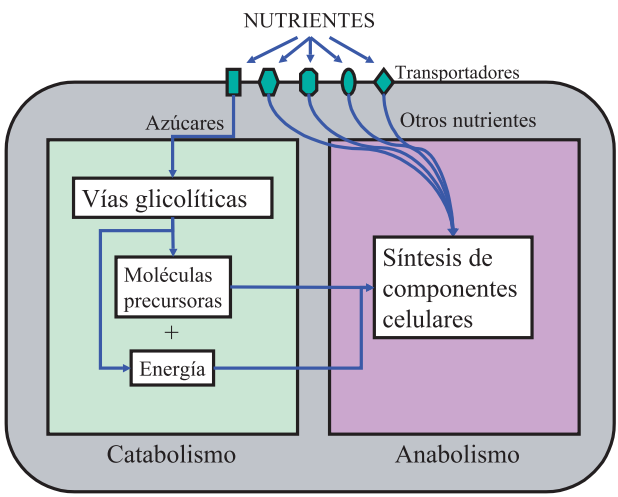


Figura VIII.3

METABOLISMO Y REDES METABÓLICAS CELULARES

Las reacciones de las vías y redes catabólicas inician con el transporte de nutrientes que son la fuente de carbono y energía, generalmente azúcares como la glucosa. En una serie de reacciones químicas se generan metabolitos precursores y se extrae energía a partir del azúcar, produciéndose también moléculas biológicas con alta energía como el ATP. Las reacciones de las vías y redes anabólicas utilizan estos elementos y los demás tipos de nutrientes para sintetizar nuevos componentes celulares. Las redes catabólicas y anabólicas, que forman la gran red del metabolismo celular, están reguladas de manera concertada.

Además, algunas reacciones del metabolismo pueden extraer energía de los azúcares, la cual es utilizada en varias funciones celulares. Las tres principales vías catabólicas son: la glicólisis o vía Embden-Meyerhof, la vía de las pentosas y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA o ciclo de Krebs). A continuación se describen en detalle cada una de ellas.

Redes o vías catabólicas

La vía o red metabólica llamada glicólisis es el conjunto de reacciones enzimáticas mediante la cual la célula convierte a la glucosa y otros azúcares en la molécula llamada piruvato. Como puede verse en la figura VIII.4, la glicólisis comienza con un proceso llamado fosforilación del azúcar, en este caso la glucosa, (primer nodo de la vía), para convertirla en glucosa 6-P (G6P) (segundo nodo de la vía). El grupo fosfato para esta reacción de fosforilación puede provenir del ATP cuando la reacción es catalizada por la enzima glucocinasa, o del fosfoenolpiruvato (PEP), cuando la internalización del azúcar depende del sistema de transporte de fosfotransferasa (PTS). La G6P sufre dos transformaciones químicas que la convierten en fructosa 1,6-DP. Este azúcar bifosforilado es fragmentado por acción de la enzima fructosa 1,6-DP aldolasa en dos moléculas de tres carbonos (triosas), la dihidroxiacetona P y el gliceraldehido 3-P. Posteriormente, una reacción de "isomerización" catalizada por la enzima triosafosfato isomerasa interconvierte a estas dos moléculas. A partir de este punto, las siguientes reacciones de la glicólisis se efectúan sobre las dos moléculas de gliceraldehido 3-P que se generaron a partir de la molécula inicial de glucosa. Después de cinco reacciones enzimáticas, se generan dos moléculas de piruvato. Como resultado de las transformaciones químicas en esta vía, se produce también energía metabólica en la forma de dos moléculas de ATP y dos de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) por cada molécula de glucosa internalizada, metabolizada y consumida por la célula. Aparte de la energía producida, la glicólisis genera metabolitos que son precursores para otras moléculas en la célula, éstos son: glucosa 6-P, fructosa 6-P, gliceraldehido 3-P, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato y piruvato (figura VIII.4) (3).

La vía o red metabólica de las pentosas fosfato, participa en el catabolismo de los azúcares de cinco carbonos. Asimismo, participa de manera parcial junto con la glicólisis, en el metabolismo de la glucosa (figura VIII.5). Normalmente alrededor de 25% de la G6P sintetizada a partir de

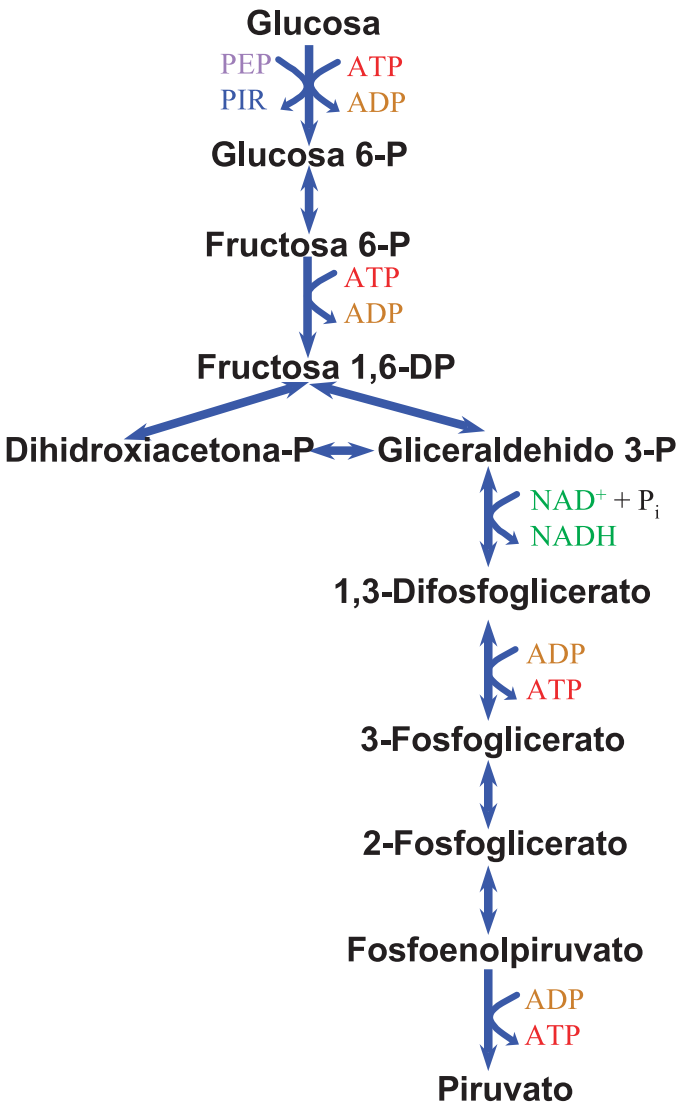


Figura VIII. 4

LA VÍA O RED GLICOLÍTICA EMBDEN-MEYERHOF O GLICÓLISIS

La glicólisis es el conjunto de reacciones enzimáticas que tiene la célula para generar dos moléculas de piruvato a partir de glucosa. En esta vía catabólica se generan los metabolitos precursores glucosa 6-P, fructosa 6-P, gliceraldehido 3-P, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato y piruvato. Asimismo, se genera energía en la forma de dos moléculas de ATP y dos de NADH, a partir de cada molécula de glucosa.

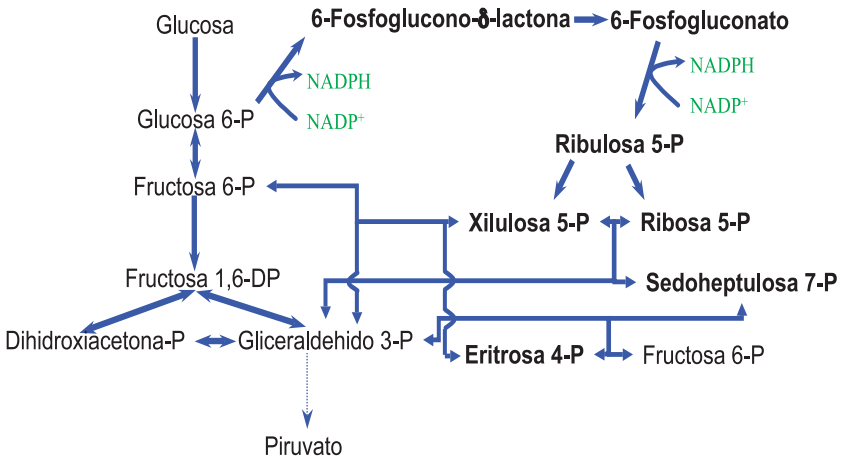


Figura VIII. 5

VÍA DE LAS PENTOSAS FOSFATO

Esta vía o red metabólica tiene como función la generación de los metabolitos precursores ribosa 5-P y eritrosa 4-P. Asimismo, participa en la síntesis del compuesto donador de hidrógeno y electrones NADPH.

glucosa es metabolizada por la vía de las pentosas. Esta vía se puede dividir en dos segmentos, la rama oxidativa que inicia a partir de la G6P y la rama no oxidativa que inicia con la fructosa 6-P y el gliceraldehido 3-P. La vía de las pentosas cumple dos funciones dentro del metabolismo celular: contribuir a la síntesis de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y generar los metabolitos precursores ribosa 5-P (R5P) y eritrosa 4-P (E4P). El NADPH participa como donador de hidrógeno y electrones en algunas de las reacciones anabólicas y la R5P forma parte de los ácidos nucleicos.

Las moléculas de piruvato generadas en la glicólisis son convertidas en el metabolito llamado acetil coenzima A (acetil-CoA), por acción de un complejo de enzimas llamado piruvato deshidrogenasa. Todos los nutrientes que pueden funcionar como fuentes de carbono y energía (azúcares, lípidos y aminoácidos), después de una serie de reacciones catabólicas específicas para cada compuesto, terminan siendo convertidos en acetil CoA. Esta molécula ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), en donde es completamente oxidada a CO_2, generando durante este proceso moléculas de alta energía y precursores para aminoácidos (figura VIII.6). El TCA inicia con la condensación de la molécula

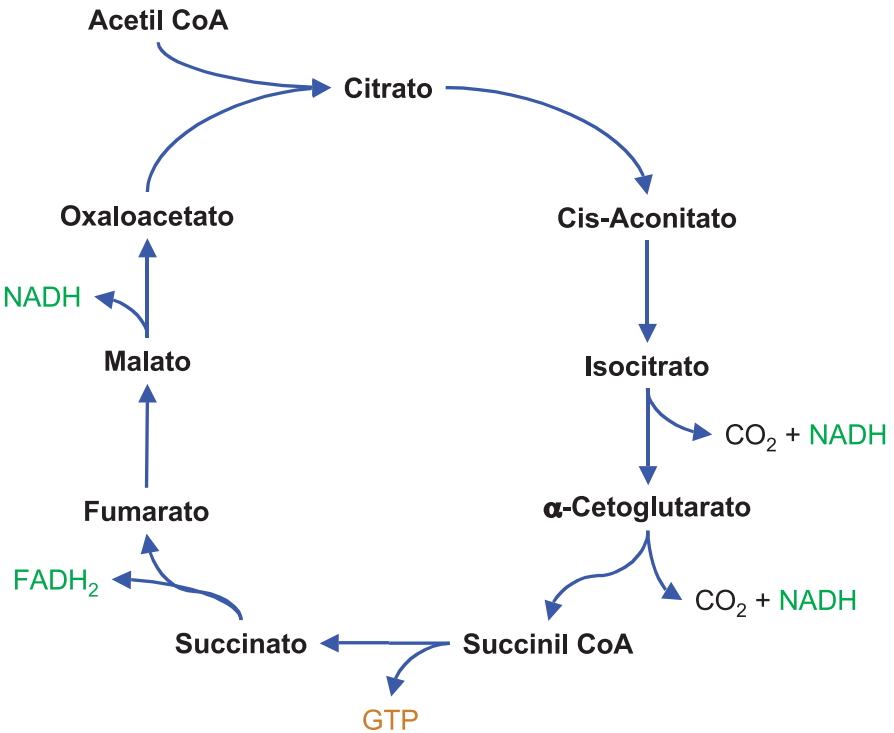


Figura VIII. 6

CICLO DE LOS ÁCIDOS TRICARBOXÍLICOS

Esta vía o red metabólica inicia con la síntesis de citrato a partir de la condensación del acetil CoA y el oxaloacetato los cuales son precursores de varios aminoácidos. Entre las funciones de esta vía se encuentran la síntesis de los metabolitos precursores α–cetoglutarato, succinil CoA y oxaloacetato. Además se genera energía en la forma de NADH y $FADH_2$.

de cuatro carbonos llamada oxaloacetato, con el grupo acetilo de dos carbonos proveniente de la molécula de acetil CoA. La molécula resultante —de seis carbonos— es el citrato. Este compuesto y los siguientes en el TCA sufren una serie de transformaciones químicas por la acción de enzimas específicas, que incluyen decarboxilaciones oxidativas en las cuales se generan NADH, flavin adenina dinucleótido ($FADH_2$) y CO_2. Asimismo, durante la conversión de succinil CoA a succinato, se sintetiza guanosina trifosfato (GTP) a partir de GDP. El TCA se cierra con la síntesis de oxaloacetato, molécula que nuevamente puede condensarse con otra molécula de acetil CoA para iniciar otro ciclo. Además de generar ener-

gía en la forma de NADH y $FADH_2$, el TCA también produce los metabolitos precursores α–cetoglutarato, succinil CoA y oxaloacetato (2).

Respiración celular

El NADH y $FADH_2$ generados en las vías catabólicas son moléculas que liberan energía cuando un par de sus electrones se transfieren al oxígeno. Esta energía puede ser capturada por la célula y utilizada para la síntesis de ATP en un proceso denominado "fosforilación oxidativa". Este proceso constituye la respiración celular, depende de la presencia de oxígeno y es la mayor fuente de ATP generado por el metabolismo celular. La fosforilación oxidativa se lleva a cabo por una serie de proteínas que se encuentran en las membranas de las bacterias o la membrana interna de la mitocondria en organismos eucariontes. A este conjunto de proteínas se les llama también cadena respiratoria. Como resultado de esta actividad la célula sintetiza 32 de las 36 moléculas de ATP que se generan a partir del catabolismo de una molécula de glucosa. En ausencia de oxígeno, la cadena respiratoria no funciona. En esta condición, algunos microorganismos pueden subsistir con el aporte de ATP generado por la glicólisis. El ATP generado por la célula es utilizado para proveer energía a varias funciones celulares entre las que se encuentran: reacciones metabólicas del anabolismo, movimiento de flagelos, transporte activo, etcétera.

Vías o redes anabólicas

Entre los metabolitos generados del catabolismo de la glucosa u otros azúcares, existen doce a partir de los cuales se generan prácticamente todos los componentes celulares. A éstos se les conoce como metabolitos precursores (figura VIII.7). Las reacciones bioquímicas que constituyen las vías anabólicas tienen como función utilizar estos metabolitos precursores, que son los nodos más importantes de la gran red metabólica celular, el resto de los nutrientes y la energía biológica (ATP) generada en el catabolismo, para llevar a cabo la síntesis de los componentes celulares que finalmente darán lugar a una nueva célula. A diferencia de las reacciones de las vías catabólicas que ocasionan la fragmentación o reducción en el tamaño de las moléculas que son fuentes de carbono, las reacciones del anabolismo generalmente van uniendo moléculas pequeñas entre sí para generar otras de mayor tamaño y complejidad. De esta manera, la célula va "construyendo" moléculas, agregando átomos de carbono y otros elementos a los diferentes metabolitos precursores.

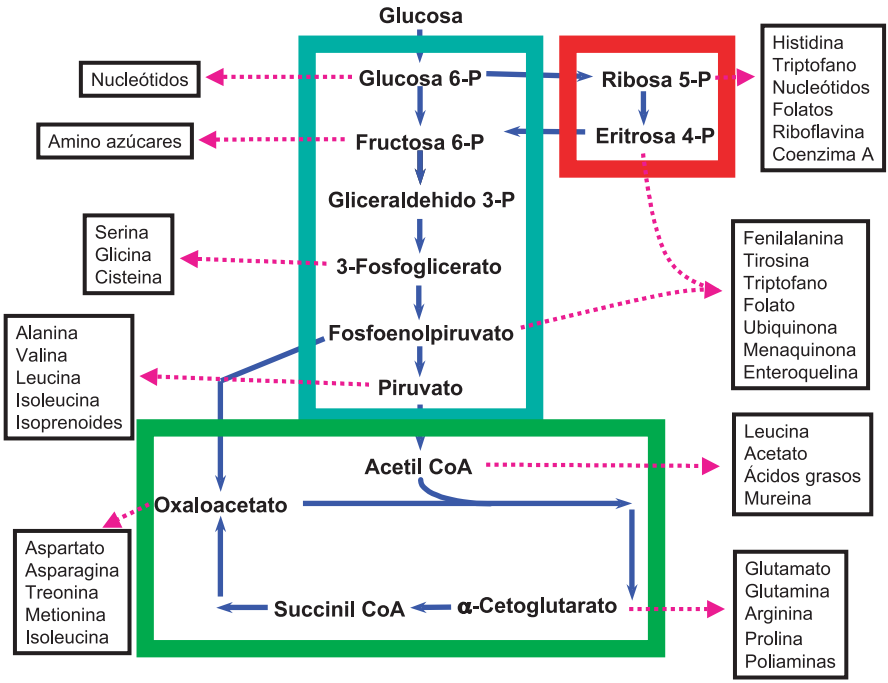


Figura VIII. 7

RED METABÓLICA CENTRAL Y METABOLITOS (NODOS) PRECURSORES

Las vías o redes glicolítica (color azul), de las pentosas fosfato (color rojo) y de los ácidos tricarboxílicos (color verde) generan los doce metabolitos que son precursores de prácticamente todos los componentes celulares. Las flechas punteadas señalan los compuestos que se generan a partir de los principales metabolitos precursores. La figura muestra el conjunto de reacciones enzimáticas de la red del metabolismo central de la célula en el cual se conectan las diferentes vías metabólicas específicas. Estos doce compuestos de carbono son pues los nodos más importantes y más utilizados, conjuntamente con el ATP y el H_2O, en el funcionamiento de la gran red metabólica celular.

Las vías anabólicas comienzan con las reacciones biosintéticas que convierten a los metabolitos precursores en moléculas más complejas tales como vitaminas, cofactores y las unidades monoméricas de los polímeros biológicos (ácidos nucleicos y proteínas) que posteriormente serán polimerizadas. En la figura VIII.7 se muestra el origen de los veinte aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos, azúcares y algunos otros metabolitos celulares a partir de los doce precursores metabólicos. Estos compuestos se generan a partir de múltiples vías metabólicas que en su conjunto constituyen la mayor parte de las vías o redes anabólicas de la célula.

En la figura VIII.8 se muestra el destino de las unidades monoméricas. Estas moléculas son polimerizadas por enzimas que pueden actuar individualmente o formando complejos enzimáticos. En el caso de los nucleótidos, como lo hemos señalado en el capítulo I, la unión de los monómeros se realiza por medio de enzimas llamadas polimerasas. A su vez, los aminoácidos son unidos entre sí en organelos formados por proteínas y RNA llamados ribosomas. El resultado de la polimerización es la formación de macromoléculas. Es importante insistir, como se ha señalado en el capítulo I, que el orden en la polimerización de los aminoácidos y los nucleótidos sigue un patrón definido por la secuencia del DNA y el RNA. Cada gene dirige la síntesis de una secuencia única de RNA que a su vez contiene la información para la síntesis de una proteína con un tamaño y secuencia definidas. En el caso de una bacteria, el número de diferentes proteínas es aproximadamente 5 000. Por otro lado, el orden en la polimerización de azúcares y los ácidos grasos no está basada directamente en la secuencia de nucleótidos en el DNA.

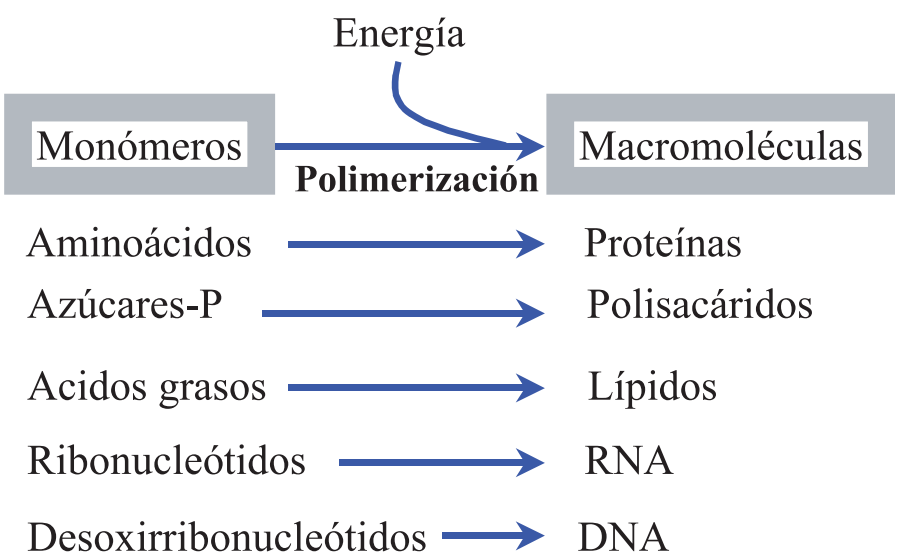


Figura VIII. 8

SÍNTESIS DE MACROMOLÉCULAS A PARTIR DE MONÓMEROS

Una parte importante de las reacciones anabólicas participan en la síntesis de unidades moleculares llamadas monómeros. Estas moléculas pequeñas son ensambladas en reacciones de polimerización, las cuales consumen energía metabólica. El resultado de dichas reacciones es la síntesis de macromoléculas que cumplirán diferentes funciones en la célula.

Finalmente, algunas de las macromoléculas son ensambladas entre sí o con moléculas diferentes para dar lugar a nuevos componentes estructurales celulares. Éste es un proceso muy complejo en el cual participan numerosos grupos de proteínas especializadas en estas funciones. Los lípidos, polisacáridos y proteínas son los principales componentes estructurales de la célula. Estas moléculas participan en la constitución de las paredes celulares en bacterias y el citoesqueleto en células de eucariontes.

Regulación genética de la red metabólica celular

El transporte de nutrientes y el metabolismo son procesos en los que participa un gran número de proteínas diferentes. Como se ha señalado en detalle en el capítulo I, la célula posee mecanismos para coordinar cuáles proteínas y en qué cantidad son necesarias dependiendo de las condiciones externas. Cualquier célula microbiana tiene el potencial genético para sintetizar un número considerable de proteínas. En el caso de *E. coli,* se estima que este número es superior a 4 400 proteínas diferentes. De estas proteínas, algunas cumplen funciones que son necesarias continuamente por la célula. En cambio, otras sólo se producen cuando su función es requerida. A las primeras se les llama proteínas constitutivas y a las segundas inducibles. El control de la síntesis de estas últimas ocurre principalmente al nivel de la síntesis del RNA. Existen proteínas llamadas reguladoras que tienen la función de detectar señales del medio externo y como resultado facilitar o impedir que un gene pueda ser transcrito en RNA. Es importante señalar que la fisiología de cualquier célula está *de facto* bajo control de redes que regulan o controlan la expresión de los genes. La estructura y organización de estas redes de control genético, es decir, el conjunto de genes particulares que responden a estímulos similares y específicos y la jerarquía de estos conjuntos de genes, está controlada a su vez, por la combinación de regiones y motivos regulatorios a nivel del DNA (promotores, operadores, etc.), y de proteínas que se unen a estas regiones, para modular la expresión de la transcripción de estos genes. De esta manera, mediante la regulación de estas redes de control genético la célula tiene mecanismos para controlar que sólo se sinteticen las proteínas necesarias para una condición nutricional o ambiental determinada (ver figuras I.16 y I.17). De esta forma, la célula controla, a nivel genético, la producción de las proteínas que participan en las diferentes vías metabólicas específicas que integran a su vez la gran red metabólica celular. El análisis de los diferentes ele-

mentos y mecanismos que utiliza la célula para controlar da manera fina, la interacción y el balance entre las diferentes vías metabólicas que integran la gran red metabólica celular, es un área de estudio extraordinariamente relevante ya que finalmente, las actividades celulares dependen de un adecuado funcionamiento, de esta gran red metabólica.

La importancia del conocimiento del transcriptoma y el proteoma de la célula para la comprensión fina del metabolismo celular

Como hemos señalado en el capítulo III, el conocimiento de la secuencia de todos los genes, fue la base para el desarrollo de metodologías que permiten determinar simultáneamente los niveles de todos los RNA mensajeros en la célula en una condición fisiológica particular. A esta información se le denomina transcriptoma (figura VIII.9). Esta metodo-

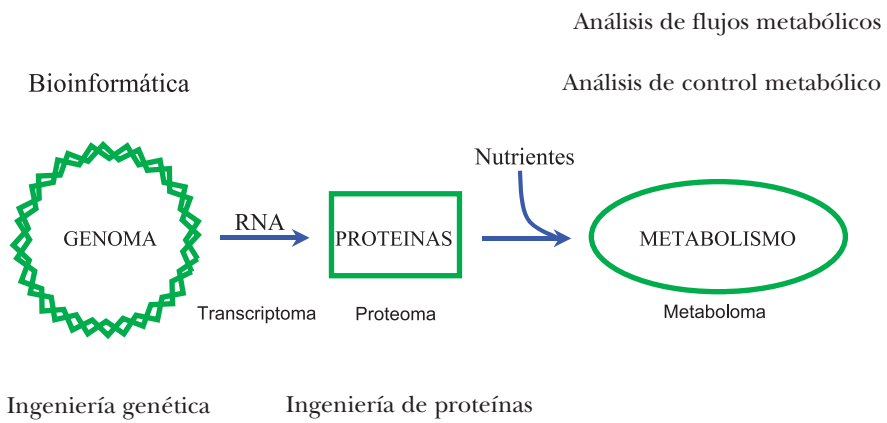


Figura VIII. 9

LA CIENCIA GENÓMICA, LA FISIOLOGÍA Y LAS HERRAMIENTAS DE LA INGENIERÍA CELULAR

La ciencia genómica estudia la función, interrelación y evolución de los genes y sus productos. Los objetos de estudio de esta ciencia son el genoma, el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma. Se puede decir, por lo tanto, que la ciencia genómica estudia la fisiología desde un punto de vista global y tomando en cuenta, de manera simultánea, la expresión de todos los genes de una célula, en una condición metabólica particular. En esta figura se muestran las principales herramientas de la ciencia genómica y la ingeniería celular. La posición del nombre de cada herramienta corresponde con el segmento de la fisiología celular que ésta estudia o modifica.

logía permite establecer qué genes se encuentran activos bajo condiciones metabólicas o ambientales específicas. La información obtenida de esta manera es muy valiosa para lograr establecer la función de los productos proteicos de estos genes en la fisiología del organismo.

En forma paralela al desarrollo de la ciencia genómica, surge la ciencia del proteoma. Hoy en día, al conocer la secuencia de todos los genes de un organismo, es posible deducir el proteoma de ese organismo, es decir, la secuencia de los aminoácidos que integran todas sus proteínas. Con ello se inicia la ciencia proteómica que busca conocer la función y la interrelación de todas las proteínas de un organismo (figura VIII.10). En el caso de *E. coli,* como se ha señalado en el capítulo III, ahora sabemos que su genoma, constituido por 4 639 221 pares de nucelótidos, tiene el potencial para codificar aproximadamente 4 464 proteínas diferentes. El principal método de análisis experimental del proteoma se basa en el uso de la electroforesis en dos dimensiones en geles de poliacrilamida. Esta tecnología permite separar y cuantificar la mayor parte de las proteínas de una célula (figura II.9).

El metaboloma

El conocimiento acumulado sobre el metabolismo celular es tal, que se puede afirmar que conocemos prácticamente todas las reacciones químicas que conforman a los procesos catabólicos y anabólicos. Al conjunto de los metabolitos presentes en una célula en una determinada condición fisiológica se le denomina metaboloma. Son múltiples los enfoques de estudio del metaboloma. Entre los valores que interesa conocer acerca del metaboloma están las concentraciones de cada metabolito en la célula en una condición dada y la velocidad con la que éstos se transforman químicamente. Llevar a cabo el análisis fino del metabolismo no es una tarea sencilla debido al alto número de reacciones que lo conforman. Otra dificultad es la rapidez con la que ocurren y pueden cambiar las reacciones metabólicas. Debido a esto, se han desarrollado métodos muy sofisticados que facilitan el estudio del metabolismo.

Análisis de flujos metabólicos

Cuando la célula está creciendo, existe un constante flujo de compuestos nutrientes hacia su interior. Ya dentro de la célula, estos compuestos

ingresan a las múltiples vías que constituyen la red metabólica de la célula. Uno de los principales objetivos en el estudio de esta red metabólica es determinar la magnitud y la distribución de los flujos de metabolitos y de energía en la célula. Igualmente importante es determinar cómo se modifican estos flujos en respuesta a cambios externos, cómo la composición nutricional del medio, o internos como la presencia de una mutación que inactiva a una enzima (4). Actualmente, se conoce prácticamente la totalidad de las reacciones químicas que constituyen el metabolismo de *E. coli*. Esta información ha sido generada por un gran número de grupos de investigación a lo largo de muchos años. Se ha determinado que en el metabolismo de esta bacteria participan aproximadamente 2 760 enzimas y 794 metabolitos. Lo anterior constituye una red metabólica muy compleja, en la cual algunas reacciones siempre están activas y otras se inducen o reprimen dependiendo de las condiciones del medio externo. El tamaño y la complejidad de la red metabólica celular han hecho necesario el desarrollo de métodos de estudio especiales. Actualmente se emplean de manera complementaria enfoques teóricos y experimentales, uno de los cuales se describe a continuación.

La determinación de los flujos metabólicos *in vivo,* es decir, en el interior de una célula viva, es conocimiento necesario para poder plantear estrategias de ingeniería celular. Una de las aproximaciones más completas en el estudio de los flujos metabólicos, *in vivo,* se basa en la utilización de nutrientes marcados con isótopos y en la determinación de modificaciones de estas moléculas como resultado del metabolismo celular. Este método permite la determinación de prácticamente todos los flujos metabólicos intracelulares. Sin embargo, esta metodología requiere de equipo costoso y cálculos muy complejos. La determinación de flujos metabólicos *in vivo* se basa en el uso de moléculas que se usan como nutriente, generalmente la glucosa, en la cual uno o varios de sus átomos de carbono que normalmente corresponden al isótopo ^{12}C, han sido sustituidos por el isótopo ^{13}C. Los isótopos son átomos de un elemento que difieren en el número de neutrones en su núcleo. Para el carbono, el isótopo más abundante en la naturaleza es el ^{12}C. En un experimento típico para determinar flujos metabólicos, la glucosa marcada con ^{13}C ingresa a la célula y como resultado del metabolismo, sus átomos de carbono terminan formando parte de la mayoría de los componentes celulares. Utilizando técnicas analíticas (y de resonancia magnética nuclear), es posible determinar la posición de los átomos de ^{13}C en varias de las moléculas

generadas en el metabolismo. Esta información aunada al conocimiento de la red metabólica del organismo, permite calcular los flujos internos en la célula que debieron dar lugar al patrón de marcaje con ^{12}C observado en las moléculas analizadas. Normalmente se deben realizar varios experimentos diferentes usando moléculas de glucosa marcadas en diferentes átomos de carbono, para lograr determinar la mayoría de los flujos metabólicos. Recientemente, utilizando este tipo de enfoque y herramientas ha sido posible determinar los flujos de carbono en algunos de los nodos importantes de *Escherichia coli* (5).

Por otro lado, el conocimiento sobre las reacciones químicas que ocurren en *E. coli* ha permitido el diseño de modelos de redes metabólicas celulares *in silico,* es decir simulados en una computadora. Ésta es una área de reciente creación en la cual se fusionan la informática y la bioquímica. Ahora es posible recrear en una computadora los flujos de todas las reacciones de esta célula bacteriana y estudiar los efectos de cambios en la composición de nutrientes o la eliminación de algunas reacciones, sobre la capacidad simulada de crecimiento de la bacteria. Este tipo de estudios ha sido muy valioso para ayudar a entender cuáles son los límites teóricos en la producción de algunos metabolitos y cuáles son las distribuciones de flujos que permiten llegar a dicho resultado. Por otro lado, la simulación *in silico* para predecir las respuestas en los flujos metabólicos a perturbaciones externas o internas ha tenido en general resultados positivos, pero en este punto la tecnología aún debe mejorarse.

Análisis del control metabólico

Cuando se desea modificar la fisiología de un microorganismo, uno de los principales puntos a considerar es cuál o cuáles de las actividades celulares deberán ser modificadas para lograr el efecto deseado. Esta es una pregunta fundamental para la cual no es sencillo encontrar la respuesta debido a la gran complejidad de la red metabólica celular.

A partir de los años setenta se ha venido desarrollando una serie de métodos para el análisis del metabolismo al cual se ha denominado análisis de control metabólico (ACM) (6). El objetivo del ACM es definir la relación cuantitativa de una reacción enzimática sobre el flujo de una vía o red metabólica completa. Esta relación se expresa como un coeficiente de control de flujo (CCF). El CCF se define como el cambio en el flujo en una vía metabólica que resulta al incrementar la actividad de una enzima particular en 10%. Es importante señalar que el concepto de coe-

ficiente de control también puede aplicarse a actividades no enzimáticas. Si en una vía metabólica se incluye la actividad de transporte, es posible calcular el CCF del transportador, relacionando el número de moléculas del transportador con el efecto en el flujo de la vía metabólica.

La ingeniería celular y la bioingeniería de procesos

La aplicación de las herramientas aquí descritas permiten el diseño y el desarrollo de nuevas o mejores cepas microbianas de producción. Éste es el primer paso para la constitución de nuevas o mejores tecnologías biológicas encaminadas a la producción de algún metabolito específico. (figura VIII.10). Sin embargo, para que estas nuevas cepas puedan formar parte de una tecnología comercialmente viable, es necesario proporcionarles condiciones nutricionales y ambientales adecuadas para obtener la máxima productividad. Para que una bacteria se desarrolle adecuadamente, además de necesitar nutrientes, requiere de condiciones específicas de temperatura, pH y concentración de oxígeno entre otros. Esto se logra utilizando la bioingeniería de procesos, una disciplina que aplica conceptos de la ingeniería y la bioquímica al manejo y aprovechamiento de los cultivos celulares. Como veremos en el capítulo siguiente, la bioingeniería cuenta con las herramientas de análisis que permiten establecer las condiciones de cultivo para lograr una alta productividad. Asimismo, se pueden establecer las condiciones bajo las cuales se pueden transferir los cultivos de una escala pequeña de laboratorio a una mayor escala industrial. Por otro lado, la bioingeniería también estudia y aplica los métodos utilizados para lograr la purificación del producto.

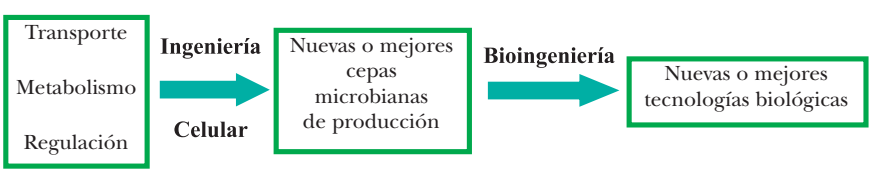


Figura VIII. 10
LA INGENIERÍA CELULAR Y LA BIOINGENIERÍA DE PROCESOS
La ingeniería celular permite la modificación de la fisiología con el propósito de obtener nuevas o mejores cepas microbianas de producción. La bioingeniería permite definir las condiciones de cultivo para obtener el máximo potencial productivo de estas cepas y así constituir nuevas tecnologías biológicas.

Frecuentemente, el objetivo de un proyecto donde se aplique la ingeniería celular será lograr la modificación de los componentes celulares con el propósito de incrementar la síntesis de un producto de interés (4). Para lograr este objetivo, se deben considerar al menos los siguientes cuatro puntos:

1. Incrementar la primera reacción enzimática que dirige el flujo de carbono del metabolismo central hacia la vía metabólica de interés.

El propósito de esta modificación es incrementar el flujo de metabolitos que se origina a partir de los metabolitos precursores y que dará origen al compuesto de interés. Para lograr lo anterior, normalmente se debe aumentar la expresión del gene que codifica para la primera enzima de la vía metabólica de interés.

2. Eliminar los controles de regulación genética y de actividad enzimática (transcripcionales y alostéricos) de las proteínas claves dentro de la vía o red metabólica de interés.

Las vías metabólicas poseen mecanismos de control los cuales aseguran que la célula no sintetice un compuesto cuando éste puede ser tomado del medio externo. Este tipo de controles son un problema cuando se pretende generar una cepa especializada en la producción de algún metabolito. La solución a esta limitante consiste en "desregular" los componentes de la vía. Lo anterior se puede lograr cambiando el promotor regulado nativo por otro que no esté sujeto a regulación y además generando mutantes de las enzimas que sean insensibles a inhibición alostérica por el producto.

3. Evitar la pérdida de esqueletos de carbono hacia otras vías metabólicas.

Frecuentemente, los metabolitos precursores son compartidos entre varias vías metabólicas. Esta competencia limita la cantidad de precursores que se puede dirigir o canalizar hacia la síntesis de un metabolito particular. Para lograr que un precursor no sea consumido por una vía no deseada, se sigue la estrategia de inactivar, mediante mutagénesis, al gene que codifica para alguna de las enzimas de esa vía.

4. Identificar y eliminar pasos limitantes dentro de la vía de interés.

Al incrementarse el flujo de carbono hacia una vía particular, como resultado de aplicar las estrategias anteriores, es posible que las actividades de sus enzimas no sean suficientes para metabolizarlo totalmente.

La aplicación del análisis de control metabólico puede permitir la identificación de cuáles enzimas son limitantes. Con esta información, la estrategia para eliminar los pasos limitantes consiste en incrementar la expresión de los genes correspondientes.

Estos puntos representan la serie de análisis y modificaciones que se deben realizar en la vía metabólica que genera al compuesto de interés y en las vías metabólicas relacionadas. En la siguiente sección se presentarán ejemplos de cómo se aplican estas estrategias para el desarrollo de cepas productoras de compuestos aromáticos.

Ingeniería celular para la producción de compuestos aromáticos en *E. coli*

Los compuestos aromáticos tienen un papel importante en las industrias de alimentos, química y farmacéutica. Actualmente la mayoría de los compuestos aromáticos utilizados en la industria, son obtenidos mediante procesos de síntesis química empleando derivados de petróleo como materia prima. Frecuentemente, este tipo de procesos genera subproductos que contaminan el medio ambiente. Utilizando la ingeniería celular, es posible desarrollar cepas bacterianas con el potencial para sintetizar moléculas útiles, hasta ahora sólo obtenidas mediante síntesis química. Estas cepas bacterianas que utilizarían a la glucosa u otras fuentes renovables de carbono como materia prima en procesos biotecnológicos no contaminantes, deberán formar parte de tecnología biológica competitiva para desplazar los procesos actuales de producción por vía química de compuestos aromáticos (7).

Características generales de las vías de síntesis de compuestos aromáticos

La vía de síntesis de compuestos aromáticos, también conocida como la vía del ácido siquímico, es fuente de metabolitos esenciales, así como de un gran número de los llamados metabolitos secundarios en bacterias, hongos y plantas (8). La síntesis de los compuestos aromáticos en bacterias se inicia con la condensación de los metabolitos precursores fosfoenolpiruvato (PEP) y D-eritrosa 4-fosfato (E4P) para formar el 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato (DAHP), en una reacción catalizada por las

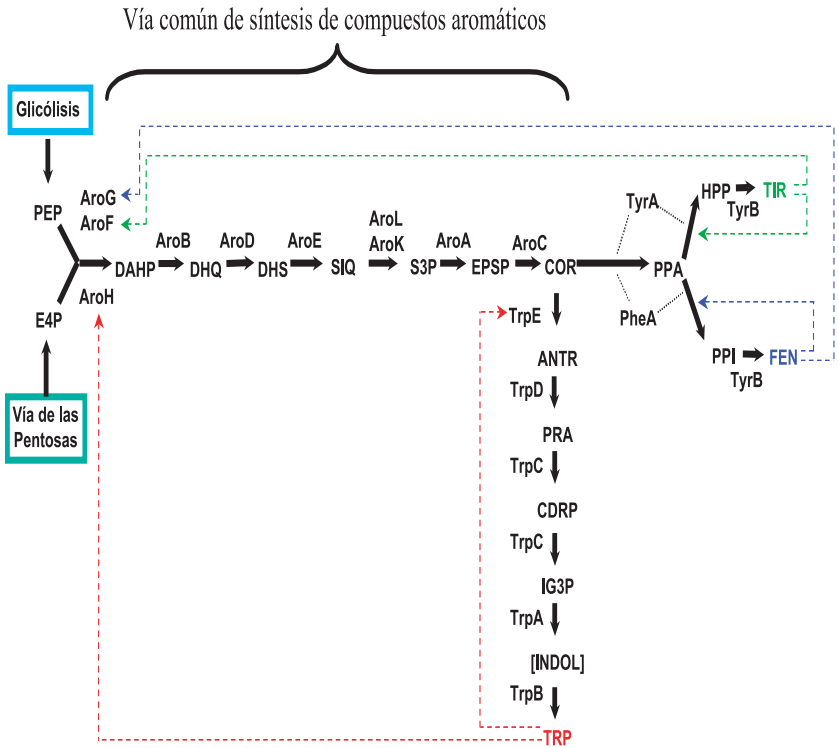


Figura VIII.11

VÍAS DE SÍNTESIS DE COMPUESTOS AROMÁTICOS EN *ESCHERICHIA COLI*

La vía común de síntesis de compuestos aromáticos inicia con la condensación de la E4P y el PEP para dar lugar al DAHP. Después de seis reacciones enzimáticas se sintetiza un compuesto intermediario que se denomina corismato (COR). A partir de este metabolito, inician las vías de síntesis de los tres aminoácidos aromáticos, triptofano (TRP), fenilalanina (FEN) y tirosina (TIR). Las líneas punteadas relacionan a enzimas con el aminoácido que las inhibe alostéricamente. Abreviaturas de metabolitos: PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrosa 4-P; DAHP, 3-deoxi-D-arabino-heptulosonato 7-fosfato; DHQ, deshidroquinato; DHS, deshidrosiquimato; SIQ, siquimato; S3P, siquimato 3-P; EPSP, enolpiruvilsiquimato-P; ANTR, antranilato; PRA, fosforibosilantranilato; CDRP, 1-(o-carboxifenilamino)-1-desoxiribulosa 5-P; IG3P, indolglicerol 3-P; PPA, prefenato; PPI, fenilpiruvato; HPP, hidroxifenilpiruvato. Abreviaturas de enzimas: AroF, DAHP sintasa sensible a inhibición alostérica por tirosina; AroG, DAHP sintasa sensible a inhibición alostérica por fenilalanina; AroH, DAHP sintasa sensible a inhibición alostérica por triptofano; AroB, deshidroquinato sintasa; AroD, deshidroquinato deshidratasa; AroE, siquimato deshidrogenasa; AroK y AroL, siquimato cinasa; AroA, enolpiruvilsiquimato-P sintasa; AroC, corismato sintasa; TrpE y TrpD, antranilato sintasa; TrpC, fosforibosil antranilato isomerasa e indolglicerol fosfato sintasa; TrpA y TrpB, triptofano sintasa; PheA, corismato mutasa y prefenato deshidratasa; TyrB, tirosina aminotransferasa; TyrA, corismato mutasa y prefenato deshidrogenasa.

isoenzimas de DAHP sintasa (AroF, AroG y AroH). A partir de DAHP y después de seis reacciones enzimáticas, se produce el compuesto intermediario llamado corismato, a partir del cual se sintetizan los aminoácidos aromáticos. (figura VIII.11).

Modificación de componentes de la vía común de síntesis de compuestos aromáticos para incrementar el flujo de carbono hacia la biosíntesis de DAHP y corismato

Diferentes grupos de investigación hemos estado interesados en incrementar la producción de compuestos aromáticos en microorganismos (9-15). Una estrategia para lograr lo anterior ha sido dirigir la mayor cantidad posible de átomos de carbono provenientes de la glucosa hacia la síntesis de los compuestos aromáticos de interés. Para este propósito, se deben modificar tanto la vía común como cada una de las vías específicas que darán lugar a compuestos específicos tales como los aminoácidos fenilalanina, triptofano y tirosina, entre otros. Las vías de síntesis de compuestos aromáticos se encuentran altamente reguladas tal y como puede observarse en la figura VIII.11. Cada uno de los tres aminoácidos aromáticos ejerce "inhibición alostérica" sobre la primera enzima de su vía específica de síntesis y también inhiben a cada una de las tres isoenzimas involucradas en la síntesis de DAHP. La inhibición alostérica es el fenómeno mediante el cual se inhibe la actividad de una enzima debido a la unión del inhibidor con la enzima, que puede ser el propio producto de la reacción. Por otro lado, la expresión de los genes que codifican para estas enzimas se reprime cuando alguno de los aminoácidos está presente en el medio (2).

Para incrementar la primer reacción enzimática que dirige el flujo de carbono del metabolismo central a la vía de síntesis de compuestos aromáticos, en primer lugar se debe generar una enzima DAHP sintasa que no sea inhibida por ninguno de los tres aminoácidos aromáticos. Con este propósito, aplicando la ingeniería de proteínas y utilizando un esquema de mutagénesis al azar para el gene aroG, se seleccionó una versión mutante de la enzima AroG que ya no es inhibida alostéricamente. Al gene que codifica para esta enzima se le llamó aroG^{RIA}, indicando que la enzima AroG^{RIA} es ahora resistente a inhibición alostérica. Adicionalmente, se substituyó la región de regulación del gene aroG^{RIA} por la región de otro gene que no es reprimido por la presencia de los amino-

ácidos aromáticos (14). Por otro lado, existe evidencia experimental indicando que la síntesis del otro precursor de los compuestos aromáticos, la E4P, se incrementa si se sobreexpresa el gene *tktA* que codifica para la enzima transcetolasa. Para lograr esto el gene *tktA* fue insertado en un plásmido que está presente en aproximadamente 10 copias en *E. coli.*

Resumiendo, la expresión de una DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica (aroG^{RIA}) y la sobreexpresión de trancetolasa, ocasionan que se aumente significativamente el flujo de carbono hacia la síntesis de DAHP y de corismato que es la molécula aromática precursora de los demás compuestos de este tipo tales como la fenilalanina, el triptofano y la tirosina (14).

Modificación del metabolismo central para canalizar esqueletos de carbono hacia la vía de síntesis de compuestos aromáticos

Como puede verse en la figura VIII.12, uno de los precursores de los compuestos aromáticos es el PEP, molécula que participa en varias reacciones celulares. Las principales actividades que compiten con la vía de aromáticos por el PEP son las enzimas piruvato cinasas (*PykA* y *PykF*) y el sistema de fosfotranferasa (PTS). Nuestro grupo ha generado y caracterizado mutantes en los genes *pykA* y *pykF* (16, 17). Además, hemos desarrollado una tecnología para la generación de cepas de *E. coli* con el sistema de fosfotransferasa inactivado (PTS^{-}), pero con la capacidad de asimilar eficientemente la glucosa (cepas PTS^{-} gluc^{+}) (12). Como parte de la caracterización fisiológica de estas cepas, se ha demostrado que poseen el potencial para la síntesis de compuestos aromáticos con un alto rendimiento a partir de glucosa (13-15). La inactivación de PTS causó un incremento de 33% en el flujo de carbono hacia aromáticos, comparado con una cepa silvestre PTS^{+} (15).

Las modificaciones descritas hasta aquí están diseñadas para que una cepa pueda dirigir una alta proporción del carbono proveniente de la glucosa hacia la vía común de síntesis de compuestos aromáticos. A continuación se describen las modificaciones genéticas adicionales que deben realizarse para generar las cepas productoras de metabolitos específicos y como ejemplo se presenta la fenilalanina.

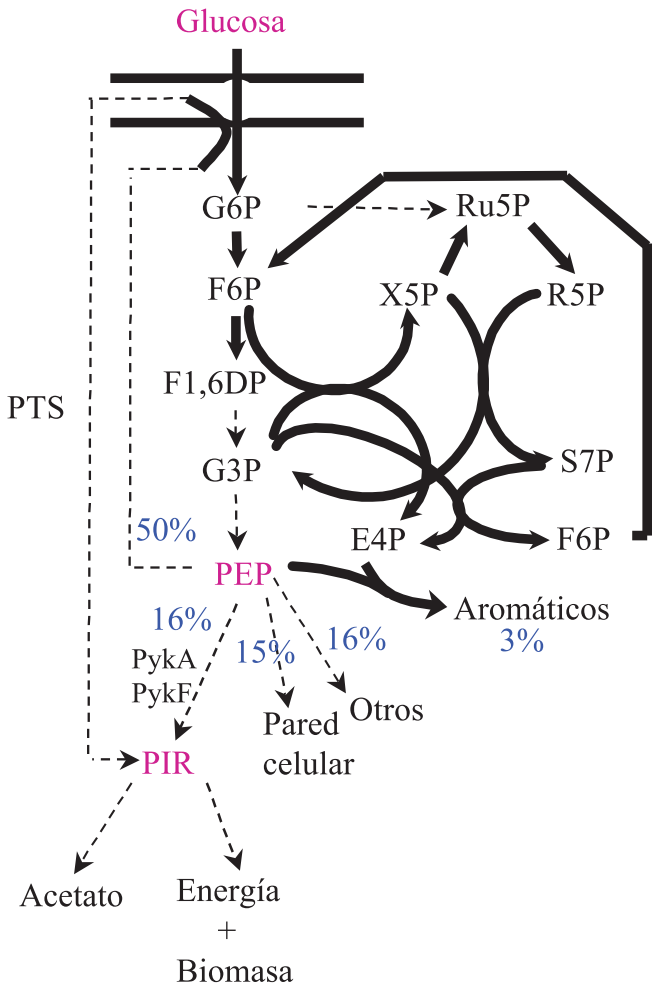


Figura VIII.12

VÍAS DEL METABOLISMO CENTRAL RELACIONADAS A LA SÍNTESIS DE FOSFOENOLPIRUVATO Y ERITROSA 4-P

El fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa 4-P (E4P) son los metabolitos precursores directos de la vía de síntesis de compuestos aromáticos. De estos dos compuestos, el PEP es sustrato de varias reacciones metabólicas. Los números en azul indican en porcentajes la proporción de PEP consumido por varias de estas reacciones. Las reacciones que individualmente consumen la mayor cantidad de PEP son, en primer lugar, el sistema de fosfotransferasa (PTS) y en segundo lugar las piruvato cinasas (PykA y PykF). Abreviaturas: G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; F1,6DP, fructosa 1,6-DP; G3P, gliceraldehido-3-fosfato; PIR, piruvato; Ru5P, Ribulosa-5-fosfato; X5P, xilulosa-5-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato; S7P.

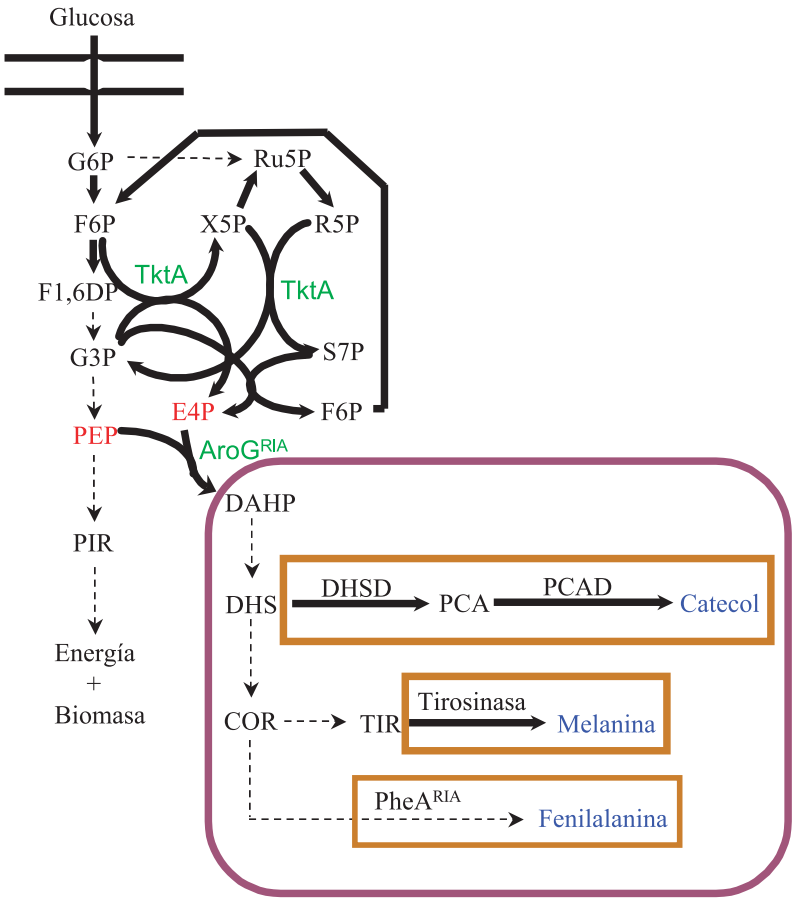


Figura VIII. 13

MODIFICACIONES AL METABOLISMO DE *ESCHERICHIA COLI* PARA QUE SOBREPRODUZCA FENILALANINA

Se muestran la vías del metabolismo central y vías involucradas en la síntesis del compuesto aromático fenilalanina. Las líneas continuas y discontinuas representan reacciones bioquímicas sencillas y múltiples, respectivamente. Abreviaturas de metabolitos: G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; F1,6DP, fructosa 1,6-DP; G3P, gliceraldehido-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; PIR, piruvato; Ru5P, Ribulosa-5-fosfato; X5P, xilulosa-5-fosfato; R5P, ribosa-5-fosfato; S7P, sedoheptulosa-7-fosfato; E4P, eritrosa 4-P; DAHP, 3-deoxi-D-*arabino*-heptulosonato 7-fosfato; PCA, protocatecuato; DHS, 5-dehidrosiquimato; PCA, protocatecuato; COR, corismato; TIR, tirosina. Abreviaturas de enzimas: TktA, transcetolasa; AroG^RIA, DAHP sintasa insensible a inhibición alostérica por fenilalanina; DHSD, deshidrosiquimato deshidratasa; PCAD, protocatecuato decarboxilasa; PheA^RIA, corismato mutasa-prefenato deshidratasa resistente a inhibición alostérica por fenilalanina.

Los aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina y fenilalanina son considerados esenciales en la dieta del hombre y de la mayoría de los animales empleados para la alimentación humana. Entre ellos, la fenilalanina es producida industrialmente y utilizada como suplemento nutricional para animales. Recientemente, la producción de fenilalanina ha cobrado un interés especial debido a que es uno de los constituyentes del edulcorante de bajas calorías llamado aspartamo (18). La producción biotecnológica de fenilalanina se basa en el empleo de cepas de *E. coli* con alteraciones en algunas de las enzimas de la vía de síntesis. En particular, el tipo de alteración que se introduce es la resistencia a inhibición alostérica de las enzimas que regulan el flujo de carbono hacia la vía de síntesis del aminoácido. Sin embargo, estas tecnologías distan aún mucho de ser eficientes ya que el rendimiento promedio en la síntesis del aminoácido a partir de glucosa se aproxima al 30% del nivel máximo teórico. Una mejora significativa a las tecnologías actuales sería incrementar el rendimiento de fenilalanina a partir de glucosa. Las cepas PTS$^-$ Gluc$^+$, descritas anteriormente, pueden lograr rendimientos en la síntesis de intermediarios en la vía, que igualen o superen el 50%.

Tomando como base estas consideraciones, es posible desarrollar tecnologías competitivas de alto rendimiento para la síntesis de fenilalanina (figura VIII.13) con un rendimiento a partir de glucosa de al menos 50%. Para lograr este objetivo, es necesario realizar estudios de flujo y control metabólico en la vía aromática común y específica de fenilalanina en cepas. Estos estudios permitirían determinar qué actividades enzimáticas específicas dentro de la vía de biosíntesis deberían ser incrementadas con el propósito de dirigir esqueletos de carbono provenientes de glucosa, eficientemente hacia la síntesis de fenilalanina. Asimismo, la estrategia podrá también incorporar la ingeniería de proteínas con el objeto de modificar algunas de las proteínas con actividades enzimáticas relevantes en la vía de biosíntesis de la fenilalanina. Concretamente, un candidato importante podría ser la enzima corismato mutasa-prefenato dehidratasa (PheA). Los estudios sobre la estructura y función de PheA han revelado que esta enzima está conformada por tres dominios. Los dos primeros dominios tienen las funciones catalíticas de corismato mutasa y prefenato deshidratasa. El tercer dominio es la región de la proteína que interviene en la unión de la fenilalanina y la inhibición alostérica (19). Con esta información es posible pensar en el diseño de una

variante de esta enzima que fuera insensible a la inhibición alostérica por la fenilalanina (20, 21). Esta modificación ocasionará que el flujo de carbono hacia fenilalanina no se vea disminuida por la presencia del mismo aminoácido. El trabajo anterior permitiría definir los elementos para construir la cepa de producción y a partir de ésta, se requeriría desarrollar un proceso fermentativo para la producción de fenilalanina con un alto rendimiento.

Bibliografía

1. Saier, M. H. Computer-aided analysis of transport protein sequences: gleaning evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiological Reviews* 58: 71-93 (1994).
2. Stryer, L. Biochemistry, 4th Edition. W. H. Freeman and Company, New York, 1999.
3. Voet, D., Voet J.G. Biochemistry, 2nd Edition. John Wiley and Sons, Inc, NY, EUA 1995.
4. Stephanopoulos, G. N., Aristidou, A. A., Nielsen, J. Metabolic engineering. Principles and methodologies. Academic Press, San Diego, 1998.
5. Flores S., Gosset, G., Flores, N., de Graaf ,A., Bolívar, F. Analysis of carbon metabolism in *Escherichia coli* strains with an inactive phosphotransferase system by ^{13}C labeling and NMR spectroscopy. *Metabolic Engineering*, 4: 124-137, (2002).
6. Fell, D.A., Thomas, S. Physiological control of metabolic flux: the requirement for multisite modulation. *Biochem. J.* 311: 35-39 (1995).
7. Alper, J. Engineering metabolism for commercial gains. *Science* 283: 1625-1626 (1999).
8. Neidhardt, F. C. (Editor en Jefe). *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1996.
9. Forberg, C, Eliaeson T, Haggstrom, L. Correlation of theoretical and experimental yields of phenylalanine from non-growing cells of a *rec Escherichia coli* strain. *J. Biotech* 7: 319-332 (1988).
10. Frost, J.W., Draths, K.M. Biocatalytic syntheses of aromatics from D-glucose: renewable microbial sources of aromatic compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 557-579 (1995).
11. Patnaik, R., Spitzer, R.G., Liao, J,C. Pathway engineering for production of aromatics in *Escherichia coli:* confirmation of stoichiometric analysis by independent modulation of AroG, TktA, and Pps activities. *Biotechnol Bioeng* 46: 361-370 (1995).

12. Flores, N., Xiao, J., Berry, A., Bolívar, F., Valle, F. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli. Nature Biotechnology* 14: 620-623 (1996).
13. Gosset, G., Yong-Xiao, J., Berry, A. A direct comparison of approaches for increasing carbon flow to aromatic biosynthesis in *Escherichia coli. J. Ind. Microbiol.* 17: 47-52 (1996).
14. LaDuca, R.J., Berry, A., Chotani, G., Dodge, T., Gosset. G., Valle, F., Liao, J.C., Xiao, J.Y., Power, S. Metabolic pathway engineering of aromatic compounds. En: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2nd Edition. Davies J.E. y Demain A.L. (eds.), *American Society for Microbiology, Washington, D.C.* pp. 605-615 1999.
15. Báez, J. L., Bolivar, F., Gosset, G. Determination of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate productivity and yield from glucose in *Escherichia coli* devoid of the glucose phosphotransferase transport system. *Biotechnol. Bioeng.* 73: 530-535 (2001).
16. Ponce, E., Flores, N., Martínez, A., Valle, F., Bolívar, F. Cloning of the two pyruvate kinase isoenzyme structural genes from *Escherichia coli:* the relative roles of these enzymes in pyruvate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 177: 5719-5727 (1995).
17. Ponce, E., Martínez, A., Bolívar, F., Valle, F. Stimulation of glucose catabolism through the pentose pathway by the absense of the two pyruvate kinase isoenzymes in *E. coli. Biotechnology and Bioengineering* 58: 292-295 (1998).
18. Frost, J.W., Lievense, J. Prospects for biocatalytic synthesis of aromatics in the 21st century. *New J. Chem.* 18: 341-348 (1994).
19. Pohnert, G., Zhang, S., Husai, A., Wilson, D.B., Ganem, B. Regulation of phenylalanine biosynthesis. Studies on the mechanism of phenylalanine binding and feedback inhibition in the *Escherichia coli* P-protein. *Biochemistry* 38: 12212-12217 (1999).
20. Zhang, S., Pohnert, G., Kongsaeree, P., Wilson, D.B., Clardy, J., Ganem, B. Chorismate mutase-prephenate dehydratase from *Escherichia coli. J. Biol. Chem.* 273: 6248-6253 (1998).
21. Neidhardt, F. C., Umbarger, H. C. Chemical composition of *Escherichia coli.* En: Neidhardt, F. C. (Editor en Jefe). *Escherichia coli* and *Salmonella.* Cellular and Molecular Biology. *American Society for Microbiology, Washington, DC* pp. 13-16 1996.

Capítulo IX

INGENIERÍA BIOQUÍMICA

O.T. Ramírez Reivich

La misión de la ingeniería bioquímica

Como ha sido señalado en capítulos anteriores, la biotecnología tiene como característica inherente conjuntar diferentes disciplinas del conocimiento para aprovechar las capacidades de seres vivos con la finalidad de proporcionar bienestar al ser humano. Una de estas disciplinas es la ingeniería bioquímica, la cual estudia el procesamiento de materiales de origen biológico para generar bienes y servicios. Los materiales biológicos que competen a la *ingeniería bioquímica* son primordialmente aquellos derivados de microorganismos, células, o sus partes. La ingeniería bioquímica se distingue de otras disciplinas afines de la biología por la aplicación de principios físicos y químicos para lograr una comprensión cuantitativa de las transformaciones biológicas. El objetivo de la ingeniería bioquímica es contribuir a la generación de productos a los menores costos, mejor calidad y mayor seguridad posibles tanto para el ser humano como para el medio ambiente. Para esto, el tema central de atención es el diseño y operación de bioprocesos eficientes y reproducibles mediante la integración de las ciencias biológicas con diversas ingenierías como la mecánica, eléctrica, económica e industrial.

El presente capítulo ofrece una perspectiva general de la ingeniería bioquímica, resumiendo algunos temas principales de esta disciplina, tales como la estequiometría y la cinética del crecimiento celular y producción de productos, los fenómenos de transportes aplicados al diseño de biorreactores, el escalamiento, la instrumentación y el control de bioprocesos. A lo largo de las diversas secciones se presentan los conceptos más relevantes, ofreciendo en la medida de lo posible ejemplos específicos de casos representativos. El capítulo es sólo una introducción somera ya que las materias tratadas son amplias y complejas, por lo que

muchas de éstas requieren descripciones más profundas y completas para una descripción cabal. Además, varios temas fundamentales de la ingeniería bioquímica, tales como catálisis enzimática, las bioseparaciones y la economía de bioprocesos, no son abordados. Por lo tanto, se recomienda al lector interesado consultar obras especializadas; un buen comienzo son las referencias (1-10).

Los orígenes de la ingeniería bioquímica y los bioprocesos

La ingeniería bioquímica e ingeniería de bioprocesos son disciplinas relativamente recientes. Surgen de la microbiología industrial y tienen como cimiento la combinación de los principios de las ingenierías química y mecánica con los de la microbiología, bioquímica y biología. Algunos de los primeros bioprocesos en que se aplicó el rigor de los principios de la ingeniería bioquímica se resumen en la tabla IX.1 y pueden ser consultados en (11) para mayores detalles.

Tabla IX.1
PRIMEROS BIOPROCESOS EN QUE SE APLICARON PRINCIPIOS DE LA INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Bioproceso	*Aplicación*	*Año y lugar de origen*
Sistemas de lodos activados	Tratamiento de aguas	1912, Inglaterra
Digestión anaerobia	Tratamiento de aguas	1930's, Alemania < s. XX, China India (procesos artesanales)
Proteína unicelular	Alimentación humana y animal	1era Guerra Mundial, Alemania
Acetona y butanol	Municiones y hule sintético	1era Guerra Mundial, Europa
Ácidos orgánicos	Acidulantes, estabilizantes	1927, E.U.A (ácido cítrico)
Etanol	Solvente, aditivo para combustibles	< s. XX, procesos artesanales en todo el mundo > s. XX, procesos tecnificados
Antibióticos	Terapéutico de uso veterinario y humano	1940, Oxford, Inglaterra

Entre los primeros bioprocesos desarrollados se encuentra el tratamiento de aguas de desecho (12). Hacia 1850, era práctica común en Inglaterra rociar campos con efluentes municipales como método para su eliminación. De ahí surgieron inicialmente los primeros filtros percoladores; sin embargo el aumento continuo de los volúmenes a tratar hacía necesario métodos más intensivos. Surgió así la aireación de las aguas de desecho como método para eliminar olores desagradables. Más tarde se empezaron a operar los reactores de forma cíclica (llenado y vaciado), permitiendo que la biomasa adherida a paredes no escapara del tanque de oxidación, con lo que se lograba mejorar sustancialmente la eficiencia del tratamiento. La aplicación de conceptos incipientes de diseño de reactores y estrategias de operación condujo en 1912 al desarrollo de los sistemas de tratamiento de aguas por lodos activados, principio que hasta la fecha aún se usa. Además de los tratamientos aerobios (en presencia de oxígeno), ya desde finales del siglo XIX se producía biogas al tratar aguas de desecho mediante fosas sépticas en China e India, dos de los países que en la actualidad más han explotado la digestión anaerobia a gran escala. Sistemas tecnificados de digestión anaerobia (en ausencia de oxígeno) empezaron a aparecer desde los años 1930's en Inglaterra y Alemania. En la actualidad, los sistemas de tratamiento de aguas constituyen los bioprocesos más grandes del mundo ya que el volumen de los reactores empleados fácilmente rebasan los millones de litros (L) (13).

Otro proceso que data de principios del siglo XX es la producción de proteína de origen microbiano llamada también unicelular como suplemento alimenticio (14). La primera producción industrial de proteína unicelular para propósitos nutritivos se remonta a la Alemania de la primera Guerra Mundial. A mediados de los años treinta, durante la segunda Guerra Mundial, Alemania ya producía 15 000 toneladas por año de levadura que era utilizada en dietas tanto de civiles como de militares. Hacia mediados de los años setenta, el proceso de producción de proteína unicelular se constituye como una verdadera insignia de la ingeniería de bioprocesos ya que representa la escala más grande alcanzada para una fermentación axénica (población de una sola especie de microorganismo, a diferencia de los sistemas de tratamiento de aguas que están basados en poblaciones mixtas), con una producción de 15 000 toneladas al año en un solo fermentador de 1 500 metros cúbicos de volumen y 60 metros de alto. El proceso se basaba en la producción de levaduras metilotróficas como *Methylophilus methylotropus* que utilizan

metanol derivado del petróleo como fuente principal de carbono (14). El caso de la proteína unicelular es quizás uno de los ejemplos más espectaculares de la ingeniería bioquímica, por lo monumental de las instalaciones, procesos, equipos y servicios requeridos, así como por el reto que consistió el traslado de los estudios experimentales iniciales en fermentadores de 5 L al complejo industrial de gran escala. Asimismo, el proceso de producción de proteína unicelular también representa una de las lecciones más interesantes sobre lo crítico que pueden resultar las interrelaciones técnicas y económicas, ya que finalmente el aumento en el precio del petróleo y la disponibilidad de otras fuentes de proteína vegetal más baratas, tales como la soya, ocasionaron que el proceso perdiera viabilidad comercial.

La producción de solventes como acetona y butanol, a partir de la fermentación de almidón por el microorganismo anaerobio *Clostridium acetobutylicum,* se encuentra entre los primeros bioprocesos industriales en los que claramente se aplicaron los principios de la ingeniería bioquímica (13). El proceso se desarrolló durante la primera Guerra Mundial como respuesta a la escasez de acetona que era usada para la fabricación de municiones. Mediante la misma fermentación se producía butanol, a partir del cual se obtenía el butadieno necesario para la fabricación de hule sintético. El proceso fue explotado con gran éxito, y para el año 1945 se producían más de 20 000 toneladas anuales de butanol por fermentación. No obstante, con la disponibilidad de petroquímicos abundantes y de bajo precio, la ruta fermentativa para producir acetona y butanol cayó en desuso. La ruta fermentativa podría retomarse en un futuro en la medida que se aumente la eficiencia del bioproceso, se agoten las reservas petroleras y aumente la demanda por procesos ambientalmente sustentables para la producción de productos químicos.

El desarrollo de la ingeniería bioquímica ha estado también ligado al desarrollo de procesos fermentativos para la producción de compuestos orgánicos y aminoácidos. En la actualidad, los ácidos orgánicos y aminoácidos que se producen por métodos biotecnológicos incluyen a los ácidos cítrico, glucónico, itacónico, 2-cetoglucónico, eritórbico, tartárico, láctico, acético, glutámico y aspártico, así como los aminoácidos lisina y triptofano (11, 14 - 16). Aunque la producción de vinagre (ácido acético usado en alimentación y obtenido por oxidación fermentativa de soluciones conteniendo etanol) se ha realizado desde hace varios milenios por métodos artesanales, no fue sino hasta finales del siglo XIX y principios del XX que surgen bioporcesos tecnificados de fermentaciones tanto sumergidas como inmovilizadas basadas en bacterias del género *Acetobacter.*

Actualmente el ácido acético como reactivo se obtiene principalmente del petróleo mientras que la producción de vinagre sigue siendo por métodos biotecnológicos. Por otro lado, entre los procesos tecnificados más antiguos para producir un ácido orgánico se encuentra el del ácido cítrico. En 1893 Whemer demostró que el ácido cítrico, producido hasta entonces por extracción de jugo de limón o por síntesis química, era un metabolito producido por ciertos hongos. Treinta años más tarde se desarrolló en Estados Unidos un bioproceso basado en la fermentación del hongo *Aspergillus niger* que podía competir comercialmente con los métodos extractivos y de síntesis química, rompiendo así el monopolio europeo de la producción de ácido cítrico. Desde entonces, los bioprocesos se han tecnificado cada vez más y en la actualidad la producción de ácido cítrico por *A. niger* sigue dominando el mercado (15).

El desarrollo de bioprocesos comerciales para satisfacer el enorme mercado de los antibióticos, surgido a raíz del descubrimiento de la penicilina, ilustra claramente el gran valor de la ingeniería de bioprocesos. En 1928 Fleming descubre la penicilina en un caso clásico de serendipia (17, 18). Sin embargo, no fue sino hasta 12 años después cuando Florey y Chain retoman tal hallazgo y demuestran la efectividad clínica del antibiótico en un hombre infectado por *Streptomyces aureus* y *S. pyrogenes* (17, 18). La cantidad necesaria de penicilina para tratar a este primer paciente se obtuvo de cultivos superficiales (crecimiento en condiciones estáticas en la superficie gas/líquido) del hongo *Penicillium notatum* y a través de una labor titánica usando métodos de laboratorio poco eficientes y rudimentarios. Desafortunadamente, el paciente murió después de una recaída al no haber disponible más penicilina, evidenciando que no basta con el descubrimiento científico sino que es igualmente importante disponer de procesos prácticos y económicamente viables para producir a tiempo y en abundancia bienes derivados de los hallazgos fundamentales. Fue entonces que químicos vueltos ingenieros de bioprocesos, como Heatley y Elder, transformaron aquellos procesos rudimentarios en métodos masivos de producción de penicilina. Hacia el año 1943, tales bioprocesos ya generaban alrededor de miles de millones de dosis (17, 18). Así, la ingeniería bioquímica transformó en muy poco tiempo un descubrimiento científico, que generaba concentraciones muy bajas del producto a precios exorbitantes, en una realidad práctica. Es interesante notar que en 1940 no existían métodos aprobados para la producción de fármacos por fermentación, por lo que las empresas farmacéuticas de la época emprendieron la síntesis química de la penicilina como la alternativa que se pensaba sería la más viable comercialmente. No obstante,

tal ruta resultó ser extremadamente compleja por lo que el proceso biotecnológico finalmente predominó. Actualmente la penicilina se produce por cultivo sumergido de *Penicillium chrysogenum* y es uno de los productos más baratos de la biotecnología, con un precio de $15 dólares por kilogramo y producciones anuales en el orden de las decenas de miles de toneladas. Además, existe en la actualidad una gran cantidad de distintos antibióticos (e.g. gramicidina, tirocidina, estreptomicina, actinomicina, amfotericina B, ampicilina, neomicina, eritromicina, rifampicina, etc.) producidos completa o parcialmente por fermentación.

La ingeniería bioquímica moderna

A lo largo del siglo XX la ingeniería bioquímica ha evolucionado rápidamente, incorporando el conocimiento generado en otras disciplinas, tales como la biología molecular, la genómica, la electrónica y la computación, por mencionar sólo algunas. La ingeniería bioquímica moderna es actualmente una actividad eminentemente multidisciplinaria (figura IX.1). Esto ha propiciado una transformación de los bioprocesos tradicionales (algunos descritos en la sección anterior), en los modernos. Hasta hace algunas décadas, los bioprocesos eran monumentales debido a sus grandes escalas. En la actualidad, los bioprocesos modernos no necesariamente son grandes en tamaño sino que son monumentales por el gran valor agregado de sus productos. Una discusión detallada del cambio de paradigma que se ha dado en la ingeniería bioquímica durante el último cuarto de siglo así como ejemplos de bioprocesos modernos se pueden encontrar en (19).

La ingeniería bioquímica estudia al ente biológico, es decir a la célula viva o sus componentes que se utilizan en los diferentes procesos, a través de una descripción cuantitativa de las relaciones cinéticas, estequiométricas y termodinámicas que rigen el crecimiento celular, el consumo de nutrimentos, la generación y transformación de productos, las dinámicas poblacionales y demás transformaciones características de los procesos celulares. Asimismo, la ingeniería bioquímica estudia tanto al entorno fisicoquímico donde el ente biológico se desarrolla, como a los fenómenos de transporte mediante los cuales se determinan diversas variables fisicoquímicas que afectarán el desempeño del ente biológico. La ingeniería bioquímica también trata con el ente mecánico, es decir, el diseño de equipos, sistemas, materiales y accesorios que contienen

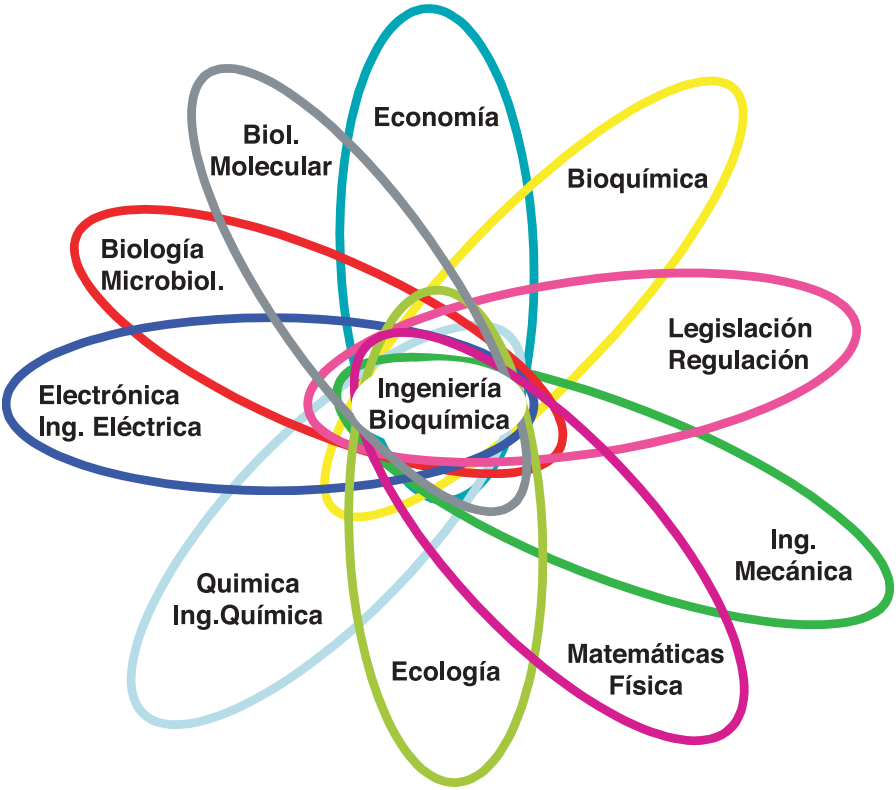


Figura IX.1

PRINCIPALES DISCIPLINAS QUE NUTREN Y SUSTENTAN A LA INGENIERÍA BIOQUÍMICA

La ingeniería bioquímica es una actividad eminentemente multidisciplinaria, sustentada por todas las disciplinas que se presentan en la figura.

e interaccionan con el ente biológico. El ente mecánico determina los fenómenos de transporte, y se necesita para establecer mediciones y acciones de control para operar adecuadamente un bioproceso. Finalmente, la ingeniería bioquímica estudia la interrelación entre las distintas facetas mencionadas para así poder escalar a nivel comercial un bioproceso que cumpla con exigencias tanto técnicas como económicas y de seguridad ambiental y humana. Los distintos ámbitos de estudio de la ingeniería bioquímica se representan esquemáticamente en la figura IX.2. En las siguientes secciones, se abordan con mayor detalle algunas de las facetas principales de estudio de la ingeniería bioquímica.

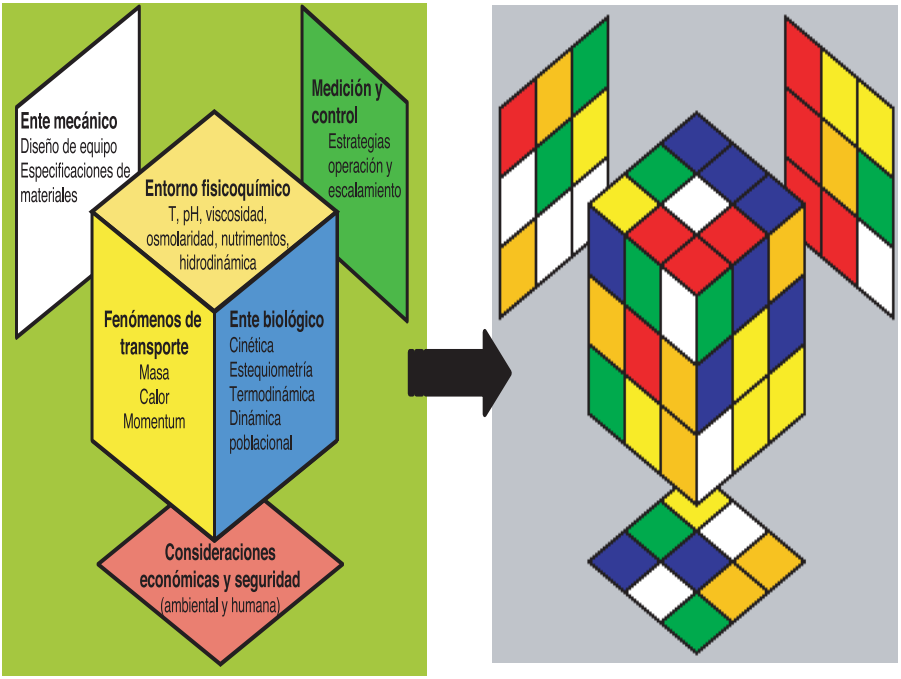


Figura IX.2
ÁMBITOS DE ESTUDIO DE LA INGENIERÍA BIOQUÍMICA
Todas las facetas se encuentran estrechamente relacionadas entre sí y es necesario integrarlas durante el desarrollo de un bioproceso.

El cultivo de microorganismos, células y tejidos para la generación de productos

Una de las actividades centrales de la ingeniería bioquímica es sin duda alguna el cultivo, ya sea de microorganismos, células o tejidos, para la generación de una gran cantidad de productos dentro de una amplia variedad de aplicaciones. En términos generales, los productos del cultivo celular se pueden dividir en tres grandes categorías: productos generados por las células cultivadas, las propias células y productos generados por transformaciones celulares. En la tabla IX.2 se muestran tales categorías y los campos de aplicación de los productos generados. Una discusión más detallada sobre productos y mercados de la biotecnología se puede encontrar en revisiones recientes (20-22).

Tabla IX.2
TIPO DE PRODUCTOS DEL CULTIVO CELULAR Y SUS APLICACIONES

Categoría	*Ejemplos de productos*	*Area de aplicación*
Metabolitos o productos generados por células cultivadas	Ácidos orgánicos, enzimas, antibióticos, proteínas, solventes, colorantes, etanol, vitaminas, nucleótidos, virus	Alimentos, química, energía farmacéutica (diagnóstico, terapia, profilaxis), cosméticos, agricultura
Las propias células cultivadas como productos	Proteína unicelular, tejidos y órganos para transplantes, bioinsecticidas	Alimentos, medicina, agricultura
Biotransformaciones efectuadas por las células cultivadas o sus componentes	Tratamiento de agua, aire y suelo Transformaciones enzimáticas	Biorremediación, contaminación ambiental, alimentos, síntesis química

En la actualidad el ingeniero bioquímico tiene a su disposición una gran cantidad de distintos organismos y células para producir el producto de interés. Esto se debe, en buena medida, a los avances en ingeniería genética los cuales han posibilitado la clonación de genes de una especie en virtualmente cualquier célula de otra especie. La selección del organismo utilizado dependerá estrechamente del campo de aplicación del producto. Por ejemplo, en aplicaciones alimentarias es necesario emplear organismos "generalmente reconocidos como seguros" (o GRAS por sus siglas en inglés), mientras que en la industria farmacéutica es fundamental demostrar que las células utilizadas estén libres de agentes adventicios infecciosos. Por otro lado, las características del producto también determinarán el tipo de célula a ser empleada. Así como se ha visto en capítulos anteriores, *Escherichia coli* es comúnmente utilizada para la producción de proteínas recombinantes carentes de modificaciones postraduccionales, mientras que levaduras y células de insecto son preferidas cuando es necesario producir complejos proteicos multiméricos tales como vacunas constituidas por pseudopartículas virales (20-22). En caso de que el producto sea una proteína recombinante con glicosilaciones complejas entonces es indispensable emplear células de mamífero como hospederos (20-22). En algunas situaciones, como la expan-

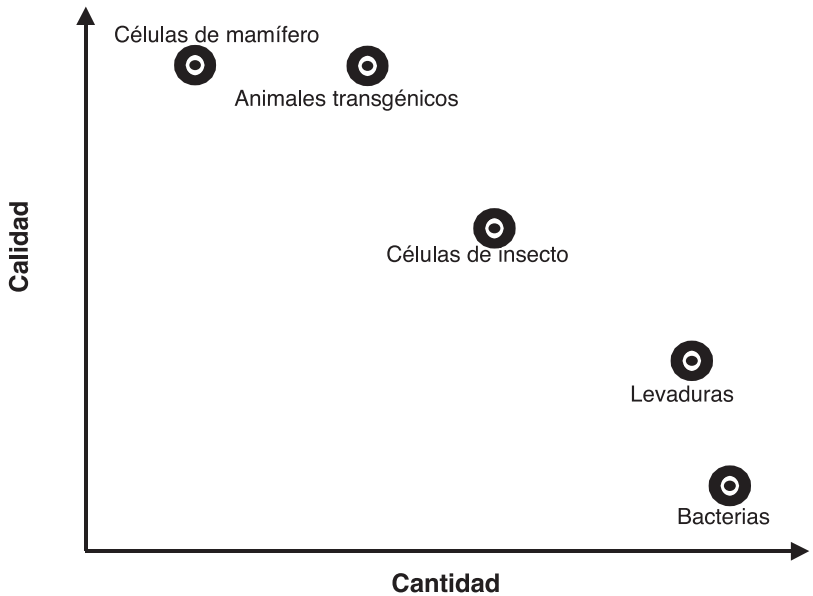


Figura IX.3

SELECCIÓN DEL HOSPEDERO PARA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

En general los sistemas de mayor productividad producen proteínas recombinantes de baja complejidad (modificaciones postraduccionales incompletas o nulas). En aplicaciones como la farmacéutica y médica, modificaciones postraduccionales, tales como la glicosilación, son fundamentales para la actividad biológica de la proteína, por lo que es necesario expresarlas en hospederos como animales transgénicos o células animales. En otros campos, como enzimas de uso en alimentos o en detergentes, modificaciones postraduccionales similares a las humanas no juegan en general un papel determinante, por lo que los hospederos preferidos son bacterias o levaduras.

sión de tejidos para transplantes, las opciones estarán limitadas a células del propio paciente o donadores histocompatibles (19). Durante la selección del hospedero es necesario considerar tanto la productividad como la calidad (modificaciones postraduccionales, conformación tridimensional, actividad biológica, etc.) del producto. En general, hospederos con altas productividades tienen una limitada capacidad para generar productos con calidad adecuada, mientras que aquellos que producen el producto con la calidad adecuada presentan bajas productividades (figura IX.3).

La selección del organismo determinará a su vez el bioproceso. Entre las consideraciones fundamentales se deberá definir si se emplearán células recombinantes u organismos no modificados genéticamente; si se tratará con cultivos axénicos o mixtos; y si el sistema será abierto o cerrado. La función de la ingeniería bioquímica será entonces integrar y articular las consideraciones particulares del producto de interés y su campo de aplicación con las del hospedero o célula seleccionada para diseñar un bioproceso óptimo. Por ejemplo, un bioproceso basado en un organismo procarionte como las bacterias será completamente distinto a uno basado en células de eucarionte superior (células de levaduras o de un organismo pluricelular o animal). En el primer caso, las células bacterianas pueden crecer rápidamente en medios de cultivo sencillos y baratos, alcanzar altas concentraciones de biomasa y producto, tolerar altos esfuerzos de corte, y soportar intervalos relativamente amplios en variables críticas de proceso, tales como oxígeno disuelto, temperatura y pH. Por el contrario, el cultivo de células de eucarionte superior presenta alta sensibilidad a los esfuerzos de corte, requiere medios de cultivo complejos, caros y sofisticados, así como un control estricto de variables ambientales en intervalos estrechos. Además, las velocidades de crecimiento, concentraciones celulares y de producto de un cultivo de células animales son de uno a varios órdenes de magnitud inferiores a las alcanzadas en cultivos bacterianos. Muchos productos sintetizados por procariontes se acumulan intracelularmente en forma inactiva, mientras que las células animales son capaces de secretar el producto al medio de cultivo en su forma activa. Como resultado, los mayores costos asociados a un bioproceso basado en procariontes se encuentran típicamente en las etapas de separación y purificación, mientras que para uno basado en células de eucariontes superiores se encuentran en la etapa de cultivo celular. Para una descripción de los componentes típicos de un bioproceso y cómo dependen de la naturaleza del producto y del tipo de célula empleada se recomienda consultar (19).

Entendiendo las características y requerimientos de la célula para producir metabolitos

El entendimiento cuantitativo de las características y necesidades celulares es un requisito indispensable para establecer un bioproceso que cumpla con las estipulaciones indicadas en la primera sección de este

capítulo. Tal entendimiento lo logra la ingeniería bioquímica a través del estudio de la estequiometría, termodinámica y cinética tanto del crecimiento celular como del consumo de nutrimentos y producción de metabolitos.

El primer aspecto necesario para desarrollar un cultivo óptimo es diseñar un medio de cultivo que contenga los factores nutricionales que sirvan simultáneamente como fuente de energía utilizada para todos los procesos metabólicos y como fuente de materiales para la síntesis de biomasa y productos. Las necesidades nutricionales dependerán estrechamente del organismo en cuestión. Por ejemplo, los organismos llamados autótrofos, como algas y plantas, son seres vivos que sólo requieren dióxido de carbono como fuente de carbono, mientras que los llamados heterótrofos, como bacterias, levaduras y células animales, requieren carbono en formas moleculares más complejas tales como los carbohidratos. En esta sección la discusión se centrará en los organismos heterótrofos ya que son los de mayor importancia para la mayoría de los bioprocesos comerciales que se han desarrollado.

Estequiometría del crecimiento celular y producción de metabolitos

El crecimiento celular obedece las leyes de la conservación de la materia y de la energía, y es posible describirlo mediante las reacciones químicas involucradas en la transformación de los nutrimentos en biomasa y productos. Como se ha señalado en capítulos previos, en una célula ocurren simultáneamente cientos de reacciones químicas que constituyen parte de su metabolismo. No obstante, para los propósitos del ingeniero bioquímico, en ocasiones es suficiente describir el crecimiento celular, el consumo de nutrimentos y la producción de productos mediante un balance global de materia. Para el caso de organismos heterótrofos aerobios, tal balance se puede representar por medio de la siguiente ecuación:

$$\text{Fuente de C} + \text{Fuente de N} + O_2 \longrightarrow \text{Biomasa} + \text{Producto} + CO_2 + H_2O \quad (1)$$

donde la biomasa se refiere a las células producidas. Como se muestra en la tabla IX.3, los microorganismos presentan contenidos típicos de componentes orgánicos e inorgánicos. Por lo tanto, conociendo el análisis

elemental de la biomasa, el tipo de nutrimentos empleados y productos generados, es posible asignar una fórmula química a cada uno de estos componentes por lo que la ecuación 1 se puede expresar como:

$$\phi_2 C_{A_2} H_{B_2} O_{C_2} N_{D_2} + \phi_{A_4} C_{A_4} H_{B_4} O_{C_4} N_{D_4} + \phi_5 O_2 \rightarrow \phi_1 CH_{B_1} O_{C_1} N_{D_1} + \phi_3 C_{A_3} H_{B_3} O_{C_3} N_{D_3} +$$
$$+ \phi_6 CO_2 + \phi_7 H_2O \qquad (2)$$

donde ϕ_i son los flujos molares o coeficientes estequiométricos del componente i, y los subíndices A_i a D_i dependen de la fórmula química del componente i. Los flujos molares o coeficientes estequiométricos indican la cantidad necesaria de algún sustrato para generar una cantidad dada de algún producto. Para la fórmula química de la biomasa, sustratos y productos es común considerar solamente al C, H, O, y N ya que el resto de los elementos indicados en la tabla IX.3 representan por lo general menos de 5 % en peso seco. La ecuación 2 es pues una simplificación y contempla una sola fuente de carbono, una de nitrógeno y un solo producto. Para sistemas sencillos, como bacterias creciendo en medios minerales, tal simplificación puede aproximar cercanamente a la situación real, mientras que para sistemas más complejos, como células animales creciendo en medios indefinidos con múltiples fuentes de carbono y nitrógeno (sueros, extractos proteicos, etc.), hormonas y factores de crecimiento, la aplicación de la ecuación 2 implicará consideraciones adicionales. Por ejemplo, en el caso de que existan varios sustratos y productos, se podrán adicionar en la ecuación 2 o bien asignarles una fórmula química promedio de los diversos substratos y productos. Es importante señalar que tanto los coeficientes estequiométricos como la composición misma de la biomasa pueden depender de las condiciones de cultivo. Por ejemplo, el porcentaje de proteína y carbohidrato de una célula podrá cambiar en función de la velocidad de crecimiento y el tipo de sustrato limitante. Una fórmula química comúnmente usada para biomasa es $CH_{1.91}O_{0.3}N_{0.24}$. Fórmulas químicas para distintas células bajo distintas condiciones de cultivo se reportan en la referencia (23).

Con base en el balance macroscópico representado por la ecuación 2 se puede establecer un sistema de cuatro ecuaciones algebraicas correspondientes a la conservación de cada uno de los cuatro elementos químicos considerados. De tal forma, el sistema de ecuaciones se podrá resolver si se conoce la fórmula molecular de cada uno de los componentes y por lo menos tres de los siete coeficientes estequiométricos. Alternativamente, conociendo un mayor número de coeficientes este-

Tabla IX.3
COMPOSICIÓN TÍPICA DE COMPONENTES ORGÁNICOS
E INORGÁNICOS DE UN MICROORGANISMO

Componente	*Porcentaje en peso*	*Componente*	*Porcentaje en peso*
Proteína	50 - 60	Carbono	46 - 52
Carbohidrato	6 - 15	Oxígeno	18 - 22
Lípido	5 - 10	Nitrógeno	10 - 14
Acido nucléico	15 - 25	Hidrógeno	7 - 9
Cenizas	4 - 10	Fósforo	2 - 3
		Azufre	0.2 - 1
		Potasio	1.0 - 4.5
		Magnesio	0.1 - 0.5
		Sodio	0.5 - 1.0
		Calcio	0.01 - 1.1
		Fierro	0.02 - 0.2
		Cobre	0.01 - 0.02
		Manganeso	0.001 - 0.01
		Cloro	< 0.5

quiométricos es posible determinar la fórmula de alguno de los componentes. De cualquier manera, el número de variables que es necesario medir para describir totalmente al sistema se le conoce como grados de libertad. Los coeficientes estequiométricos se pueden obtener fácilmente mediante determinaciones experimentales de la cantidad de sustratos consumidos o productos producidos. En la tabla IX.4 se reportan rendimientos (relaciones de coeficientes estequiométricos) típicos de diversos cultivos. La importancia de los balances macroscópicos radica en la posibilidad de realizar predicciones sobre necesidades nutricionales o rendimientos del producto de interés, con lo cual se puede por ejemplo diseñar más racionalmente los medios de cultivo, determinar las necesidades de oxígeno, hacer balances económicos para determinar la viabilidad de un proceso en particular para generar el producto deseado, o inclusive corroborar mediciones experimentales y por ende el funcionamiento de sensores y equipo de medición.

Otro caso de balance macroscópico se basa en la conservación de carbono y del grado de reducción o número de electrones disponibles en cada componente. En este caso es posible, además de los balances de materia, generar relaciones sobre la cantidad de energía liberada durante el cultivo celular. Tal información es útil para el diseño del sistema de trans-

Tabla IX.4
COEFICIENTES ESTEQUIOMÉTRICOS
Y CONSTANTES CINÉTICAS TÍPICOS

Rendimiento de biomasa sobre azúcares (bacterias/aerobio)	0.18 - 0.65 g biomasa/g sustrato
Rendimiento de biomasa sobre azúcares (bacterias/anaerobio)	0.05 - 0.1 g biomasa/g sustrato
Rendimiento de biomasa sobre alcoholes (bacterias/aerobio)	0.19 - 0.7 g biomasa/g sustrato
Rendimiento de biomasa sobre n-parafinas (bacterias/aerobio)	0.7 - 1.3 g biomasa/g sustrato
Rendimiento de oxígeno sobre biomasa	1.0 - 3.0 g de O_2/g biomasa
Rendimiento de biomasa por ATP	10.7 g biomasa/mol ATP
Rendimiento de calor por célula (cultivos microbianos)	3 - 20 kcal/g biomasa
Rendimiento de calor por célula (células animales)	0.1 - 80 pW/célula
Velocidad específica máxima de crecimiento (bacterias, levaduras)	0.2 - 2.0 1/h
Velocidad específica máxima de crecimiento (células animales)	0.01 - 0.05 1/h
Constante de saturación *Escherichia* en glucosa	0.07 g/L
Constante de saturación *Escherichia* en manitol	2.0 g/L
Constante de saturación *Escherichia* en lactosa	20.0 g/L
Coeficiente de mantenimiento (bacterias, levaduras)	0.1 - 3.7 g glucosa/g biomasa-h
Velocidad específica de consumo de oxígeno (bacterias, levaduras)	3.0 - 11.0 mM O_2/g biomasa-h

Adaptado de (5, 23)

ferencia de calor de un biorreactor, el cual es necesario para mantener la temperatura de operación dentro de los intervalos óptimos. Existen casos en los que el conocimiento detallado de las rutas metabólicas de un microorganismo puede generar restricciones estequiométricas mediante las cuales se disminuye el número de grados de libertad y por ende se reduce el número de variables que es necesario conocer para determinar completamente al sistema. A este tipo de balances, que incorporan información sobre el mecanismo de la transformación de sustra-

tos hacia productos a través de las diversas vías metabólicas de un organismo, se les conoce como balances estructurados. Para una discusión más detallada sobre estequiometría así como la termodinámica del crecimiento celular se recomienda consultar las referencias (24, 25).

Cinética del crecimiento celular y producción de metabolitos

Los balances anteriores aplican sólo para el estado estacionario, es decir, cuando todas las variables permanecen constantes con respecto al tiempo, incluyendo la composición de la biomasa. No obstante, en la mayoría de las condiciones prácticas se presentan situaciones cambiantes, por lo que es necesario estudiar el comportamiento cinético del cultivo. Por ejemplo, la figura IX.4 muestra el cambio con respecto al tiempo (t) de variables relevantes de un cultivo por lotes típico. Este modo de cultivo consiste en agregar inicialmente un inóculo a un medio de cultivo fresco; después de una fase "lag" las células empezarán a crecer exponencialmente consumiendo el sustrato disponible; al agotarse el sustrato (S) limitante, el crecimiento cesa, iniciándose la fase estacionaria; finalmente ocurre la fase de muerte al perderse las condiciones propicias que mantienen la viabilidad celular. En caso de no existir un control sobre los parámetros ambientales, variables como el pH y el oxígeno disuelto también cambiarán continuamente a lo largo del cultivo lote (ver sección 6). La descripción cuantitativa a través de modelos matemáticos de las cinéticas de fenómenos que ocurren en un bioproceso, como el mostrado en la figura IX.4, es uno de los ejes principales de la labor del ingeniero bioquímico. Los modelos cinéticos permiten no solamente predecir el comportamiento de un bioproceso sino que son también una herramienta fundamental para idear sistemas y equipos, así como sus modos de operación y control respectivos. Además, el diseño de experimentos y la interpretación de los resultados puede mejorarse mediante el uso de dichos modelos, lográndose con esto un entendimiento más profundo y riguroso de los procesos celulares y fisicoquímicos participantes. Por su importancia, las cinéticas de crecimiento, consumo de sustrato y producción de producto casi siempre forman parte de los modelos básicos que describen un cultivo. Para la fase de crecimiento exponencial (figura IX.4), la generación de biomasa sigue una cinética de primer orden descrita por la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \tag{3}$$

donde X es la concentración de biomasa, t es el tiempo y μ es la velocidad específica de crecimiento. Para fines del modelamiento, resulta práctico dividir la cantidad de sustrato consumido en dos grupos: aquella fracción que es utilizada por la célula para generar más biomasa y aquella que se canaliza a productos o se requiere para proporcionar la energía necesaria para funciones celulares vitales tales como motilidad, mantenimiento de gradientes, transporte de sustancias, reparación de DNA, etc. De tal forma, el consumo de sustrato con relación al tiempo (dS/dt) se puede expresar como:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{\mu}{Y_{x/s}} X + m_s X \tag{4}$$

donde S es la concentración de sustrato limitante, $Y_{X/S}$ es el rendimiento de biomasa sobre sustrato y m_s es el coeficiente de mantenimiento. El primer término del lado derecho de la ecuación 4 corresponde a la cantidad de sustrato consumido para generación de biomasa, mientras que el segundo término corresponde al sustrato consumido para las demás funciones celulares. Como se muestra en la figura IX.4, la producción de producto puede darse exclusivamente cuando las células crecen (producción asociada al crecimiento) o alternativamente cuando las células están vivas, independientemente si crecen o no (producción no asociada al crecimiento). También puede ocurrir un comportamiento mixto (parcialmente asociado al crecimiento). Cualquiera de estos tres casos se puede describir mediante el modelo propuesto por Luedeking y Piret:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha\mu X + \beta X \tag{5}$$

donde P es la concentración de producto, α es el coeficiente de producción asociado a crecimiento (o rendimiento de producto sobre biomasa) y β es el coeficiente de producción no asociado a crecimiento (o velocidad específica de producción de producto).

Las ecuaciones 3 a 5 conforman un sistema de ecuaciones diferenciales que deben resolverse simultáneamente para determinar la funcionalidad de cada una de las variables con respecto al tiempo. Este sistema de

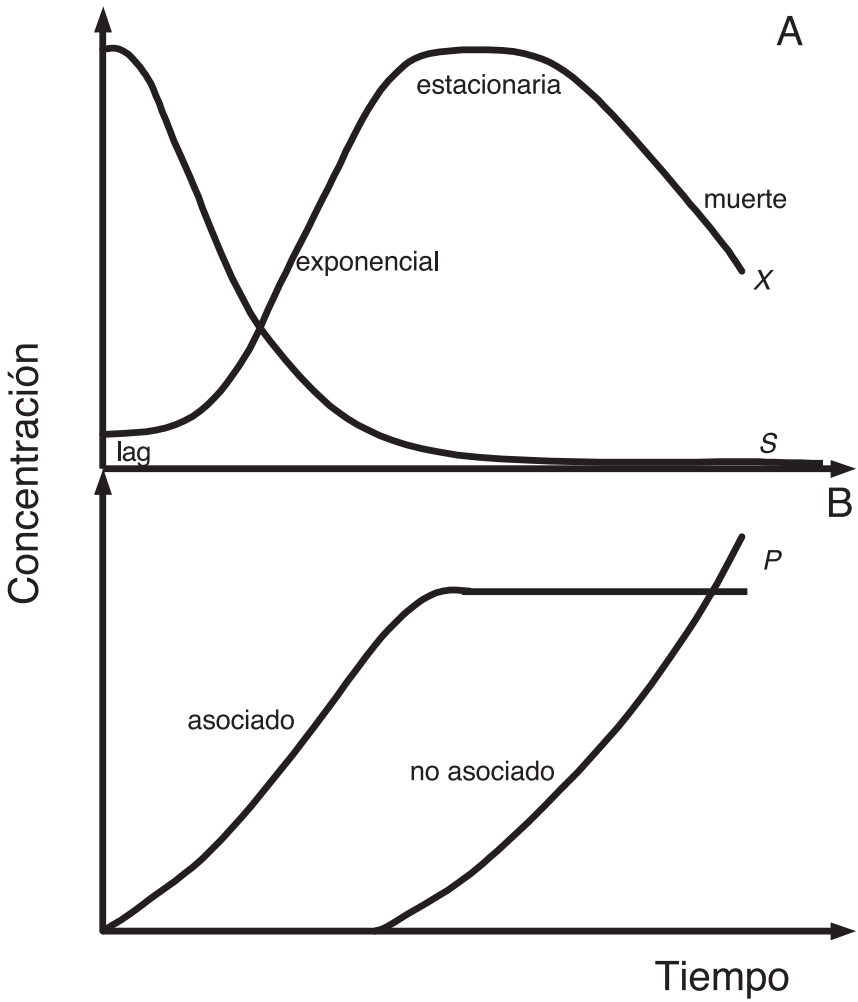


Figura IX.4
COMPORTAMIENTO CINÉTICO TÍPICO DE UN CULTIVO OPERADO POR LOTES
Se muestran las fases características del cultivo (panel A) y dos tipos de cinéticas de producción de producto (panel B). X, S y P se refieren a las concentraciones de biomasa, sustrato y producto, respectivamente.

Las concentraciones de biomasa y productos en cultivos bacterianos y de levaduras puede ser superiores a los 100 g/L y 10 g/L, respectivamente, mientras que para el caso del cultivo de células animales, las concentraciones máximas de biomasa y de producto son de uno a varios órdenes de magnitud inferiores.

ecuaciones se presenta aquí simplemente a manera de ejemplo, ya que, dependiendo del cultivo y condiciones particulares, se podrían proponer modelos distintos ya sea para las mismas variables o para variables adicionales. Asimismo, las ecuaciones 3 a 5 son relativamente sencillas, sólo describen el comportamiento macroscópico promedio y proporcionan poca información sobre los mecanismos involucrados en las transformaciones representadas o sobre aspectos individuales de subpoblaciones celulares. En caso de que la descripción de tales detalles sea importante, el ingeniero bioquímico puede recurrir al desarrollo de modelos estructurados, que si bien son más complejos y menos generales, proporcionan información específica y representan más cercanamente un proceso particular estudiado. Es importante señalar que los diversos parámetros y constantes que se incorporan en los modelos cinéticos pueden ser simplemente coeficientes de ajustes a datos experimentales y constantes de proporcionalidad sin ningún significado tangible, o bien representar magnitudes sobre algún proceso físico, químico o biológico.

El modelo propuesto por Monod es, por su sencillez y generalidad, uno de los más ampliamente utilizados para describir adecuadamente la velocidad de crecimiento de un gran número de cultivos. El modelo de Monod establece una relación de tipo hiperbólico entre μ y la concentración de sustrato limitante (figura IX.5) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\mu = \mu_m \frac{S}{[K_s + S]} \tag{6}$$

donde μ_m es la máxima velocidad específica de crecimiento y K_s es la constante de saturación. Físicamente, K_s representa la afinidad de un organismo por el sustrato limitante y corresponde al valor del sustrato al cual la μ es igual a la mitad de la μ_m. Tanto μ_m como K_s pueden determinarse experimentalmente en forma sencilla realizando un barrido de cultivos a diferentes μ mediante la manipulación de S y graficando los resultados tal como se muestra en el inserto de la figura IX.5. Valores típicos de μ_m y K_s para cultivos diversos se resumen en la tabla IX.4. Combinando las ecuaciones 3 y 6, e integrando se obtiene la expresión que describe la concentración de biomasa en función del tiempo para un cultivo en fase exponencial:

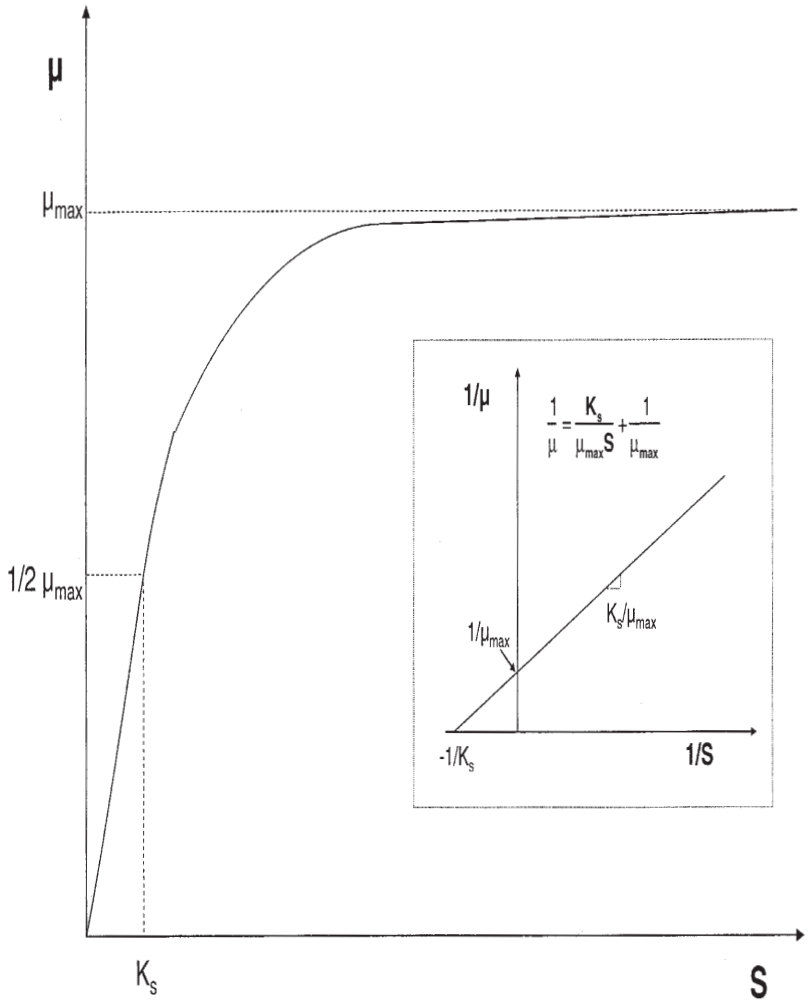


Figura IX.5

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO LIMITANTE S, SOBRE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE CRECIMIENTO μ, DE ACUERDO CON LA PREDICCIÓN DEL MODELO DE MONOD

En el recuadro se muestra la gráfica tipo Lineweaver-Burk (o de doble inversos). La constante de saturación, Ks, refleja la afinidad de una célula por un sustrato en particular, de tal forma que un valor alto de Ks indicará que se requiere una concentración alta del sustrato para alcanzar la máxima velocidad de crecimiento, mientras que células exhibiendo bajos valores de Ks podrán crecer a la máxima velocidad a concentraciones muy bajas de sustrato.

$$X = X_0 e^{[\mu t]} \tag{7}$$

De la ecuación 7 se puede obtener directamente el tiempo de duplicación, t_d (cuando X es igual a $2X_0$, siendo X_0 la concentración inicial de biomasa):

$$t_d = \frac{Ln2}{\mu} \tag{8}$$

donde Ln es logaritmo natural.

El modelo de Monod es simplemente uno de los muchos modelos que existen o que se pueden proponer. El modelo específico empleado o desarrollado dependerá de la experiencia y habilidad del ingeniero bioquímico y deberá ajustarse a las peculiaridades del sistema en cuestión.

Tabla IX.5
ALGUNOS MODELOS COMÚNMENTE EMPLEADOS
PARA DESCRIBIR CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

Ecuación logística	$X = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 - \frac{1}{X_m} X_0 \left(1 - e^{\mu t}\right)}$
Cuando dos sustratos limitan simultánemente	$\mu = \mu_m \left(\frac{S_1}{K_{S_1} + S_1}\right)\left(\frac{S_2}{K_{S_2} + S_2}\right)$
Modelo de Tessier	$\mu = \mu_{max}\left(1 - e^{-S/K_s}\right)$
Modelo de Moser	$\mu = \mu_{max}\left(1 + K_s S^{-\lambda}\right)^{-1}$
Modelo de Contois	$\mu = \mu_{max} \frac{S}{BX + S}$
Modelo de Powell	$\mu = \frac{\mu_{max}(K_S + L + S)}{2L}\left[1 - \frac{\sqrt{1 - 4LS}}{(K_S + L + S)^2}\right]$

Donde: X_m es concentración celular máxima, S_1 y S_2 son las concentraciones de los sustratos 1 y 2, respectivamente, Ks_1 y Ks_2 son las constantes de saturación para los sustratos 1 y 2, respectivamente, λ y B son parámetros empíricos, y L es un parámetro que depende de la resistencia difusional de sustrato alrededor de las células.

En la tabla IX.5 se presentan algunos otros ejemplos de modelos comúnmente empleados para describir el crecimiento. Como se describe en la siguiente sección, un modelo cinético del comportamiento celular generalmente se deberá combinar con otros modelos de transporte (transferencia de masa, momentum y calor), de balance (modos de operación del cultivo) y otros inherentes al diseño de equipo y sistema de control para describir completa y adecuadamente un bioproceso. Se recomienda al lector interesado en profundizar sobre el tema de modelamiento cinético, particularmente modelos estructurados, consultar las referencias (1-6, 10, 26).

Funcionamiento y diseño de biorreactores: importancia del entorno celular

La generación del mejor ente biológico (como cepas seleccionadas o recombinantes y proteínas mutantes) para un bioproceso en particular es materia de la biología celular, biología molecular, microbiología e ingeniería de proteínas, entre otras disciplinas. No obstante, para que el desempeño de tal ente biológico sea el más adecuado es necesario proporcionarle un entorno propicio, lo cual es tema principal de la ingeniería bioquímica. Para lograr lo anterior, el bioingeniero recurre al diseño de reactores y de las estrategias para operarlos y controlarlos. El término "biorreactor" o "fermentador" se refiere al equipo donde se efectúa la transformación biológica, particularmente el crecimiento celular, y aunque aquí se usarán los dos términos indistintamente, en general el segundo se aplica sólo para el caso de cultivos microbianos. El diseño de reactores y equipos para efectuar transformaciones enzimáticas así como separaciones y purificaciones de moléculas de origen biológico también es materia de la ingeniería bioquímica, pero no será abordado en este capítulo por lo que se recomienda consultar las referencias (1-10, 26, 27).

Un biorreactor tiene como función principal contener al ente biológico en un entorno óptimo garantizando la seguridad tanto del medio ambiente como de los operadores y del propio cultivo. Para esto, la mayoría de los biorreactores están diseñados para ser esterilizados y mantener la esterilidad durante su operación, por lo que generalmente se construyen de acero inoxidable con el fin de poder soportar altas temperaturas y presión, aunque existen sistemas abiertos como diques, fosas y demás obras civiles de gran escala empleadas comúnmente para siste-

mas de tratamiento de aguas u otras aplicaciones en las que no es necesario mantener una población axénica. Para biorreactores de pequeña escala (menores a los 15 L) el material de construcción preferido es el vidrio. También existen ciertos biorreactores especializados, como cartuchos de fibras huecas, construidos de material plástico desechable y que son esterilizados por métodos distintos al calor (por ejemplo, agentes químicos o radiación). Además de lo anterior, un biorreactor ideal deberá ser capaz de mantener condiciones adecuadas de homogeneidad, poseer alta capacidad para transferir calor y oxígeno (en caso de cultivos aerobios), permitir el establecimiento práctico de estrategias de operación, medición y control de variables, y poderse escalar fácilmente. Para esto se ha ideado una gran cantidad de distintos diseños de biorreactores, cada uno con diversas ventajas y desventajas y cuya selección dependerá del cultivo y producto particular en cuestión.

Los componentes comunes a casi cualquier tipo de biorreactor son: barreras físicas que garantizan la contención biológica (filtros, empaques, sellos, trampas de vapor, etc.); sistema de transferencia de oxígeno (difusores de gases e impulsores); sistema de transferencia de energía calorífica o calor para esterilización y/o enfriamiento (chaqueta o serpentín); sistema de transferencia de momentum para mantener la homogeneidad (impulsores, deflectores y difusores de gases); puertos para la inoculación, la toma de muestra, la adición de reactivos (nutrimentos, antiespumante, base, ácido) y la inserción de dispositivos y sensores de medición; y mirillas y equipo de seguridad (válvulas de alivio, discos de ruptura). Además, los biorreactores tienen múltiples conecciones a instrumentación y equipo de medición para control del bioproceso (ver sección 6 más adelante). Algunos diseños representativos de biorreactores se ilustran en la figura IX.6.

Existen biorreactores agitados mecánicamente (figura IX.6A) o neumáticamente tales como columnas de burbujeo y air-lift (figuras IX.6B y C, respectivamente). El patrón de flujo de los biorreactores agitados mecánicamente dependerá del impulsor usado, los cuales hay disponibles en una gran variedad de diseños. A su vez, el patrón de flujo circulatorio, característico de los biorreactores tipo air-lift, se establece gracias a la diferencia de densidades del medio entre la sección ascendente donde se coloca el difusor y el tubo de descenso. En los tres tipos de biorreactores anteriores las células se cultivan en forma suspendida o inclusive unidas a microacarreadores que también se encuentran suspendidos. En contraste, existen reactores con células inmovilizadas, como los mostra-

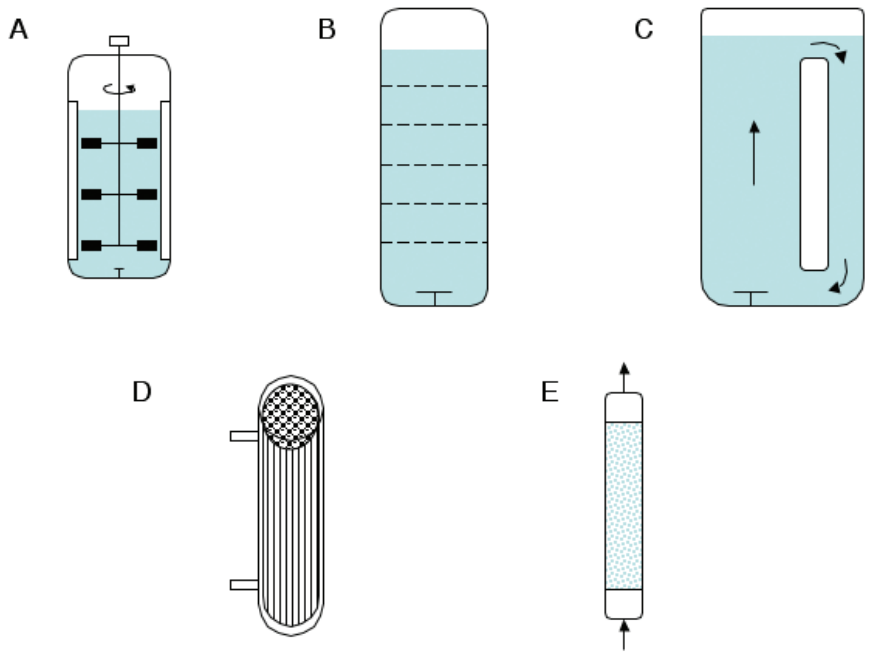


Figura IX.6

PRINCIPALES DISEÑOS DE BIORREACTORES

A, tanque agitado; B, columna burbujeada; C, tanque neumático ("air-lift"); D, sistema de fibras huecas; E, cama empacada. La flecha en A indica el movimiento rotatorio de la flecha que soporta los impulsores mientras que las flechas en C indican el patrón de flujo del medio de cultivo cuando los gases se burbujean por el conducto principal. Las líneas punteadas en B representan platos perforados que funcionan como distribuidores de gases. En el reactor de fibras huecas (D) las células en general se inmovilizan en el exterior de las fibras mientras que medio de cultivo se hace fluir por el interior, creándose una difusión de nutrientes desde el interior de las fibras hacia las células; y en el sentido contrario de productos y desechos metabólicos tóxicos. En los reactores tipo cama empacada (E) existe una gran variedad de soportes, desde muy sencillos como vidrio, cerámica y acero inoxidable, hasta sofisticados como matrices poliméricas recubiertas de colágena.

dos en las figuras IX.6D y E, en donde las células crecen adheridas a una matriz fija. Estos sistemas son utilizados para células adherentes, como por ejemplo células animales dependientes de anclaje, y donde el producto de interés es extracelular. Los biorreactores de células suspendidas tienen la ventaja de ser sistemas homogéneos, permitiendo un muestreo directo de variables ambientales, incluyendo las propias células, por lo

cual es posible establecer mediciones y controles sencillos y estrictos. Además son fácilmente escalables. Por otro lado, los biorreactores con células (o enzimas) inmovilizadas tienen la ventaja de alcanzar altas concentraciones celulares y por ende altas productividades, además de prestarse fácilmente para operaciones continuas como la perfusión (ver modos de operación más adelante). No obstante, tienen el inconveniente de ser sistemas heterogéneos por lo que es común la presencia de gradientes ambientales tanto en la dirección radial como axial. Asimismo, el muestreo, particularmente de células, es problemático o imposible por lo que acaban siendo sistemas de difícil operación y escalamiento. Revisiones detalladas del diseño, características y funcionamiento de biorreactores se puede encontrar en las referencias (7 y 10).

Fenómenos de transporte

El diagrama de un biorreactor estándard de tanque agitado mecánicamente mediante una turbina tipo Rushton se presenta en la figura IX.7. Se muestran las relaciones de dimensiones características, que suelen permanecer constantes entre escalas, así como algunos de los componentes y accesorios comúnmente presentes. Los biorreactores agitados son los más ampliamente utilizados y sus escalas pueden ir desde unos cuantos mililitros hasta los cientos de metros cúbicos. La popularidad de los biorreactores agitados se debe en buena medida a que ofrecen algunos de los mejores desempeños desde el punto de vista de los fenómenos de transporte. El estudio de los fenómenos de transporte, es decir la transferencia de masa, calor y momentum, ocupa gran parte de la atención del ingeniero bioquímico y es fundamental para el diseño adecuado de bioprocesos en general y de biorreactores en particular.

La transferencia de energía calorífica o calor es importante en un biorreactor debido a dos razones. En primer lugar, la gran mayoría de sistemas se esterilizan por calor. En fermentadores pequeños de laboratorio esto se logra colocando el equipo dentro de autoclaves; sin embargo, para equipo mayor, esto es imposible por lo que la esterilización se debe realizar *in situ,* ya sea pasando vapor a alta presión por una chaqueta, por un serpentín o directamente al interior del tanque cuando las características del medio de cultivo así lo permiten. En segundo lugar, la chaqueta o serpentín servirán también para enfriar el biorreactor después de la esterilización y para remover el llamado calor metabólico generado durante el

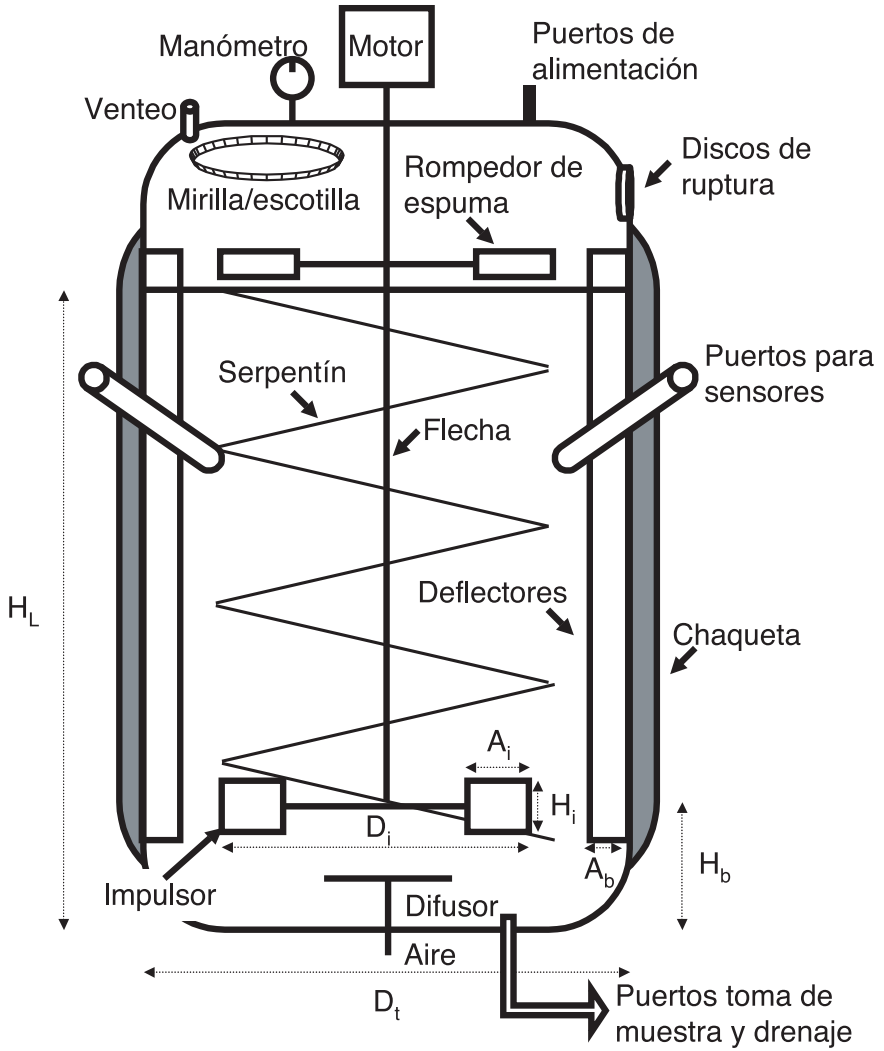


Figura IX.7

CONFIGURACIÓN ESTÁNDAR DE UN BIORREACTOR AGITADO

Se muestran algunos de los componentes y aditamentos comúnmente presentes. Para el caso de un impulsor de turbina plana las dimensiones estándar son las siguientes: $Di/Dt = 0.333$; $H_L/D_t = 1$; $A_i/D_i = 0.25$; $Hi/Di = 0.2$; $H_b/D_i = 1$; $A_b/D_t = 0.1$. Adaptado de [5].

crecimiento celular (tabla IX.4). El área disponible de una chaqueta por unidad de volumen de reactor es sustancialmente menor que la de un serpentín, por lo que la primera se usa generalmente para tanques menores de 5 000 L mientras que la segunda se usa para volúmenes mayores y/o cuando el organismo en cuestión presenta altas tasas de generación de calor. Inclusive, para biorreactores mayores de 1 500 000 L los serpentines pueden ser insuficientes por lo que es necesario recurrir a intercambiadores de calor externos. En algunos cultivos aeróbicos, particularmente aquellos que emplean metanol como fuente de carbono, la generación de calor por célula es muy alta por lo que de no enfriarse adecuadamente la temperatura rápidamente rebasaría los límites permisibles.

La transferencia de momentum se refiere a la cantidad de movimiento impartida al caldo, células y demás componentes del cultivo por medio de la agitación mecánica y/o aquella resultante del burbujeo de gases. La agitación es importante para mantener las células en suspensión y la homogeneidad general del sistema. Además la agitación interviene en la transferencia adecuada y homogénea de masa al promover mecanismos convectivos de dispersión y al romper y disminuir el tamaño de las burbujas (ver más adelante). No obstante, existe una serie de problemas y retos importantes asociados al mezclado de cultivos. La agitación de un biorreactor implica costos energéticos importantes. Por ejemplo, los valores típicos de potencia (velocidad de suministro de energía al liquido) por unidad de volumen son del orden de 8 a 10 W/L en biorreactores de laboratorio y generalmente menores a 1.0 W/L en biorreactores industriales. Además, muchos caldos de cultivo presentan reología compleja como alta viscosidad, lo cual dificulta enormemente las operaciones de mezclado. Igualmente, la fragilidad celular de ciertos cultivos, como los de hongos miceliares y de células animales, limita la intensidad de agitación permisible. Algunos de estos problemas pueden ser resueltos efectivamente mediante un diseño adecuado del biorreactor y del sistema de agitación. Por ejemplo, impulsores helicoidales se emplean en caldos de alta viscosidad mientras que paletas planas o hélices marinas son los impulsores preferidos para células animales frágiles.

Los fenómenos de transferencia de masa que ocurren en un biorreactor son importantes ya que determinan el transporte hacia la célula de algunos nutrientes y sustratos (como oxígeno) y la remoción del medio de cultivo de algunos subproductos tóxicos del metabolismo (como dióxido de carbono). El caso del oxígeno merece atención especial debido a que es un componente primordial del metabolismo aerobio pero su

muy baja solubilidad (entre 6 y 8 partes por millón en condiciones típicas de presión y temperatura y suministrando aire) dificulta enormemente su abasto a las células. El oxígeno comúnmente se transfiere al medio de cultivo mediante el burbujeo de una corriente de aire, lo cual a su vez puede ocasionar problemas por la formación excesiva de espuma cuando se utilizan medios ricos en proteínas. La adición de antiespumantes en general es indeseable ya que pueden ser tóxicos, limitan la transferencia de oxígeno y complican las etapas de purificación, mientras que el uso de dispositivos como rompedores de espuma no son del todo efectivos. Además, las burbujas al estallar en la superficie del líquido pueden matar células animales frágiles y altas concentraciones de oxígeno pueden causar daño celular por estrés oxidativo y perjudicar las características del medio de cultivo y de productos. Por estas razones, el problema de la transferencia de oxígeno es tema importante de la ingeniería bioquímica.

El diseño racional de biorreactores y bioprocesos requiere de una descripción rigurosa de cada uno de los fenómenos de transporte mencionados anteriormente, lo cual se logra elaborando modelos matemáticos apropiados. La presentación de tales modelos rebasa los propósitos de este capítulo por lo que el lector interesado puede consultar las referencias (1-6, 10, 26, 27). No obstante, con la finalidad de ilustrar el procedimiento, así como varios puntos importantes, se presentan brevemente algunos modelos sencillos relativos a la transferencia de oxígeno.

Muchos modelos operativos parten de balances de biomasa y energía, que en su forma general se expresan como:

$$\text{Acumulación} = \text{Entrada} - \text{Salida} + \text{Generación} - \text{Consumo} \tag{9}$$

Para el caso del balance de oxígeno en la fase líquida de un biorreactor la ecuación 9 se reduce a:

$$\frac{dc_L}{dt} = k_L a(c^* - c_L) + q_{0_2} X \tag{10}$$

donde c_L es la concentración de oxígeno disuelto, c* es la concentración de saturación de oxígeno (es decir al equilibrio en el caso de que no exista consumo), $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de la fase líquida y q_{0_2} es la velocidad específica de consumo de oxígeno. Así, el primer término del lado izquierdo de la ecuación 10 representa la

tasa de cambio de la concentración de oxígeno disuelto, mientras que el primero y segundo del lado derecho representan las velocidades de transferencia y consumo de oxígeno, respectivamente. El k_La es un parámetro muy útil en el diseño de equipo y procesos y concretamente representa la facilidad con la que se transfiere el oxígeno. El k_La es el resultado de multiplicar el coeficiente individual de transferencia de oxígeno en la fase líquida (k_L) por el área interfacial (a, o área de transferencia de oxígeno entre volumen de reactor). Aunque existen muchas correlaciones y modelos que describen al k_La, una relación general útil es:

$$k_L a = K' \left(\frac{P}{V}\right)^{\alpha} V_g^{\beta} \eta^{-\gamma} \qquad (11)$$

donde P/V es la potencia por unidad de volumen, V_g es la velocidad superficial del gas burbujeado, η es la viscosidad del medio de cultivo y K', α, β y γ son constantes empíricas. La importancia de las ecuaciones 10 y 11 radica en que son fundamentales para el diseño del sistema de transferencia de oxígeno de un biorreactor. Por ejemplo, estas ecuaciones nos indican que una forma directa de mejorar la productividad de un cultivo es incrementando la concentración celular mediante el aumento del suministro de oxígeno. Esto último se puede lograr enriqueciendo con oxígeno puro o elevando la presión total (con lo cual se incrementa c*), aumentando el flujo de gas, o aumentando la potencia por unidad de volumen (lo cual disminuye el tamaño de las burbujas lo que resulta en una mayor área interfacial y por ende un mayor k_La).

Modos de operación

Una de las formas más prácticas para controlar el desempeño de un bioproceso es manipulando la forma o modo en el que se opera un cultivo. En la figura IX.8 se muestran diagramas de cuatro de los modos más comunes para operar un biorreactor. El cultivo por lotes es el modo más sencillo y por ende el más frecuentemente empleado, aunque en general es el menos productivo ya que las concentraciones celulares y de productos alcanzadas son bajas y el tiempo muerto entre lotes puede ser significativo. En un cultivo por lotes (figura IX.8A) se cargan inicialmente los nutrimentos los cuales se agotarán a medida que el cultivo crece.

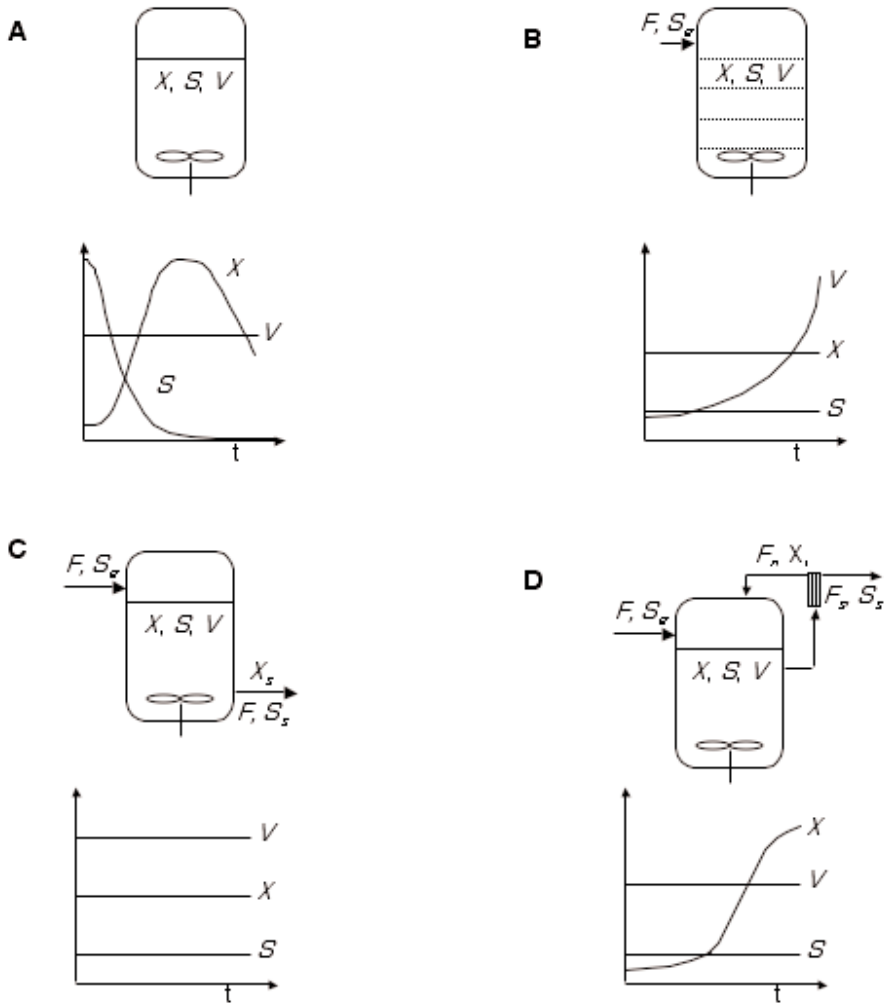


Figura IX.8

PRINCIPALES MODOS DE OPERACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

A, por lotes; B, alimentado exponencialmente; C, continuo; D, perfusión con recirculación externa. Para cada caso se muestra el comportamiento cinético típico de biomasa y sustrato así como el valor del volumen del cultivo. Las flechas en B, C y D indican el sentido de las corrientes de alimentación y remoción de medio.

En este caso tanto la concentración de sustratos, productos y células, así como el estado fisiológico y metabólico celular cambiará continuamente durante el transcurso del cultivo. Igualmente, otros parámetros tales como el pH y el oxígeno disuelto también cambiarán a menos de que se establezcan estrategias adecuadas para su control.

En el cultivo alimentado o por lote alimentado (figura IX.8B) se suplementan uno o varios nutrimentos limitantes a lo largo del cultivo en vez de agregarlos todos al inicio. Existen además muchas formas de alimentar tales sustratos, como por ejemplo por pulsos, continuamente de forma constante o de forma exponencial (como el mostrado en la figura IX.8B donde el volumen cambia a lo largo del cultivo pero el valor de ciertos parámetros claves, como concentración de sustrato y de biomasa permanecen constantes). Con esto se evita por un lado que se agoten los sustratos esenciales pero por otro lado se previenen efectos negativos que resultarían si tales substratos fueran adicionados inicialmente a altas concentraciones. Entre tales efectos negativos se encuentra la inhibición al crecimiento celular por la alta concentración del sustrato o el desvío del metabolismo hacia vías improductivas y que generan subproductos tóxicos. Mediante los cultivos por lote alimentado se puede además controlar la velocidad de crecimiento dentro de los intervalos que favorezcan una función objetivo particular, generalmente la que resulte en las mayores productividades del producto de interés. Mediante el cultivo alimentado se logran algunas de las concentraciones de producto y biomasa más altas en procesos de producción biotecnológica. Por ejemplo, en cultivos de bacterias y levaduras es fácil alcanzar concentraciones de biomasa y producto superiores a 100 g/L y 1 g/L, respectivamente.

El cultivo continuo o quimiostato (figura IX.8C) es uno de los modos de operación más poderosos ya que permite manipular fácilmente las condiciones de crecimiento y al mismo tiempo mantener un ambiente constante durante todo el transcurso del cultivo. En este modo de cultivo se alimenta constantemente una corriente con medio de cultivo fresco y se cosecha al mismo flujo de alimentación una corriente conteniendo células, medio agotado y productos. Una variación interesante al cultivo continuo es el cultivo por perfusión, en el cual se evita la salida de células por la corriente de cosecha. Esto último se logra de diversas formas, como por ejemplo mediante filtros y sedimentadores tanto externos o internos al tanque de fermentación. El cultivo por perfusión ofrece ventajas similares al continuo pero con mayores concentraciones celulares y de producto y por ende mayores productividades. Los biorre-

actores con células inmovilizadas (figuras IX.6D y E) son particularmente útiles para la operación por perfusión.

Al igual que en otros casos, el diseño riguroso y racional de los modos de cultivo se apoya en la elaboración de modelos matemáticos. Nuevamente, un análisis detallado de los modelos que describen los principales modos de operación rebasa los propósitos de este capítulo, por lo que solamente se presentan aquí a manera de ejemplo y en forma sucinta las ecuaciones generales que describen a un quimiostato. Al igual que en el caso del balance de oxígeno en un fermentador (ecuación 10), se pueden realizar balances de biomasa y sustrato alrededor de un quimiostato (se pueden hacer otros balances, como por ejemplo de producto), lo que resulta en las ecuaciones 12 y 13, respectivamente:

$$\frac{VdX}{dt} = F_e X_e - F_s X_s + \mu XV \tag{12}$$

$$\frac{VdS}{dt} = F_e S_e - F_s S_s - \frac{\mu XV}{Y_{x/s}} \tag{13}$$

donde F es flujo volumétrico del medio alimentado o removido, y los subíndices e y s se refieren a las condiciones de entrada y salida respectivamente. La gran utilidad del cultivo continuo radica en que permite operar un cultivo bajo régimen de estado estacionario, es decir, aquella situación en que todas las variables permanecen constantes con respecto al tiempo. De tal forma las ecuaciones 12 y 13 se pueden simplificar a:

$$D = \mu \tag{14}$$

$$D(Se - S) = \frac{\mu X}{Y_{x/s}} \tag{15}$$

$$X = \left(S_e - \frac{DK_s}{\mu_{max} - D} \right) Y_{x/s} \tag{16}$$

donde D es la tasa de dilución, definida como el flujo entre el volumen. Una consecuencia de gran utilidad que surge directamente de las ecuaciones anteriores es que la velocidad de crecimiento de cualquier célula en un quimiostato puede controlarse en valores predeterminados simplemente manipulando la relación de flujo por unidad de volumen, es

decir, un comportamiento eminentemente celular es posible controlarlo rigurosamente mediante variables de operación de un biorreactor. Esto es simplemente una de las muchas consecuencias que se derivan de los modelos aquí ilustrados y ejemplifica el poder que tienen las metodologías propias de la ingeniería bioquímica en el campo de la biotecnología. Se recomienda al lector interesado en profundizar en los conceptos introducidos en esta sección consultar las referencias (1-6, 10, 26, 27).

El traslado del laboratorio a la industria

Una de las actividades centrales de la ingeniería bioquímica es la aplicación de procedimientos racionales para trasladar al ámbito comercial el conocimiento generado a nivel laboratorio. En general el tamaño de las unidades productivas es varios órdenes de magnitud superior a las de desarrollo experimental. Por lo tanto, el valor comercial o social de un bioproceso, y por ende su viabilidad real, dependerá estrechamente de un adecuado escalamiento. El escalamiento, a su vez, dependerá directamente del tipo de proceso, producto o células en cuestión. Por ejemplo, en el caso de sistemas de tratamiento de aguas, la escala final puede ser muy superior a 10^6 L, mientras que para el caso de antibióticos, alcoholes, ácidos orgánicos, enzimas y otros productos producidos por bacterias u hongos y cuyo mercado mundial es de 10^2 a 10^7 toneladas por año, el tamaño de los fermentadores utilizados es en general de 50 000 a 200 000 L. En contraste, productos cuya demanda mundial es menor a 1 kg por año, como por ejemplo proteínas recombinantes producidas por células animales, la escala de los biorreactores comerciales comúnmente es de sólo 100 a 10 000 L. Inclusive, en ciertas aplicaciones, tales como la expansión de células y tejidos humanos para transplantes, la escala final de los cultivos es de apenas unos cuantos litros. Asimismo, las consideraciones de escalamiento serán muy distintas para una célula animal frágil y de requerimientos nutricionales complejos que para una bacteria o levadura con características físicas y metabólicas muy distintas.

Escalamiento ascendente

Idealmente un bioproceso debe operarse bajo condiciones controladas, homogéneas y reproducibles. Sin embargo, durante el traslado de

las operaciones desarrolladas en nivel laboratorio a una escala mayor, comúnmente ocurren problemas, muchos de ellos relacionados con mezclados deficientes. En particular, el escalamiento de las etapas de fermentación es uno de los aspectos mas críticos para el éxito de un bioproceso. Específicamente, al escalar una fermentación a volúmenes mayores se presentan invariablemente problemas de heterogeneidad y gradientes en las variables ambientales mas importantes, tales como pH, oxígeno disuelto, dióxido de carbono disuelto, concentración celular y de sustratos, temperatura, etc. (figura IX.9). En general, las heterogeneidades ambientales afectan la eficiencia de los bioprocesos, y son

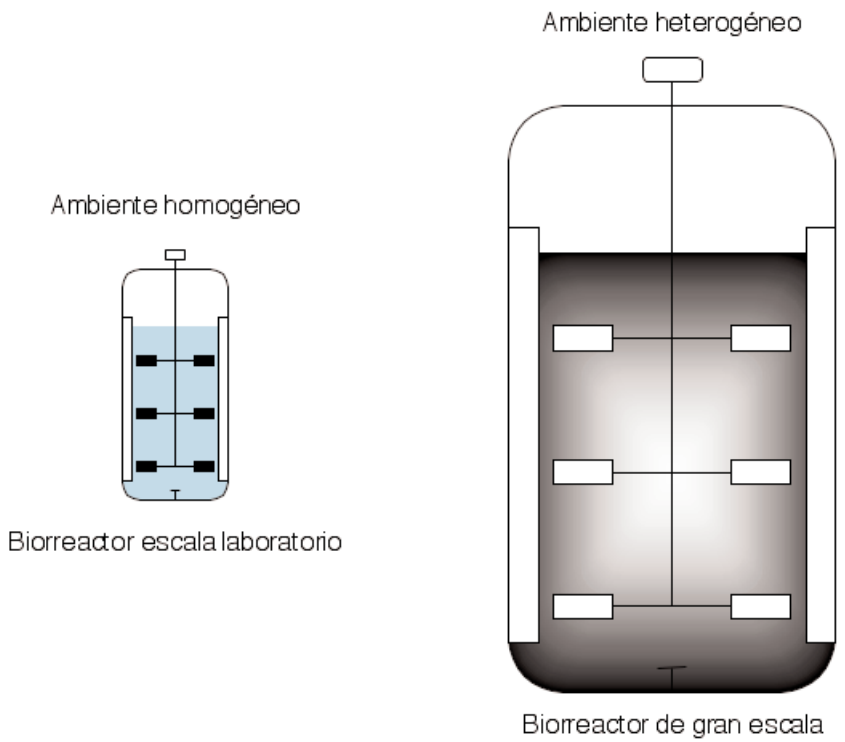


Figura IX.9
COMPARACIÓN ESQUEMÁTICA DE UN FERMENTADOR DE LABORATORIO BIEN MEZCLADO Y UNO DE GRAN ESCALA PRESENTANDO UN AMBIENTE HETEROGÉNEO

En el biorreactor de gran escala se pueden presentar gradientes en la concentración del oxígeno disuelto debido al efecto de la altura de líquido sobre la solubilidad de oxígeno, la posición del aireador e impulsores, y existencia de zonas mal mezcladas detrás de deflectores o esquinas del tanque.

consecuencia de un diseño de biorreactor y/o condiciones de operación deficientes, así como de limitaciones prácticas para reproducir con exactitud las condiciones de laboratorio en una escala mayor. Los problemas asociados a las heterogeneidades ambientales se pueden evitar, hasta cierto grado, a través de estrategias de escalamiento ascendente racionales (28). El escalamiento ascendente es una metodología semiempírica basada en el concepto de la similitud geométrica, a través del cual se mantiene una variable fundamental constante al pasar de un equipo a otro de escala diferente pero con relación de dimensiones similares. Entre las variables más comúnmente utilizadas para escalar una fermentación se encuentran la potencia suministrada al biorreactor por unidad de volumen de caldo de cultivo, el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno, el tiempo de mezclado, la velocidad en la punta del impulsor y el esfuerzo de corte máximo. Una limitación inherente de tal procedimiento radica en que solamente se mantiene constante la variable seleccionada mientras las demás cambian al pasar de una escala a otra. Por ejemplo, al escalar con el criterio de mantener constante la potencia por unidad de volumen, la velocidad de agitación en la escala mayor será menor y por ende la formación de un ambiente no uniforme será inevitable (tabla IX.6). Si se desea entonces mantener la misma homogeneidad en los fermentadores de laboratorio e industrial, el criterio de escalamiento debería ser el tiempo de mezclado (V/Q). No obstante, como se observa en la tabla IX.6, para alcanzar el mismo tiempo de mezclado

Tabla IX.6
METODOLOGÍA TRADICIONAL DE ESCALAMIENTO ASCENDENTE. SE MUESTRA EL EFECTO DE MANTENER UNA SOLA VARIABLE CONSTANTE SOBRE EL RESTO DE LAS VARIABLES.

Parámetro	*Escala Piloto, 80 L*	*Escala Industrial 10m³*		
P/V	1	1	25	0.2	0.0016
P	1	125	3125	25	0.2
N	1	0.34	1	0.2	0.04
Q	1	42.5	125	25	5
Q/V	1	0.34	1	0.2	0.04
πNDi	1	1.7	5	1	0.2
Re ($ND_i^2\rho/\eta$)	1	8.5	25	5	1

Donde: P es potencia, V es volumen, N es velocidad de agitación, Q es capacidad de bombeo, Re es número de Reynolds, ρ es densidad y η es viscosidad. El tiempo de circulación es igual a V/Q. Adaptado de (5).

entre las dos escalas se requeriría incrementar la potencia a valores que no es posible alcanzar en forma práctica en las escalas industriales. Por consiguiente, las condiciones de mezclado ideal, inherentes a los fermentadores de laboratorio, serán imposibles de reproducir completamente en fermentadores de gran escala e inevitablemente surgirán gradientes en las variables ambientales (28).

Una regla heurística generalmente seguida es la de escalar el volumen de fermentación mediante incrementos sucesivos de un orden de magnitud. Esto posibilita la depuración del escalamiento en cada incremento de volumen, garantiza los mejores resultados en la escala final y minimiza el tiempo total requerido para un escalamiento exitoso. Durante el escalamiento ascendente se establecen también las condiciones prácticas que difieren de las desarrolladas en laboratorio. De particular importancia es la prueba de materiales, reactivos y sustratos industriales que difieren sustancialmente en calidad y precio a los usados en laboratorio. Por ejemplo, mientras que en pruebas de laboratorio para producción de etanol por levadura se puede usar glucosa de alta pureza y costo elevado, un proceso industrial económicamente viable necesariamente requerirá como sustrato melazas baratas y de baja pureza. De hecho, la sensibilidad del proceso de producción de etanol al costo de materias primas obliga que las plantas de fermentación se localicen frecuentemente cerca de ingenios azucareros. En el escalamiento ascendente se prueban también equipos semipiloto, piloto, y de escala final, los cuales pueden tener eficiencias y comportamientos muy distintos a los equipos de laboratorio y por ende afectar el bioproceso. Por ejemplo, en escala laboratorio es común utilizar la sonicación para romper células y liberar el producto de interés. Sin embargo, la gran cantidad de calor generada durante la sonicación determina que la ruptura mecánica sea preferida para volúmenes mayores. Durante el escalamiento ascendente se ensayan y corrigen los procedimientos de operación, que necesariamente son distintos a los de laboratorio y que en ocasiones pueden afectar negativamente el proceso. En particular los tiempos característicos, que reflejan la rapidez con que se efectúan los diversos subprocesos físicos (tabla IX.7), tienden a aumentar durante el escalado y en ocasiones perjudicar etapas sensibles del proceso. A través del escalamiento se obtiene no solamente información técnica sino también económica, ambas necesarias para evaluar la viabilidad comercial del proyecto. Finalmente, durante el escalamiento se determinan factores de riesgo, generalmente despreciables a nivel laboratorio, y se establecen metodología propias para su prevención.

Tabla IX.7
TIEMPOS CARACTERÍSTICOS DE SUBPROCESOS PRESENTES EN UN FERMENTADOR.

Proceso	*Fórmula*	*Magnitud típica*
Mezclado	t_M (experimental)	4 – 1000 s
Transferencia de masa	$t_{mt} = \frac{1}{k_L a}$	0.01 – 0.2 h
Circulación	$t_c = \frac{t_M}{4}$	1 – 250 s
Crecimiento	$t_\mu = \frac{1}{\mu}$	10 – 100 h
Transferencia de calor	$t_{ht} = \frac{V\rho C_p}{UA}$	0.2 – 1 h
Reacción	$t_{rxn} = \frac{c}{q_{O_2} X}$	1 – 1000 s

Adaptado de (29)

Por ejemplo, mediante el uso de campanas de extracción, de flujo laminar, u otros dispositivos sencillos, es relativamente fácil contender con problemas de derrames, eliminación de desechos y contención química y biológica en biorreactores de laboratorio. Por el contrario, en una instalación industrial será necesario incorporar sistemas especializados y sofisticados tales como equipos de incineración, sistemas de tratamiento de aguas, diques de contención, salas de presión controlada, dispositivos de alivio de presión, etcétera.

Escalamiento descendente

El escalamiento descendente es la respuesta de la bioingeniería a los problemas y limitaciones de los procedimientos clásicos de escalamiento. El escalamiento descendente es un método semiempírico basado en el análisis de régimen y que consiste en reproducir en pequeña escala las condiciones prevalecientes a gran escala (29). Tal método se aplica en dos situaciones generales. Como una opción para escalar nuevos procesos u operaciones a nuevos equipos o instalaciones. Alternativamente, el escalamiento descendente se puede emplear como herramienta para diagnosticar problemas (rendimientos bajos, muerte celular, etc.) o predecir las consecuencias de modificaciones realizadas a equipos o proce-

sos que ya existen en la escala comercial. En ambos casos, se deberán diseñar experimentos a nivel laboratorio basados en el conocimiento de los parámetros fundamentales que limitan el proceso a gran escala. Los resultados experimentales pueden ser entonces utilizados para optimizar y predecir el comportamiento del proceso nuevo (o modificado) en la escala comercial. Una de las características más importantes del escalamiento descendente es la generación de datos experimentales bajo condiciones que asemejan las reales pero sin la necesidad de realizar experimentación en la escala real, lo cual resultaría impráctico y económicamente improcedente. El escalamiento descendente consiste de cuatro etapas principales (figura IX.10):

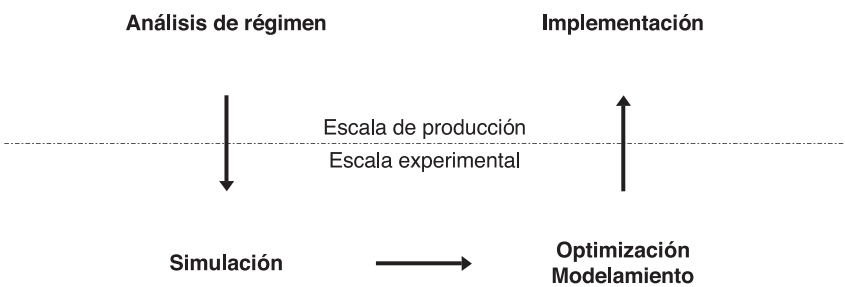


Figura IX.10

ETAPAS DEL ESCALAMIENTO DESCENDENTE

Las dos etapas superiores se realizan en biorreactores industriales mientras que las dos inferiores en equipos pequeños de laboratorio [adaptado de (29)].

1. Análisis de régimen. Se basa en identificar los mecanismos limitantes que determinan el bioproceso a gran escala. Esto se logra obteniendo los tiempos característicos o tiempos de relajación de cada uno de los subprocesos que componen al sistema.

2. Simulación. Los mecanismos limitantes son simulados en arreglos experimentales a nivel laboratorio, los cuales no necesariamente mantienen una similitud geométrica con las condiciones reales sino que mantienen los tiempos característicos relevantes constantes entre las dos escalas.

3. Optimización y modelamiento. Después de que los mecanismos limitantes en la escala real han sido identificados y que métodos confiables para simularlos en laboratorio se han establecido, entonces se procede a optimizar el bioproceso mediante el ensayo experimental de un amplio intervalo de condiciones. En esta etapa se generan también

modelos microbiológicos que describan la fisiología y metabolismo celular bajo condiciones transitorias resultantes de los gradientes espaciales simulados como gradientes temporales en la etapa anterior.

4. Aplicación. El paso final del método de escalamiento descendente es trasladar los resultados experimentales a la escala de producción.

El concepto de escalamiento descendente es relativamente reciente y los estudios al respecto se han limitado en general a simular gradientes de oxígeno disuelto y en menor medida gradientes de pH y fuente de carbono. En su mayoría los estudios se han centrado en el desarrollo de herramientas experimentales para simular las condiciones de gran escala, es decir, la etapa 2 descrita anteriormente. Sin embargo, poco se ha realizado en la etapa 1 y casi nada en las etapas 3 y 4. Asimismo, la gran mayoría de estudios han empleado microorganismos no recombinantes y en muy rara ocasión se ha trabajado con microorganismos genéticamente modificados o cultivos de células de eucariontes superiores.

Los estudios de escalamiento descendente se desarrollan en dos tipos de sistemas: de uno y dos compartimientos (figura IX.11). Los sistemas de un compartimento consisten en un biorreactor acoplado a un sistema de control a través del cual se hace oscilar el parámetro a estudiar, generalmente el oxígeno disuelto. Tal variación temporal en el biorreactor de pequeña escala representará los gradientes espaciales de oxígeno disuelto presentes en escalas comerciales. De tal forma, el periodo de oscilación en el biorreactor pequeño representará los tiempos de circulación de los biorreactores industriales (figura IX.12). Los sistemas de dos compartimientos consisten en dos biorreactores interconectados, entre los que se hace circular continuamente el caldo de cultivo. Arreglos comúnmente utilizados incluyen dos tanques agitados interconectados o un tanque agitado conectado a una columna empacada. Cada compartimiento se mantiene a una condición distinta, simulándose de esta forma el cambio que una célula en un biorreactor industrial experimentaría al transitar entre zonas bien y mal mezcladas. Este tipo de sistemas experimentales son particularmente útiles para simular gradientes de pH y sustrato. Los sistemas de uno y de dos compartimientos tienen características distintas y su selección dependerá del problema particular que se quiera estudiar. Por ejemplo, en los sistemas de dos compartimientos se pueden simular tiempos muy bajos de circulación y distribuciones particulares de tiempos de circulación, mientras que en los de un compartimiento se pueden simular cambios continuos de la variable estudiada.

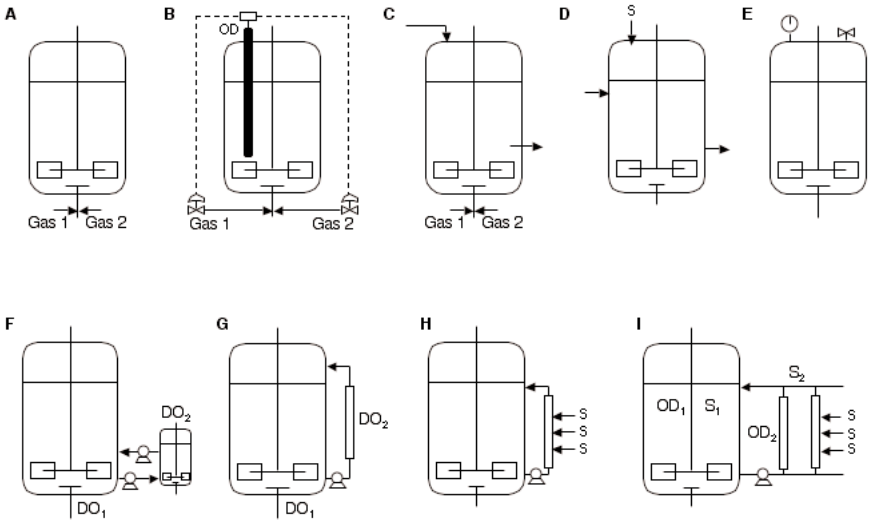


Figura IX.11

SISTEMAS EXPERIMENTALES COMÚNMENTE EMPLEADOS EN ESTUDIOS DE ESCALAMIENTO DESCENDENTE

Sistemas de uno (A – E) y dos (F – I) compartimientos. A, control de oxígeno disuelto (OD) por lazo abierto; B, control de OD por lazo cerrado; C control de OD en quimiostato; D, control de substrato (S) en quimiostato; E, control de OD por presión; F, dos tanques agitados con recirculación; G, combinación de tanque agitado con columna de flujo tapón; H, control de S en columna; I, control de OD y S en columna para simulación simultánea de gradientes de OD y S. [adaptado de (29)].

Instrumentación, control y optimización de bioprocesos

La ingeniería bioquímica tiene como característica fundamental describir y entender cuantitativamente los diversos fenómenos que rigen un bioproceso. Para esto es necesario contar con una serie de instrumentos y dispositivos de medición a través de los cuales se pueda determinar, de forma rigurosa y objetiva, el valor de las variables más relevantes de un bioproceso. Los datos proporcionados por la instrumentación son transmitidos a indicadores, graficadores o equipos de control mediante los cuales un operador o sistema automático almacena la información, la procesa y toma decisiones para mantener el proceso dentro de parámetros adecuados tendientes a optimizar la operación. Muchas de estas actividades eran realizadas manual o mecánicamente hasta hace apenas un par de décadas. Sin embargo, el uso generalizado de las computadoras

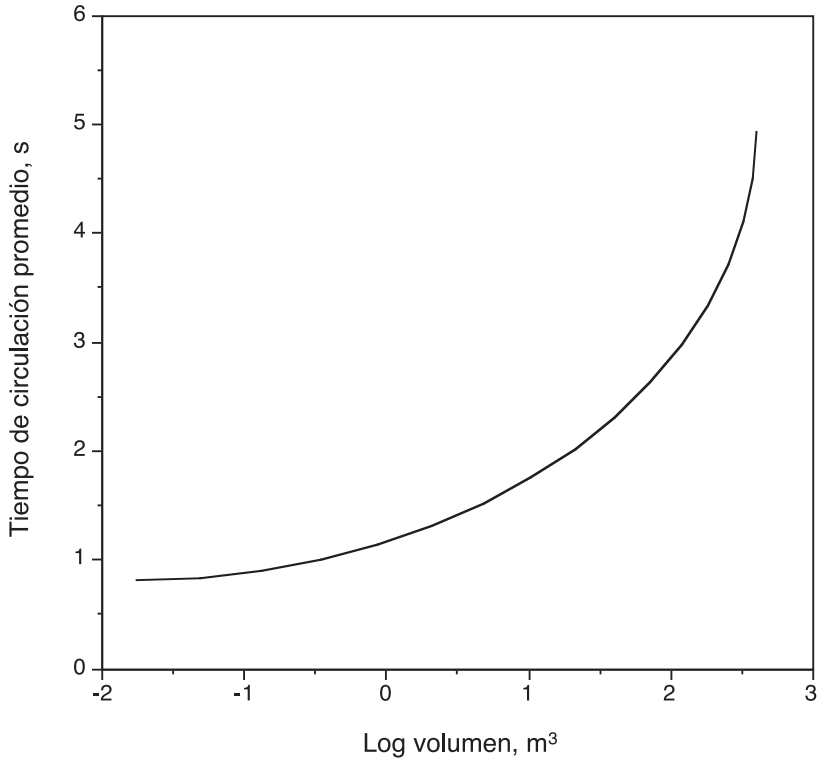


Figura IX.12

EFECTO DE LA ESCALA DE FERMENTACIÓN SOBRE EL TIEMPO DE CIRCULACIÓN EN UN REACTOR AGITADO PARA UN FLUIDO NEWTONIANO CON VISCOSIDAD SIMILAR AL AGUA

El tiempo de circulación es el tiempo que un elemento de fluido tarda en recorrer el biorreactor hasta regresar al mismo punto de partida. La figura muestra tiempos de circulación típicos para un tanque agitado operado bajo condiciones de cultivos bacterianos y un fluido newtoniano de viscosidad similar al agua. Para fluidos no newtonianos y biorreactores de células animales los tiempos de circulación pueden llegar a ser de 1 a 2 órdenes de magnitud superiores a los mostrados [adaptado de (29)].

ha transformado radicalmente el campo. Así, la instrumentación, control y optimización de bioprocesos representa actualmente la conjunción de las dos tecnologías más sobresalientes de finales del siglo XX y principios del presente: la biotecnología y la microelectrónica. A través de la instrumentación y control se ha logrado hacer de los bioprocesos una tecnología robusta y reproducible, reduciendo cada vez más las incertidumbres y variabilidad asociadas a la explotación de entes biológicos.

Como resultado, los bioprocesos modernos operan bajo condiciones óptimas, generando productos a los menores costos posibles y de calidad consistente y mejorada.

En la actualidad se cuenta con un verdadero arsenal de sensores e instrumentación analítica para dar seguimiento y controlar tanto etapas de fermentación como operaciones unitarias de separación y purificación. De particular importancia y complejidad es la medición y control de variables durante la etapa de fermentación debido a varias consideraciones que se describen a continuación. Los sensores de una fermentación deben tener tiempos de respuesta bajos (del orden de segundos) para ser capaces de proporcionar información oportuna, la cual es indispensable para tomar acciones de control en tiempo real. De lo contrario, desviaciones no controladas en variables fundamentales pueden ocasionar daños irreversibles al organismo, reduciendo la eficiencia o inclusive causando la pérdida total del proceso. Por ejemplo, en cultivos de alta concentración celular, una medición tardía del oxígeno disuelto resultaría en un control deficiente que podría conducir rápidamente a un estado de anaerobiosis perjudicial para cultivos aeróbicos. Muchos sensores proporcionan información del organismo cultivado o de su medio ambiente, y requieren estar en contacto directo con el caldo de cultivo, por lo que necesariamente deben ser esterilizables, ser inocuos a las células y al caldo de cultivo y físicamente robustos para tolerar condiciones extremas tales como las que se presentan durante la esterilización de equipos. Asimismo, existen procesos que duran muchas semanas e inclusive meses, como los cultivos de células animales para producción de proteínas recombinantes, por lo que es necesario contar con sensores de fácil calibración y recalibración cuya señal sea estable por tiempos prolongados. Una característica esencial de los sensores utilizados en fermentación es la de poseer elementos de transducción eléctrica para transmitir la señal a indicadores, graficadores y sistemas de control automático. Finalmente, es deseable que los sensores sean de bajo costo y fácilmente validables.

En la tabla IX.8 se presentan variables comúnmente medidas en fermentadores y los dispositivos utilizados para su determinación. Como se puede ver, existen mediciones de parámetros físicos, fisicoquímicos, bioquímicos y biológicos. Asimismo, existen sistemas de medición *in situ* y *ex situ*. En los primeros, el sensor (como por ejemplo sensores electroquímicos de pH y oxígeno disuelto) se encuentra en contacto directo con el caldo de cultivo y la medición se efectúa en-línea y en tiempo real, mientras que en los segundos una muestra del caldo de cultivo es remo-

Tabla IX.8
VARIABLES COMÚNMENTE MEDIDAS EN FERMENTADORES
Y DISPOSITIVOS UTILIZADOS PARA SU DETERMINACIÓN

Parámetro medido en línea	*Dispositivo/Instrumento*
Físicos	
Temperatura	termopar, termistor
Presión	manómetro
Nivel del líquido o espuma	manómetros, sensor de conductividad o capacitancia
Peso	balanza, celdas de carga
Flujo (volumétrico, másico)	rotámetro, controladores de flujo másico
Velocidad	tacómetro
Tamaño y velocidad de burbujas	sensor de conductividad o de fibra óptica, ultrasonido.
Hidrodinámica	anemómetros
Potencia	torquímetro y tacómetro
Fisicoquímicos	
pH	electrodo de vidrio, electrodo de fibra óptica y agente fluorescente
Oxígeno disuelto	electrodo galvánico/polarográfico, electrodo de fibra óptica y agente fluorescente
Dióxido de carbono disuelto	electrodo de fibra óptica y agente fluorescente, electrodo de pH y solución de bicarbonatos
Capacitancia y conductancia	monitor de biomasa
Potencial redox	electrodo de referencia
Composición de gases a la salida	espectrometría infrarroja o de masas
Biológicos o Bioquímicos	
NADH y NADPH	sensores de flourescencia
Densidad celular	sensores de turbidez, absorbancia, amperométricos o ultrasónicos.
Parámetros medidos en sistemas de flujo inyectado	
Acidos orgánicos	
Carbohidratos	
Actividades enzimáticas	
Aminoácidos	
Densidad y ciclo celular	
Contenido de ácidos nucleicos	
Equipos conectados a través de sistemas de flujo inyectado	
Cromatógrafo de gases, cromatógrafo de alta resolución (HPLC), cromatografía de proteínas (FPLC), cromatografía de iones, espectrómetro de masas, espectrofotómetro, analizadores bioquímicos (basados en biosensores), citómetro de flujo, resonancia magnética nuclear.	

vida del fermentador y llevada a un instrumento analítico. El análisis por inyección de flujo consiste en transportar automáticamente la muestra del fermentador al instrumento analítico mediante circuitos cerrados de tuberías y bombas. Tal técnica es comúnmente empleada para análisis mediante cromatógrafos líquidos, cromatógrafos de gases, espectrómetros de masa y analizadores enzimáticos. Dependiendo del diseño de los sistemas de análisis por inyección de flujo, es posible llegar a obtener respuestas en tiempo real cercanas a las obtenidas con sensores *in situ*. Además de los sistemas mencionados, existen elementos de medición colocados en los diversos flujos de componentes que se alimentan o salen del fermentador. Por ejemplo, existen controladores de flujo másico para los gases de entrada, analizadores paramagnéticos o infrarrojos de gases en la corriente de venteo, y sensores de temperatura y presión para agua de enfriamiento y vapor de calentamiento. Para lograr un entendimiento más profundo de los bioprocesos, las mediciones descritas frecuentemente se complementan con determinaciones realizadas fuera de línea aprovechando la vasta instrumentación disponible en el campo de la biotecnología.

El desarrollo de nuevos sensores ópticos basados en polímeros novedosos constituye un avance notable en el monitoreo de bioprocesos. En la actualidad existen ya sensores ópticos para medir parámetros tales como pH, oxígeno disuelto, concentración celular y dióxido de carbono disuelto. La ventaja de tales dispositivos, comparados con los sensores electroquímicos tradicionales, reside en la posibilidad de realizar mediciones *in situ* sin que el dispositivo toque el caldo de cultivo ya que las lecturas se pueden efectuar a través de ventanas o mirillas colocadas en los biorreactores. Esto evita problemas derivados de la esterilización, así como interacciones indeseables entre sensor y caldo de cultivo. Además, posibilita la recalibración en cualquier momento y permite miniaturizar los dispositivos de medición. Esto último abre la oportunidad de desarrollar sistemas de fermentación múltiples miniaturizados necesarios para la expresión y prueba de la enorme cantidad de genes y proteínas con potencial interés práctico que se están identificando en el campo de la genómica y proteómica mediante sistemas de tamizados de alta capacidad (19).

Para muchas variables de interés no existen sensores o su desempeño no es adecuado. De ahí que una actividad frecuente del ingeniero bioquímico sea la estimación de variables mediante el uso de mediciones primarias y modelos matemáticos basados en el conocimiento de la

estequiometría, termodinámica y cinética de crecimiento y producción de metabolitos así como de los fenómenos de transporte (transferencia de masa, momentum y calor). Por ejemplo, la velocidad de consumo de oxígeno y la de producción de dióxido de carbono son parámetros fundamentales que proporcionan información clave sobre el estado metabólico de un cultivo; sin embargo no existen sensores para determinarlos directamente. Afortunadamente, es fácil calcular tales parámetros mediante balances de materia y mediciones primarias de oxígeno y dióxido de carbono disueltos y/o en las corrientes gaseosas de entrada y salida del fermentador. Dependiendo de la complejidad del parámetro a estimar, se requerirán desde modelos matemáticos sencillos hasta métodos complejos de inteligencia artificial tales como redes neurales y sistemas expertos. Estos sistemas de estimación de parámetros constituyen verdaderos sensores virtuales.

La medición de variables relevantes es un requisito necesario para controlar un bioproceso. Mediante el control se mantienen parámetros críticos dentro de intervalos que garanticen la reproducibilidad del bioproceso y optimicen alguna función objetivo, como por ejemplo, productividad o concentración de producto. Existen diversos estrategias para controlar un bioproceso, las cuales se describen a continuación. El control de ciclo abierto consiste en fijar de forma predeterminada el perfil de alguna función sin corregirla durante el transcurso de la operación. Por ejemplo, en una separación cromatográfica se fija inicialmente el perfil, ya sea variable o constante, de los flujos de los diversos solventes empleados para separar el producto de interés. Tales perfiles se mantienen a lo largo de la separación independientemente del resultado de la operación. Por el contrario, el control de ciclo cerrado consiste en medir un parámetro clave, compararlo con el valor ideal deseado y tomar alguna acción de control en caso de que exista una desviación fuera de los límites de tolerancia preestablecidos entre los valores medidos y deseados. La acción de control típicamente consiste en modificar, a través de un actuador, una variable secundaria que determine el valor del parámetro principal a controlar. Por ejemplo, para controlar el oxígeno disuelto en un fermentador, la variable secundaria o manipulada puede ser la velocidad de agitación del impulsor o el flujo de gases a la entrada, los cuales aumentarán o disminuirán de acuerdo con el error entre el oxígeno disuelto medido y el deseado. La magnitud del cambio del actuador se establece mediante modelos matemáticos que toman en consideración la dinámica característica de los procesos a controlar.

Los modelos pueden ser desde muy sencillos, que simplemente prenden o apagan el actuador, hasta más complicados, que modulan la respuesta del actuador con base en la magnitud de la desviación entre la variable medida y el valor deseado. El control proporcional-integral-derivativo es un ejemplo muy común de este último caso.

Existen controles de ciclo cerrado más complejos, como por ejemplo los adaptativos y los anticipativos. En el primer caso, diversos parámetros del algoritmo de control se recalculan continuamente con base en el desempeño del proceso y se cambian frecuentemente a lo largo de la operación para optimizar la función objetivo. Parámetros típicamente modificados son el valor deseado de la variable fundamental a controlar o las constantes matemáticas que determinan la magnitud del cambio del actuador. Este tipo de control es empleado cuando las condiciones óptimas de operación de un bioproceso no se conocen o cambian con respecto al tiempo. Un ejemplo sencillo de control adaptativo es la producción de proteínas recombinantes por bacterias cuando se emplean promotores inducibles por temperatura. En este caso, el sistema debe controlar inicialmente la temperatura al valor óptimo de crecimiento y al llegar a cierta concentración de biomasa, elevar la temperatura al valor óptimo de inducción. En cuanto a los controles de tipo anticipativo, consisten en predecir las desviaciones de la variable a controlar debido a la dinámica propia del sistema o a perturbaciones. De tal manera, la acción de control no se establece con base en un evento pasado, como lo es la desviación entre la variable medida y deseada, sino que anticipa el problema. Así se logra evitar desviaciones inaceptables que pudieran perjudicar irreversiblemente al bioproceso. Por ejemplo, en sistemas de tratamiento de aguas sería muy útil poder identificar descargas altamente tóxicas y anticipar su efecto para establecer acciones de control preventivas antes de daños irreparables a la población microbiana. Desafortunadamente, los sistemas de tratamiento de aguas son, en general, mucho menos instrumentados y los sistemas de control empleados son poco sofisticados comparados con otros bioprocesos.

En resumen, el control eficaz de los bioprocesos necesariamente implica el uso de dispositivos electrónicos o sistemas computarizados a través de los cuales se adquieren y almacenan las mediciones de variables fundamentales. Tales datos se procesan mediante modelos y algoritmos matemáticos mediante los cuales se deciden acciones de control que son ejecutadas por los propios dispositivos electrónicos o sistemas computarizados por medio de actuadores diversos. De tal forma, la instrumen-

tación, control y optimización de bioprocesos constituye una actividad central de la ingeniería bioquímica que puede abarcar desde unidades y operaciones individuales hasta sistemas complejos que gobiernan el buen funcionamiento de plantas complejas de procesamiento.

Nomenclatura

c	concentración de oxígeno disuelto
D	tasa de dilución (F/V)
F	flujo volumétrico
k_La	coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno de la fase líquida
K'	constante de saturación
m_s	constante de mantenimiento
P	potencia
q_{O_2}	velocidad específica de consumo de oxígeno
S	concentración de sustrato
t	tiempo
t_d	tiempo de duplicación
V	volumen
V_g	velocidad superficial de gas
X	concetración de biomasa
$Y_{i/j}$	rendimiento del componente i sobre el componente j.
ϕ	flujo molar o coeficiente estequiométrico
η	viscosidad
μ	velocidad específica del crecimiento

Subíndices y superíndices

e	entrada
L	fase líquida
m	máxima
s	salida
0	inicial
*	saturación
α	constante
β	constante
γ	constante

1. Bailey, J. E., D. F. Ollis; "Biochemical engineering fundamentals"; 2nd ed. McGraw-Hill, New York, USA (1977).
2. Shuler, M. L., F. Kargi; "Bioprocess engineering: basic concepts"; Prentice Hall PTR, 2nd ed., New Jersey, USA (2002).
3. Bu'Lock, J. B. Kristiansen (eds.); "Basic biotechnology"; Academic Press, London, U.K. (1987).
4. Lee, J. M. "Biochemical engineering"; Prentice Hall, New Jersey, USA (1992).
5. Quintero, R. "Ingeniería bioquímica: teoría y aplicaciones"; Alhambra Mexicana, México (1981).
6. Blanch, H. W., D. S. Clark; "Biochemical engineering"; Marcel Dekker, Inc.; New York, USA; (1996).
7. Lydersen, B. K., N. A. D'Elia, K. L. Nelson; "Bioprocess engineering: systems, equipment, and facilities"; John Wiley & Sons, Inc., New York, USA (1994).
8. Ladisch, M. R. "Bioseparations engineering: Principles, practice, and economics"; Wiley Interscience, New York, USA; (2001).
9. Tejeda, A., R. M. Montesinos R. Guzmán; "Bioseparaciones"; Editorial Unison, Sonora, México (1995).
10. Nielsen, J., J. Villadsen; "Bioreaction engineering principles"; Plenum Press, New York, USA (1994).
11. Flickinger, M. C., S. W. Drew (eds.); "Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation"; John Wiley & Sons, Inc., New York, USA (1999).
12. Metcalf, J., C. Eddy , Inc. (1979). Wastewater Engineering: Treatment Disposal, Reuse; 2nd edition. McGraw-Hill Book Company, New York, USA.
13. Jan, M. K., J. G. Zeikus; "Anaerobes, industrial uses"; en M. C. Flickinger y S. W. Drew (eds.); "Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation"; John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp. 150-170 (1999).
14. Antébi, E., D. Fishlock; "Biotechnology strategies for life"; The MIT Press, Massachusetts, USA (1985).
15. Krishnan, M. R. V. "Citric acid, processes"; en M. C. Flickinger y S. W. Drew (eds.); "Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation"; John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp. 651-661 (1999).
16. Ebner, H., S. Sellmer-Wilsberg, B. Honnef; "Vinegar, acetic acid production"; en M. C. Flickinger y S. W. Drew (eds.); "Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation"; John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp. 2637-2647 (1999).

17. Miller, J. B. “Antibiotics and isotopes”; en “The pharmaceutical century; ten decades of drug discovery”; American Chemical Society, Washington D.C., USA 53-67 (2000).
18. Strohl, W. R. “Secondary metabolites, antibiotics”; en M. C. Flickinger y S. W. Drew (eds.); “Encyclopedia of bioprocess technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation”; John Wiley & Sons, Inc., New York, USA, pp. 2348-2365 (1999).
19. Ramírez, O. T. “Nuevos bioprocesos”; en Módulo 7 “Ingeniería celular: Biodiversidad e industria”, Fronteras de la Biología en los inicios del siglo xxi. F. Bolívar y A. López-Munguía (coordinadores); El Colegio Nacional, México; pp. 93-121 (2003).
20. Demain, A. L. “Small bugs, big business: The economic power of the microbe”; *Biotechnology Advances,* 18, 499–514 (2000).
21. Palomares, L. A., F. Kuri-Breña, O. T. Ramírez; “Industrial recombinant protein production” in *“The Encyclopedia of Life Support Systems”;* D. Al Gobaisi (ed), EOLSS Publishers, Oxford; 6.58.3.8. www.eolss.net; (2002).
22. Ramírez, O. T., E. Flores, E. Galindo; “Products and bioprocesses based on genetically modified organisms: Review of bioengineering issues and trends in the literature”; *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology,* 3, 165-197 (1995).
23. Atkinson, B., F. Mavituna; “Biochemical engineering and biotechnology handbook”; Stockton Press, Macmillan Publishers, New York, USA; (1991).
24. Roels, J. A. “Energetic and kinetics in biotechnology”; Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands; (1983).
25. Vázquez Duhalt, R. “Termodinámica biológica”; AGT Editor S.A., México (2002).
26. Dunn, I. J., E. Heinzle, J. Ingham, J. E. Prenosil; “Biological reaction engineering”; VCH Verlagsgesellschaft mbH; Weinheim, Alemania; (1992).
27. van’t Reit, K., J. Tramper; “Basic bioreactor design”; Marcel Dekker, Inc.; New York, USA (1991).
28. Palomares, L. A., O.T. Ramírez; “Bioreactor Scale-up” In: The Encyclopedia of Cell Technology; Spier, R.E. (ed), John Wiley and Sons, Inc., New York, USA 183-201 (2000).
29. Palomares, L. A., O.T. Ramírez; “Bioreactor Scale-down” In: The Encyclopedia of Cell Technology; Spier, R.E. (ed), John Wiley and Sons, Inc., New York, USA 174-183 (2000).

Capítulo X

BIOTECNOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD

J. Soberón Mainero
J. Golubov Figueroa

La biodiversidad como riqueza natural estratégica de México

La biodiversidad es el conjunto de las manifestaciones de la vida sobre el planeta que convencionalmente se divide en tres componentes: a) ecosistémico o más apropiado biómico, que está dado por las grandes asociaciones bióticas que constituyen la parte viva de los paisajes del planeta (bosques, selvas, manglares, etc.) (1); b) las especies que son los componentes vivos de los biomas, por ejemplo bosques de pinos en Canadá y Chiapas difieren en la composición de especies. Este componente específico de la biodiversidad es uno de los más fáciles de estimar ya que correlaciona con otros componentes de la biodiversidad (2) y hay millones de datos recopilados en museos herbarios y bancos de información (3); c) El tercer componente es la diversidad a nivel genético dentro de cada especie y se encuentra relacionado con la variación genética (cuanta información genética diferente se encuentra) que está regulado por procesos evolutivos, ecológicos e históricos.

Como resultado de tres mil millones de años de evolución, en este momento de la historia del planeta se han descrito alrededor de 1.5 millones de especies de seres vivos (aproximadamente el 10% del número total que se estima existe), mismas que albergan la información genética y los procesos morfogenéticos necesarios para producir una cantidad prácticamente inexplorada de proteínas, compuestos secundarios, y bioestructuras que representan un enorme potencial de aplicación médica, industrial y agrícola. México es considerado uno de los cinco países de megadiversidad del mundo (4). Tres grupos de datos fundamentan esta afirmación:

— Es el segundo país del mundo (después de China) en tipos de ecosistemas (tabla X.1). Con excepción de los sistemas de tipo ártico, en

nuestro país existen todos los principales tipos de vegetación. Desde los páramos de montaña, pasando por varios tipos de bosques templados, hasta las selvas tropicales perennes y deciduas, y una gran variedad de ecosistemas áridos. Esta amplísima variedad de biomas ecológicos implica un potencial enorme para el descubrimiento de nuevas especies, sobre todo en los grupos taxonómicos poco explorados.

Tabla X.1
TIPOS DE ECOSISTEMAS
Los datos entre paréntesis indican el número de tipos presentes en el país respecto al total existente en América Latina (5).

Tipos de ecosistemas	México (5/5)	Brasil (5/5)	Colombia (4/5)	Chile (3/5)	Argentina (3/5)	Costa Rica (3/5)
Tipos de habitats	México (9/11)	Brasil (8/11)	Argentina (6/11)	Colombia (6/11)	Chile (4/11)	Costa Rica (4/11)
Ecorregiones	México (51/191)	Brasil (34/191)	Colombia (29/191)	Argentina (19/191)	Chile (12/191)	Costa Rica (8/191)

— México alberga un porcentaje de especies descritas cercano al 10% del total mundial (para aquellos grupos bien estudiados; tabla X.2). Este valor no considera el desconocimiento casi total de las especies que habitan nuestro territorio especialmente para muchos grupos taxonómicos con potencial biotecnológico (bacterias, hongos, protozoarios e insectos).

— La variación genética aun para un pequeño grupo de especies estudiadas en México es muy alta (5). Asimismo, México es uno de los principales centros de diversificación de germoplasma (somos uno de los llamados centros de Vavilov), útil en términos alimenticios del mundo. Sin embargo, si aún desconocemos incluso la presencia de posiblemente hasta el 90% de las especies que habitan el país, sobra decir que nuestra ignorancia sobre su genética es aún mayor.

Esta ausencia de información no debe desconsolarnos ya que la situación en el resto del mundo no es mucho mejor. Sin embargo ya se ha reconocido la importancia de esta falta de información a nivel internacional y existe un esfuerzo por conjuntar la información en medios masivos y de fácil acceso (6, 7) en el cual México va a la vanguardia.

Con respecto a la genética, biología molecular, morfología estructural y metabolismo secundario, se ha estudiado con detalle a un puñado de especies modelo (unas 20), como *Escherichia coli, Sacharomyces* spp.,

Tabla X.2
TABLA COMPARATIVA DE ESPECIES DESCRITAS
EN EL MUNDO Y EN MÉXICO

Los números aproximados de especies descritas para el mundo, y el estimado total, provienen de Groombridge, (6). Los números aproximados de especies descritas para México provienen de Conabio, 1997 (5). Los renglones con asterisco son los valores de los grupos taxonómicos mejor conocidos del planeta, donde el valor conocido se encuentra probablemente dentro de un 20% del total real.

	Especies descritas en el mundo	*Especies descritas para México*	*Porcentaje del total mundial descrito para México*	*Valor estimado total para el mundo*
Insectos	950 000	20 000	2.11	8 000 000
Plantas* (Embriofitas)	250 000	26 000	10.40	300 000
Arácnidos	75 000	3 700	4.93	750 000
Hongos	70 000	6 000	8.57	1 000 000
Moluscos	70 000	5 000	7.14	180 000
Vertebrados*	45 000	4 600	10.22	50 000
Protozoarios	40 000	1 014	2.54	200 000
Algas	40 000	4 500	11.25	200 000
Crustáceos	40 000	2 000	5.00	150 000
Nemátodos	15 000	?	?	500 000
Virus	5 000	?	?	500 000
Bacterias	4 000	?	?	400 000
Total	1 604 000	72 814.00	4.54	12 230 000

Arabidopsis, Drosophila spp., *Caenorhabditis elegans,* y algunas otras de importancia médica o alimentaria *(Zea mays, Oryza sativa, Solanum tuberosum).* Sin embargo la velocidad a la que se están añadiendo secuencias en los bancos de datos, convierte en fútil cualquier estimación del total disponible. De ahí que la exploración de la genética de las especies "poco útiles" está en su fase más incipiente. Si bien se cuenta con secuencias tanto a nivel de nucleótidos, en los genes como de aminoácidos en proteínas, obtenidas de varias decenas de miles de especies (figura X.1), en su inmensa mayoría estas secuencias lo son de pequeños fragmentos del total de la información genética de los organismos. Además hay que recordar que se estima que se conoce alrededor del 10% de las especies del planeta. Por lo tanto la figura X.1 muestra que se conoce algún fragmento de un 6% del 10% de las especies existentes. En otras palabras,

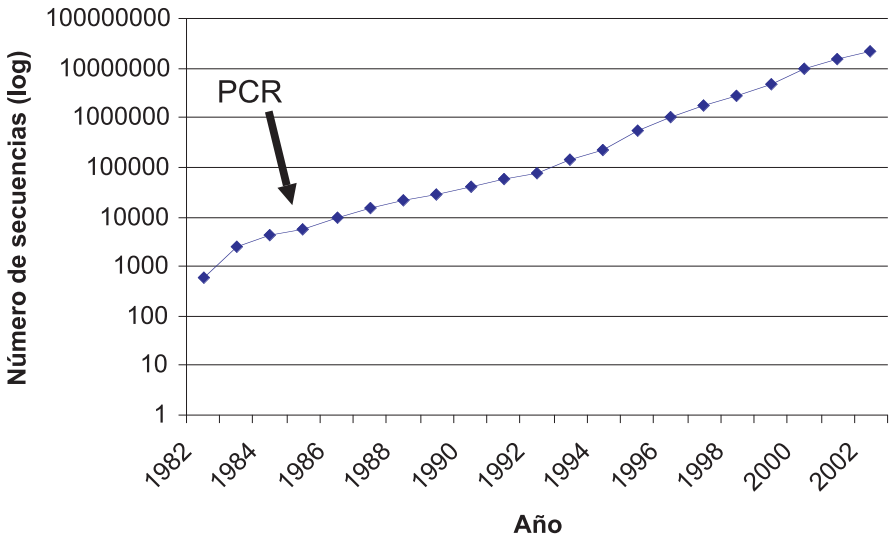


Figura X.1
SECUENCIAS PUBLICADAS EN LOS ÚLTIMOS 20 AÑOS EN EL GENBANK
La flecha indica la aparición de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (o PCR).
Datos tomados de http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html/

hemos empezado a muestrear genéticamente a menos del 1% de la variedad genética disponible en el planeta.

Los puntos anteriores tienen una implicación evidente: los recursos naturales constituidos por las especies que habitan el territorio mexicano constituyen un potencial enorme y representan una gran oportunidad para México. Estos recursos trascienden la forma tradicional de plantas medicinales (4 000 registradas), pesqueras (500), forestales (600), cinegéticas (100) y ornamentales sujetas a comercio internacional (300), y deben apreciarse muy especialmente por su enorme potencial biotecnológico. La otra cara de la moneda es que debemos ser cuidadosos para no poner en riesgo el potencial que representa nuestra biodiversidad (figura X.2).

Biotecnología y biodiversidad

Por lo anterior, el potencial de sinergia entre el conocimiento y la industria biotecnológica y la biodiversidad de México debe verse desde

Figura X.2
LA BIODIVERSIDAD EN MÉXICO REPRESENTA UNA DE LAS GRANDES RIQUEZAS NATURALES DE LA NACIÓN
En la foto se observa la selva lacandona en Chiapas, territorio extraordinariamente rico en especies biológicas, muchas de ellas en peligro de extinción.

una perspectiva doble: a) los efectos (positivos o negativos) que para la exploración, manejo, conservación y uso de la biodiversidad representa la biotecnología, y b) el potencial que la biodiversidad ofrece a la actividad biotecnológica como materia prima.

Métodos de la biología molecular aplicados a la conservación y manejo de la biodiversidad

> Modern biology has produced a genuinely new way of looking at the world… to the degree that we come to understand other organisms, we will place a greater value upon them, and on ourselves.
> E. O. Wilson, 1984.

La metodología sustentada en la biología molecular ha tenido un impacto importante en cómo se encuentra y analiza la biodiversidad. Por un lado, la biotecnología ha impactado a la taxonomía especial-

mente en los últimos años a tal grado que ya hay una polémica importante sobre la posibilidad de constituir una sistemática basada completamente en métodos moleculares (8, 9, 10). Dos desarrollos han conducido a esta posibilidad: por un lado el descubrimiento del DNA como la base fundamental, química, que caracteriza a las especies, seguido por el desarrollo de herramientas moleculares como las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, en particular el PCR descrita en capítulos anteriores, que puso al alcance de muchos laboratorios una gran cantidad de información taxonómica a un bajo costo y relativamente fácil de obtener. El segundo es el acceso público a la información a partir de bancos de datos (figura X.1) haciendo posible la comparación de especies que anteriormente con la taxonomía tradicional implicaba la visita de expertos a las diferentes colecciones del mundo para poder realizar análisis completos de los diferentes grupos de especies. Este avance no sólo implica el descubrimiento de nuevas especies sino una mejor caracterización de especies ya descritas o de otras cuya posición taxonómica sea dudosa. En el caso de organismos macroscópicos, la caracterización y conteo de las diferentes especies es relativamente sencilla. Sin embargo para los microorganismos, ésta es más complicada y últimamente la biotecnología ha ayudado al descubrimiento y caracterización de nuevas especies, especialmente de las llamadas "inconspicuas" (11, 12, 13, 14, 15), que constituyen la frontera actual del conocimiento en este tipo de organismos en el planeta (16). En México, ya hay un esfuerzo hacia la caracterización de microorganismos por medios moleculares que usa técnicas biotecnológicas (por medio de *terminal restriction fragment length polymorphism,* [17, 18]) para caracterizar comunidades de microorganismos que difieren genéticamente (figura X.3).

Si bien la factibilidad de construir toda la sistemática sobre caracteres moleculares es remota (la necesidad de interpretar, decidir, correlacionar caracteres morfológicos, ecológicos, etológicos etc., no desaparece por el hecho de contar con métodos moleculares) el hecho práctico es que el avance de la sistemática molecular implica crear bancos de células, tejidos y de secuencias de fragmentos genómicos, avanzar significativamente en la capacidad de determinar las secuencias nucleotídicas en cantidades gigantescas y extender la capacidad nacional para llevar a cabo el diagnóstico de características (*fingerprinting*) a través de material genético. Por otro lado, es imperativo avanzar en bioinformática, adoptando las mejores tecnologías, pero también desarrollando nuestros propios sistemas, en particular en sus interfaces con la bioinformática de los

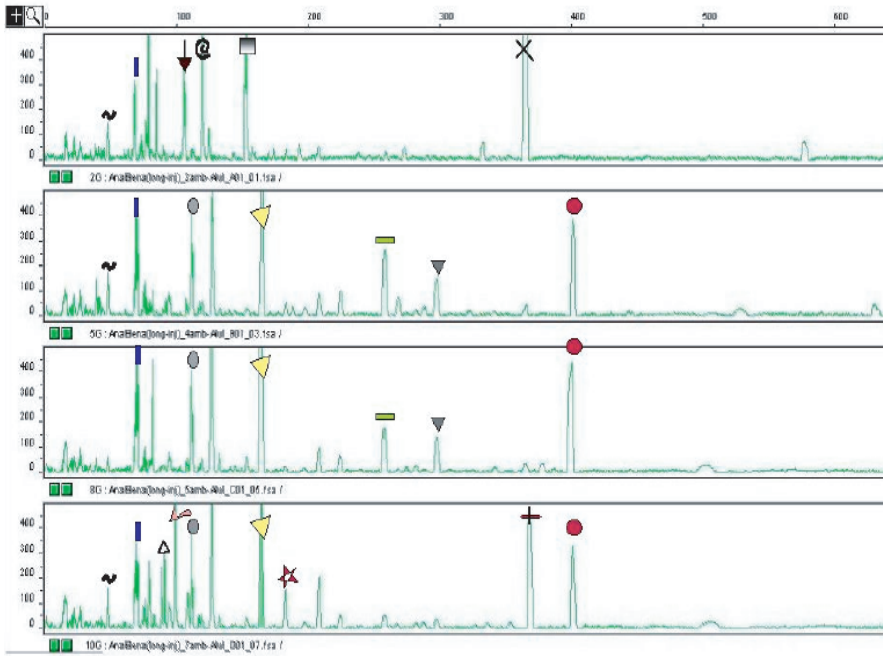


Figura X.3

PATRONES DE TRF´S (TERMINAL RESTRICTION FRAGMENTS)
RESULTADO DE LA DIGESTIÓN CON *Alu*I DEL EXTREMO 5'-3' DEL GEN 16S RRNA
Los símbolos sobre los fragmentos indican las similitudes en la composición de las comunidades microbianas analizadas. Se muestran los patrones para cuatro sitios de las pozas de Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. (Figura cortesía de Valeria Souza y Luis Eguiarte, Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, UNAM).

siguientes niveles de complejidad (especies y biomas), donde nuestro país es considerado líder (19). Estos avances van a tener un beneficio directo para el descubrimiento de nuevos genes que pueden mejorar la productividad agropecuaria o forestal, la producción de nuevos fármacos, adaptación de especies silvestres para la agricultura y la prevención de brotes de patógenos o especies invasoras de animales y plantas.

Otro impacto importante de la biotecnología moderna en la biología es en la conservación y manejo de especies. Hasta los años setenta la taxonomía se consideraba una actividad puramente académica, con algunas aplicaciones en agronomía y medicina, y las incertidumbres taxonómicas tenían poca relevancia en la vida cotidiana. Cuando la identificación taxonómica correcta empezó a ser utilizada como la base para la protec-

ción legal de especies con todas sus implicaciones para la conservación, los estudios de impacto ambiental y la solución de conflictos internacionales, la importancia de una correcta identificación se convirtió en un aspecto imperativo para la biología de la conservación. En especial, se formularon criterios para priorizar especies sujetas a protección legal (distinción taxonómica o profundidad en la divergencia filogenética; [20]), que hasta el desarrollo de los bancos de información y las técnicas moleculares hubieran sido prácticamente imposible.

Para especies amenazadas de sobreexplotación, la genética molecular ha generado una herramienta adicional para la conservación, específicamente la identificación forense de productos comerciales (por ejemplo, marfíl, carne, plumas, hojas secas) de especies en peligro de extinción (21, 22). El ejemplo más claro de esto es la identificación de carne de diferentes especies de ballenas en el mercado japonés; las carnes pueden identificarse a nivel de especies o poblaciones específicas y corroborar los permisos de colecta con el origen de los productos en los mercados comerciales (23). Para México, el caso es especialmente importante.

Otro ejemplo es el de conservación de tortugas marinas. A las playas mexicanas llegan a anidar siete de las ocho especies de tortugas marinas. Por métodos tradicionales y de biología molecular se ha demostrado que existe una fidelidad a las zonas de anidación por los adultos. La alta diferenciación genética entre zonas de anidación implica una diferenciación demográfica al menos en tiempos ecológicos. En el lenguaje de la conservación internacional, el país que es impactado por el consumo de recurso naturales en regiones remotas tiene derechos. Esto implica que bajo leyes internacionales las naciones como México, donde anidan las tortugas, tiene cierta jurisdicción sobre la explotación de la tortuga marina en lugares más remotos. Casos similares suceden con las cerca de 300 especies de aves migratorias que se comparten con Norteamérica en donde las técnicas moleculares han dado evidencia acerca de las posibles rutas de migración y las zonas de anidación o invernado en México. Esto se encuentra vinculado a la extensión de la capacidad y desarrollo de nuevas técnicas y métodos para el marcaje y monitoreo de ejemplares, especialmente de acuerdo con los requerimientos del comercio internacional (p. ej. CITES) y a los emergentes "mercados verdes", que requieren de certificaciones de origen que en esencia implican el poder demostrar la procedencia precisa (a nivel de predio, unidad de manejo o población) de especímenes de cactáceas, orquídeas, mariposas y partes o ejem-

plares enteros de vertebrados objeto de caza mayor o de producción para pieles. Existe un gran potencial para el desarrollo de métodos de caracterización genéticas que permitan certificar, con propósitos legales, la procedencia de tales materiales, por un lado para poder tener la información necesaria para identificar el origen legal de los materiales, y por otro para poder realizar reintroducciones de especies a medios silvestres.

La biotecnología moderna también ha ayudado a la realización de diagnósticos veterinarios y forenses aplicados a fauna silvestre que contribuyen a mejorar la viabilidad de programas de conservación *in situ*. Los programas de reintroducción de especies han sido uno de los mecanismos para la recuperación de especies que han sido extirpados de su hábitat. La identificación de *stocks* puros y la identificación de posibles híbridos puede hacer que un programa de reintroducción fracase o sea todo un éxito. Por ejemplo, la zorra roja (*Canis rufus*) no tiene poblaciones en condiciones naturales y los programas de reintroducción han detectado una alta hibridización con coyotes (*Canis latrans*) en los sitios en donde se ha introducido. Esto ha provocado que el programa de reintroducción de *C. rufus* tiene que considerar la posible remoción de coyotes en las zonas de reintroducción (24). El pez de agua dulce *Poeciliopsis occidentalis,* se encuentra amenazado en la población de Arizona, mientras que las poblaciones en Sonora se encuentran en relativamente buen estado; sin embargo las poblaciones de Sonora son suficientemente diferentes de las poblaciones de Arizona y por ello no permiten una reintroducción de Sonora a Arizona (25).

Por último, la biotecnología ha ayudado a mejorar las colecciones de bancos de semillas no sólo de especies de importancia agrícola sino también de bancos de semillas de especies silvestres que posiblemente se encuentren en peligro de extinción. En la organización de estos bancos de germoplasma, la diversidad genética puede ser maximizada por medio del conocimiento de cómo se encuentra particionada la variación genética en condiciones naturales, en donde las herramientas de la biotecnología están particularmente bien adecuadas (26). En general, al caracterizar los niveles de variación genética en cualquier especie, los métodos moleculares pueden ayudar a identificar los recursos genéticos (especies, poblaciones y localidades) que la biología de la conservación requiere preservar. La gran riqueza biológica de México hace que los temas de conservación que involucren a la biotecnología sean cada vez más importantes, ante las amenazas a la conservación de organismos en ambientes naturales. El potencial de técnicas desarrolladas estaría aco-

plada directamente a mejores tomas de decisiones en el ámbito de la conservación y la protección de la fauna y flora en términos legales a nivel internacional.

Posibles riesgos; la bioseguridad

Si bien existe una enorme cantidad de literatura amarillista respecto a los riesgos que para las especies silvestres tiene la introducción al campo de "organismos vivos genéticamente modificados" (OGMs) (27, 28, 29, 30), existen posibles riesgos reales, directos e indirectos, que en esta sección simplemente serán mencionados, sin pretender tomar una postura.

El posible riesgo directo principal es el de la contaminación genética de parientes silvestres de los OGMs (31). La posibilidad de transferencia de genes ajenos entre un OGM y sus parientes silvestres se ha demostrado experimentalmente (32). La dinámica de tales transferencias en condiciones de campo es imposible de discutir en general, ya que depende, en esencia, de la adecuación (*fitness*) de los genes en cuestión en situaciones naturales, la cual depende de muchísimos factores locales que han sido poco estudiados (33, 34). Por lo tanto, minimizar los riesgos de contaminación se convierte en un asunto de identificación de los factores que pueden afectar: i) la transmisión de material genético a ejemplares silvestres, y ii) la posible dinámica de las poblaciones afectadas. En estos términos, nuestro país debe desarrollar la capacidad para dar seguimiento y monitorear una posible contaminación genética a parientes silvestres de OGM. Un ejemplo reciente de esto es la identificación de OGMs en zonas de alta diversidad de variedades de maíz (35). No hacerlo nos pondría en un estado de indefensión ante un posible evento de contaminación.

El principal posible riesgo indirecto radica en el hecho de que la biotecnología aplicada a la agricultura despoja, de hecho, al campesino de bajos recursos del control sobre buena parte del proceso agrícola. La agricultura biotecnologizada forma parte de un proceso general y amplio de simplificación e industrialización del campo que muchos asocian con la falta de sustentabilidad y por ende con una amenaza a la seguridad alimentaria en el largo plazo.

Si bien los puntos anteriores pueden considerarse debatibles, tienen una realidad política innegable que nuestro gobierno y la sociedad mexicana no deben ignorar.

La mayor parte de los otros posibles riesgos mencionados en la literatura (efectos sobre especies no blanco, escape de especies de alta ade-

cuación, etc.) no han podido ser demostrados en situaciones de campo. Sin embargo, la posibilidad de que se presente alguno de éstos es real, y nuestro país debe invertir recursos en la investigación de dichas posibilidades en campo, así como en el diseño y establecimiento de esquemas de monitoreo para dar seguimiento a las introducciones de organismos transgénicos al campo.

El potencial de la biotecnología y la biodiversidad

El potencial que la biodiversidad ofrece a la actividad biotecnológica como materia prima

Los humanos han dependido de la naturaleza para sus necesidades básicas de producción de alimentos, transporte, fertilizante, saborizantes, fragancias y medicamentos. Aún ahora, de manera cotidiana se describen nuevos productos derivados de todo tipo de organismos, como los nuevos terpenos derivados del cocodrilo (36), y que tienen uso potencial contra los gorgojos folívoros del cedro *Cedrela odorata* (37), los metabolitos organoclorados como posibles pesticidas de la planta *Lilium mamimowiczii* (38) y los antimicrobianos del tiburón *Squalus acanthias* (39). Las plantas han formado la base de sistemas de medicina tradicional que han existido desde hace muchos miles de años, desde las tabletas en escritura cuneiforme de Mesopotamia (2600 a. C.) con aproximadamente 1 000 sustancias derivadas de plantas, el sistema ayurvédico de la India (de 1000 a. C., con cerca de 800 drogas), los descubrimientos griegos de Dioscorides (100 a. C.) y Galeno (130-200 d. C.), hasta la primera droga natural comercial (morfina) obtenida por Merck en 1826 y la primera droga sintética (aspirina) por Bayer en 1899. Un pequeño análisis de la importancia de los productos derivados de plantas en los sistemas de salud de países desarrollados (de 1959 a 1980), indicó que cerca del 25% de los medicamentos contenían extractos de plantas o principios activos derivados de plantas vasculares. Ahora, al menos 119 sustancias químicas derivadas de 90 especies de plantas pueden considerarse como drogas importantes que son utilizadas en el mundo (39). De estas 119 drogas, 74% fueron descubiertas como resultado de estudio químicos dirigidos al asilamiento de las sustancias activas de plantas utilizadas en la medicina tradicional (40). Esto sólo ejemplifica el caso de plantas; sin embargo, las drogas utilizadas en la medicina se pueden encontrar en una diversidad de grupos desde

Tabla X.3
DROGAS Y LAS ESPECIES DE LAS CUALES FUERON DERIVADAS

Tipo de medicamento	*Agente bioactivo*	*Especie original del cual fue aislado*	*Reino*
Agentes antiinfecciosos	Cefalosporina	*Cephalosporium acremonium*	Fungi (Sporophorinaceae)
	Estreptomicina, aminoglucósidos, tetraciclinas, eritromicina	*Streptomyces griseus*	Monera (Actinomycetes)
	Aminoglucósidos	*Actinomycetales*	Monera (Actinomycetes)
Antimalaria	Quininas	*Cinchona*	Plantae (Rubiaceae)
		Artemisia annua	Plantae (Asteraceae)
		Sigmosceptrella, Prianos y Plakortis	Animalia (Porifera)
Antivirales	Vidabarine	*Eunicella cavolini*	Animalia (Porifera)
Cardiovascular	Efedrina	*Ephedra sinaica y E. equisetina*	Plantae (Ephedraceae)
	Inhibidores de ACE (*angiotensin converting enzyme*)	*Bothrops jararaca*	Animalia (Reptilia)
Dolor SNC	Opiácios	*Papaver somniferum*	Plantae (Papaveraceae)
	Conotoxinas	*Conos*	Animalia (Mollusca)
	Epibatidina	*Epipedobates tricolor*	Animalia (Amphibia)
Antitumorales Antineoplásicos	Vinblastina	*Catharanthus roseus*	Plantae (Apocynaceae)
	Etoposide	*Podophyllum*	Plantae (Araceae)
	Camptotecina	*Camptotheca acuminata*	Plantae (Nyssaceae)
	Paclitaxel	*Taxus brevifolia*	Plantae (Taxaceae)
	Flavopiridol	*Dysoxylum binectariferum*	Plantae (Meliaceae)
	Blenoxano	*Streptomyces*	Monera (Actinomycetes)
	Spongouridina	*Cryptotheca crypta*	Animalia (Porifera)
	Bryostatin	*Bugula neritina*	Animalia (Ectoprocta)
	Ecteinascidina	*Ecteinascidea turbinata*	Animalia (Ascidiaceae)
	Sarcodicitina	*Sarcodictyon roseum*	Animalia (Porifera)

vertebrados (41) hasta organismos marinos (42) (tabla X.3). En el campo de la bioingeniería, ya hay algunos ejemplos del uso de fibras de origen natural como posibles precursores de nuevos materiales. En la Universidad de California ya hay un grupo que ha generado fibra óptica de excelente calidad usando un núcleo de tela de las arañas *Nephila magadascariensis* y *Stegodyphus pacificus*. La implicación de esta tecnología va desde mejores equipos ópticos con mejor resolución hasta la generación de sensores capaces de describir la química supramolecular de sustancias (43).

Basta con revisar los últimos números de las revista *Journal of Natural Products, Natural Products Report, Journal of Asian Natural Products, Nigerian Journal of Natural Products* y el *Journal of Medicine and Aromatic Plant Sciences* para comprender la riqueza de compuestos naturales que se descubren cada mes y el enorme potencial que tienen al respecto los países megadiversos. Especialmente para México hay cerca de 4 000 plantas usadas en la medicina tradicional mexicana con un potencial enorme de explotación. Para traducirlo en términos monetarios, la compañía SmithKline Beecham vendió durante 1997, 1 500 millones de dólares de un antibiótico (Augmentin®) cuya patente venció el año pasado (44). Sin embargo también es necesario señalar que aunque la naturaleza es el mejor químico del mundo y tiene el potencial de producir productos naturales bioactivos, esto es sólo la primera parte para el desarrollo de un producto, en donde la biotecnología juega un papel doble, primero en la identificación y aislamiento de posibles agentes y el segundo en la optimización y síntesis de posibles medicamentos por medio de la farmacocinética y la toxicología.

Las especies de México como fuentes de materia prima

Como ya se mencionara anteriormente, el potencial que tienen las especies biológicas que habitan en nuestro país como fuentes de moléculas, estructuras, procesos metabólicos y material genético es de los más grandes del mundo. Para ejemplificar el potencial mexicano daremos algunos ejemplos. Los infartos más comunes son los llamados infartos isquémicos; la única droga aprobada para evitar este tipo de infarto es el tPA (*tissue plasminogen activator*); sin embargo su administración puede provocar daño cerebral. La enzima aislada y sintetizada Desmoteplasa (DSPA) de la saliva de *Desmodus rotundus* (es una de tres especies de murciélagos hematógafos que existen y que se encuentra en México), al parecer es un excelente anticoagulante y no tiene los efectos secundarios de

tPA, al menos en pruebas experimentales (45). Éste es sólo un ejemplo, y el potencial en medicina es claro cuando tomamos como referencia la medicina tradicional mexicana que cuenta con cerca de 4 000 plantas medicinales registradas (45, 46, 47).

Las instituciones de México cometerían un error mayúsculo si no se posicionan agresivamente para aprovechar este potencial. Este posicionamiento debe darse en tres vertientes principales:

1. Caracterización y descripción del potencial, principalmente en la frontera representada por las especies poco estudiadas (extremófilos, flora y fauna asociada a intestinos de insectos, flora y fauna edáficas). Como ya se dijo esto implica desarrollar bancos de biomateriales y bioinformática.

2. Formación de recursos humanos e institucionales en las áreas de sistemática molecular, genómica y proteómica.

3. Generación de empresas y proyectos tecnológicos.

Acceso a los recursos genéticos

El problema del acceso al potencial de recursos biológicos del país está enmarcado en la legislación ambiental (arts. 15 del CDB y 87bis de la LGEEPA) y de propiedad intelectual (Ley de Propiedad Industrial, art. 8(j) del CDB y los tratados multilaterales aplicables). Existen grandes lagunas legales y de capacidad institucional para encontrar el correcto balance entre protección de la biodiversidad y promoción de un uso correcto. En particular, el país debe afrontar la necesidad de contar con una ley de acceso a los recursos biológicos. Los extremos del problema están representados por una parte por el riesgo de que el país sea despojado de sus recursos y por el otro el de crear legislación tan restrictiva que cualquier uso que se haga de los recursos biológicos sea ilegal.

Una buena ley de acceso a los recursos biológicos debe partir de la base de que los "recursos" son eso, recursos, y por lo tanto se debe promover su utilización. Sin embargo, dicha utilización debe beneficiar a la nación, finalmente soberana sobre nuestros recursos naturales, y a los habitantes locales, de cuyas tierras saldrán necesariamente las muestras físicas. Por otra parte, en caso de que exista, es esencial proteger el conocimiento tradicional sobre los compuestos naturales que sirvan para posteriores desarrollos biotecnológicos. Posiblemente este punto requiera el desarrollo de legislación paralela sobre un sistema *sui generis* para prote-

ger el conocimiento tradicional, indígena y campesino. Finalmente, puesto que la actual biotecnología está basada en la posibilidad de proteger el componente intangible del recurso, esto es, el conocimiento científico derivado (secuencias genéticas, estructuras moleculares, vías metabólicas, procesos), una buena ley de acceso debe establecer correctamente sus relaciones con la legislación sobre propiedad industrial e intelectual.

Cualesquiera que sean los requisitos legales que México establezca para realizar la prospección biotecnológica sobre nuestros recursos vivos, finalmente habrá que negociar acuerdos internacionales que reconozcan la "legal procedencia" (de acuerdo con las legislaciones nacionales) de los materiales o el conocimiento preexistente o generado. La creación del grupo internacional llamado "Países Megadiversos Afines", debida en buena medida a nuestra diplomacia medioambiental, deberá permitir a México definir primero y negociar después los elementos de legislación internacional que satisfagan las necesidades nacionales y que recompensen adecuadamente a los campesinos sobre cuya tierras se encuentra la excepcional diversidad biológica de nuestro país.

Bibliografía

1. Gaston K., S. Spicer. Biodiversity: An introduction. Blackwell Science, Oxford, UK. (1998).
2. Gaston, K. Species richness. Measure and measurement. En Gaston, K. Biodiversity: a biology of numbers and difference. Blackwell Science, UK. (1996).
3. Soberon, J. Linking biodiversity information sources. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 291 (1999).
4. Mittermeier, R., C. Goetsch. Megadiversidad. Los países biológicamente más ricos del mundo. CEMEX, México. (1997).
5. Conabio. La diversidad biológica de México: estudio de país. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. (1997).
6. Groombridge, (1992).
7. Wilson, E.O. The encyclopedia of life. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 77-80 (2003).
8. Tautz, D., P. Arctander, A. Inelli, R.H. Thomas, A.P. Vogler. A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 70-74 (2003).
9. Lipscomb, D., N. Platnick, Q. Wheeler. The intellectual content of taxonomy: a comment on DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 65-66 (2003).

10. Hebert, K.K. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London Series B* 270: 313-321 (2003).
11. Hebert, K.K. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London Series B* 270: 313-321 (2003).
12. Hebert, K.K. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society London Series B* 270: 313-321 (2003).
13. Moreira, D., Lopez Garcia P. The molecular ecology of microbial eukaryotes unveils a hidden world. *Trends in Microbiology* 10: 31-38 (2003).
14. Dunbar, J., Ticknor, L.O., Kuske, C.R. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA Gene terminal Restriction Fragment Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2943-2950 (2000).
15. Theron, J., T.E. Cloete. Molecular techniques for detecting microbial diversity and community structure in natural environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 26: 27-57 (2000).
16. Curtis, T.P., W.T. Sloan, J. W. Scanell. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA 99: 1064-1066.
17. Marsh, T.L. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 323-327 (1999).
18. Tiedje, J.M., S. Asuming-Brempong, K. Nusslein, T.L. Marsh, S.J. Flynn. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil. Ecol.* 64: 2894-2898 (1999).
19. *Nature* 384: 105 (1998).
20. May, R.T. Conservation and Disease. *Conservation Biology* 2: 28-30 (1988).
21. Baskin, Y. Archaeologists lend a hand to rhino protection. *BioScience* 41: 532-534 (1988).
22. Cronin, M.A., Palmisciano, D.R., Vyse, E.R., D.G. Cameron. Mitochondrial DNA in wildlife forensic science: species identification of tisues. *Wildl. Soc. Bull.* 19: 94-105 (1988).
23. Baker, C.S., S.R. Palumbi. Population structure, molecular systematics, and forensic identification of whales and dolphins. En Conservation Genetics: Case Histories from Nature. J. C. Avise y J. L. Hamrick (eds). pp. 10-49. Chapman and Hall, New York, USA. (1995).
24. Wayne, R.K. Conservation genetics in the Canidae. En: Conservation Genetics: Case Histories from Nature. J. C. Avise y J. L. Hamrick (eds). pp. 75-118. Chapman and Hall, New York, USA. (1995).
25. Vrijenhoek, R.C., M.E. Douglas, G.K. Meffe. Conservation genetics of endangered fish populations in Arizona. *Science* 229: 400-402 (1985).
26. Vrijenhoek, R.C., M.E. Douglas, G.K. Meffe. Conservation genetics of endangered fish populations in Arizona. *Science* 229: 400-402 (1985).

27. Colwell, R.K., G.A. Norse, D.Pimentel, F.E. Sharpes, D. Simberloff. Genetic engineering in agriculture. *Science* 229: 111-112 (1985).
28. Tiedje, J.M., R.K. Colwell, Y.L. Grossman, R.E. Hodson, R.E. Lenski, R.N. Mack, P.J. Regal. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology* 70: 298-315 (1989).
29. Raybould, A.F., A.J. Gray. Genetically modified crops and hybridization with wild relatives. *Journal of Applied Ecology* 30: 199-219 (1985).
30. Snow, A.A., P.M. Palma. 1997. Commercialization of transgenic plants: potential ecological risks. *BioScience* 47: 86-96.
31. Ellstrand, N., K.A. Shierenbeck. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences,* USA 97: 7043-7050 (2000).
32. Ellstrand, N., C.A. Hoffman. Hybridization as an avenue of escape for engineered genes. *BioScience* 24: 438-442 (1990).
33. Bergelson, J. Failing to predict invasiveness from changes in fecundity: a model study of transgenic plants using resistant *Arabidopsis thaliana. Ecology* 75: 249-252 (1994).
34. Purrington, C.B., J. Bergelson. Assessing weediness of transgenic crops: industry plays plant ecologist. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 340-342 (1995).
35. Ezcurra, E., S. Ortiz, J. Soberon. Evidence of Gene Flow from Transgenic Maize to Local Varieties. En LMOs and the Environment. Proceedings of an International Conference, November 27-30, 2001 (2002) (Ed.), Craig R. Roseland, Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), Paris, France, (en prensa).
36. Schulz, S., K. Kruckert, P. Weldon. New terpene hydrocarbons from the Alligatoridae (Crocodylia, Reptilia). *Journal of Natural Products* 66: 34-38 (2003).
37. Veitch, N.C., Wright, G., P.C. Stevenson. Four new tetranortriterpenoids from Cedrela odorata associated with leaf rejection by *Exopthalmus jekelianus. J. Nat. Prod.* 62: 1260-1263 (1999).
38. Monde, K., H. Satoh, M. Nakamura, M. Tamura, M. Takasugi. Organochlorine compounds from a terrestrial higher plant: structures and origin of chlorinated orcino derivatives from diseased bulbs of *Lilium mamimowiczii. J. Nat Prod.* 61: 913-921 (1998).
39. Rao. M. N., Shinnar, A.E., Noecker, L.A., Chao. T.L., Feibush, B., Snyder, B., Sharkansky, I., Sarkahian, A., Zhang, X., Jones, S.R., Kinney, W.A., M. Zasloff. Aminosterols from the dogfish shark *Squalus acanthias. J. Nat Prod.* 63: 631-635 (2000).
40. Newman, D. J., G.M. Cragg, K.M. Snader. The influence of natural products upon drug therapy. *Nat. Prod. Rep.* 17: 215-234 2000.

41. Herbert, R.P., H. Venter, S. Pos. Do mammals make their own morphines? *Natural products Report* 17: 317-322 (2000).
42. Faulkner, D.J. Highlights of marine natural products chemistry (1972-1999). *Nat. Prod. Rep.* 17: 1-6 2000.
43. Huang, L., H. Wang, C.Y. Hayashi, B. Tian, D. Zhao, Y. Yushan. Single-strand spider silk templating for the formation of hierarchically ordered hollow mesoporous silica fibers. *Journal of Materials Chemistry* 13: 666-668 2003.
44. Newman, D.J., S.A. Laird. The commercial use of biodiversity. Ed. K. ten Kate y S. A. Laird (eds). Eartscan publications, London, (1999).
45. Liberatore, G., A. Samson, C. Bladin, W.-D. Schleuning, R.L. Medcalf. 2003. Vampire bat salivary plasminogen activator (Desmoteplase). *Stroke* 34: 537-543.
46. Aguilar, A., A. Argueta, C. Cano. Flora medicinal indígena de México. Volúmenes 1-3. Instituto Nacional Indigenista, México D. F., México, (1994).
47. Bye, R. The role of humans in the diversification of plants in México. En Ramamoorthy et al (editores). Biological diversity of México: Origins and distribution. Oxford University Press, UK, (1993).

Capítulo XI

BIOTECNOLOGÍA AGROECOLÓGICA, BIODIVERSIDAD Y AGRICULTURA SUSTENTABLE

J.A. Serratos Hernández

Biotecnología agroecológica

Por ser una tecnología que se sustenta en diferentes áreas y disciplinas del conocimiento científico, la biotecnología se ha integrado a éstas dando lugar a la generación de especialidades que influyen o cubren cada uno de estos campos como la biotecnología forestal, agrícola, pecuaria, marina y ambiental. En este esquema es notable que un área de la biotecnología que no ha sido desarrollada, en particular para un país con las singularidades de megabiodiversidad como México, es la agroecológica. La intención de este capítulo es avanzar en la definición de una nueva especialidad, la biotecnología agroecológica como una disciplina de apoyo para la agricultura sustentable.

Así como en cada una de las especialidades biotecnológicas, para la biotecnología agroecológica se deberán establecer las fronteras de su campo de acción, las cuales están definidas por las ciencias que las sustentan: la biología molecular y la ecología (1). La escala de esta disciplina científica va de lo molecular a lo biogeográfico y, de manera particular, se enfoca a la interacción entre estos dos extremos. Esto es, ¿cómo y en qué magnitud la manipulación de los genomas de los organismos por medio de la biotecnología moderna, impactarán o funcionarán en el nivel poblacional y en el agroecosistema; cuáles son los procesos y mecanismos que mantienen el funcionamiento de los agroecosistemas, cómo conservar la biodiversidad y cómo aprovechar, de una forma sustentable, los recursos naturales de los agroecosistemas en general? Por lo tanto, una de las tareas prioritarias en la definición de la biotecnología agroecológica es identificar las áreas de conocimiento y desarrollo tecnológico que deberán ser atendidas por esta disciplina científica.

Desde hace algunos años se ha sugerido que la biotecnología moderna, en particular la sustentada en la biología molecular, es una herramienta que puede desempeñar un papel de comprensión y de diagnóstico en la descripción de procesos tales como la función de factores limitantes en el desarrollo y producción de plantas, así como la descripción y caracterización de la biodiversidad (2). Asimismo, se ha considerado que la biotecnología puede ser un elemento de gran utilidad en el conocimiento y manejo de los agroecosistemas, en un sentido que la biotecnología fuese complementaria con la agroecología al incorporar la escala molecular a la comprensión del funcionamiento de los ecosistemas agrícolas (1, 3, 4).

En la identificación de las áreas y temas de estudio, así como en la aplicación de la biotecnología agroecológica, es indispensable tomar como punto de partida el diagnóstico general del estado que guardan los ecosistemas en México. Un buen diagnóstico del estado de estos agroecosistemas es de particular importancia para iniciar el desarrollo de propuestas biotecnológicas específicas y pertinentes, que apunten a la solución de problemas de producción y manejo en estos sistemas, bajo un esquema general de preservación, mantenimiento y sustentabilidad de las actividades agrícolas, pecuarias y, cada vez con mayor urgencia, las forestales. Sin embargo, y a pesar de su importancia, una gran cantidad de datos y su sistematización, sigue faltando no sólo en México sino a nivel mundial.

Se ha apuntado que en la escala de los ecosistemas es necesario el estudio de procesos que involucran el concurso de especies en arreglos complejos que interaccionan y se complementan unas con otras en condiciones ambientales específicas. Para concretar estos estudios se requiere una gran cantidad de información debidamente cotejada por medio de confirmación de terreno, y en particular cuantificada, para poder determinar los parámetros que se consideren fundamentales en relación con, por ejemplo, la capacidad de recuperación de los ecosistemas ante la pérdida de biodiversidad (5), la cual se ha determinado que es vital para el funcionamiento y manejo de los ecosistemas (6, 7, 8, 9, 10). En todos estos procesos que se llevan a cabo en los ecosistemas, la biotecnología moderna podría ser no sólo una herramienta descriptiva sino además una fuente de datos indispensables para la predicción del comportamiento de los organismos en su medio ambiente y de la interacción entre ellos (2). Por otra parte, existe un renovado interés por la biología de sistemas biológicos con un enfoque computacional, que sin duda impactará positivamente el desarrollo de áreas como la biotecnología

agroecológica ya que la jerarquía de los sistemas biológicos se compone de elementos que van desde lo molecular, hasta las redes de interacción ecológica entre especies lo cual puede ser explorado a través de la teoría de sistemas (11). El enfoque de sistemas está íntimamente ligado al desarrollo de la bioinformática que en la actualidad apunta a la integración de todos los niveles y escalas de la biología en dos aspectos muy importantes: la exploración de datos y generación de conocimiento, y en el análisis con base en simulación. Una revisión reciente de este tema permite suponer que en el futuro próximo la biotecnología se desarrollará dentro de un ambiente virtual para explorar la dinámica de procesos celulares (12), el lenguaje genético (13), la evolución y comparación de los genomas (14), y posiblemente las redes de interacciones ecológicas con la incorporación de los organismos genéticamente modificados (11, 12).

En México se carece de una sistematización de la información agroecológica generada en diversas instituciones. Aunque la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad ha producido y compilado una gran cantidad de información acerca de la biodiversidad de México (15), entendida ésta como el conjunto de todos los seres vivos que coexisten en un ecosistema, persiste sin embargo, una gran dispersión en la distribución y uso de la información a pesar de que existe una gran tradición en cuanto al estudio de los agroecosistemas, su relación con la agricultura campesina y la conservación y uso de la biodiversidad y en particular de germoplasma (16, 17, 18, 19, 20). En virtud de esta problemática, para la integración de este capítulo se decidió consultar las fuentes de información más generales con relación al funcionamiento del sector agropecuario y forestal de México de consulta pública en la página de Internet de la FAO (21). El inconveniente de las bases de datos de la FAO es el difícil desglose y la complejidad del análisis particular de sistemas agroecológicos y tradicionales, pero por otro lado permiten un análisis global de este sector y su tendencia histórica en la interacción con los cambios en el uso del suelo, cambios de estructura poblacional y algunas actividades económicas de este sector. Este tipo de información permite conocer qué es lo que más se cultiva y produce en México, en qué superficie y cuántos recursos se requieren para estas actividades, con lo que se pueden definir cuáles son las fuerzas directrices que dominan en el sistema de producción agropecuario mexicano y su impacto en otros ecosistemas, en los recursos naturales y en los demás sectores. Se debe enfatizar que un esquema de agricultura sustentable involucra dimensiones que van más allá de consideraciones y propuestas meramente tec-

nológicas, ya que éstas deben ser congruentes con las condiciones de los agroecosistemas, el ambiente en general y de manera muy importante, con las comunidades campesinas o rurales que forman parte integral de estos sistemas.

Una vez identificado el estado que guardan los agroecosistemas en México y los problemas más graves a los que se enfrenta la sociedad en su conjunto, y las poblaciones de personas que viven alrededor de estos sistemas para manejar la producción y su sostenimiento, se proponen estrategias de investigación y desarrollo biotecnológico que intentan suscribirse a un esquema de agricultura sustentable, cuyo objetivo fundamental es el aporte de innovaciones propias y específicas para las condiciones ambientales, agrícolas, sociales y económicas de nuestro país. La biotecnología agropecuaria y forestal que se desarrolla en otros países no es, en la mayoría de los casos, adecuada en todos aspectos para los agroecosistemas que se manejan y que persisten en México. Los productos biotecnológicos que existen en el mercado mundial se han diseñado hasta ahora para atender o resolver problemas que se presentan en otros tipos de agroecosistemas particulares y bajo esquemas diferentes de manejo a los que se utilizan en México, por lo que no es recomendable que se traten de imponer y transferir indiscriminadamente a nuestros sistemas de producción, sin un análisis de pertinencia, por el riesgo de generar una mayor dependencia tecnológica y que no aporte un beneficio significativo a la sustentabilidad de la producción agropecuaria. De la misma forma, se debe ponderar el riesgo de renunciar a la utilización de la biotecnología. Se cometería un gravísimo error si no se utiliza el conocimiento y la innovación que se desprenderá de esta revolución biotecnológica; sin embargo, deberá enfatizarse que el objetivo estratégico es la generación de propuestas adecuadas y pertinentes que permitan un aprovechamiento sustentable de nuestras ventajas comparativas, en cuanto a la singularidad de la diversidad biológica de nuestro país y que nos sitúen en el camino de un desarrollo tecnológico independiente y propio.

La industria biotecnológica nacional es muy incipiente, con escasos ejemplos de empresas biotecnológicas mexicanas o de empresas que utilicen algún tipo de biotecnología moderna. En la mayor parte de los casos, las biotecnologías que se emplean en nuestro país corresponden a las primeras generaciones de desarrollo biotecnológico y son de utilización muy limitada, como las técnicas de micropropagación o de fermentadores y biocatálisis (22). Sin embargo, empiezan a aparecer también algunos ejemplos del uso de biotecnología moderna en la industria

mexicana. Por otro lado, en México existen centros públicos de investigación en biotecnología que sobresalen por su capacidad en innovación tecnológica y desarrollo científico, pero se encuentran poco vinculados con los sectores en donde podrían tener impacto positivo. El nivel de desarrollo económico de nuestro país y las grandes asimetrías que existen por la pobreza creciente en el sector agrícola, obligan a explorar desde el nivel científico y tecnológico, la mejor manera de aprovechar la biotecnología. Es muy difícil cerrar la brecha entre la investigación y el desarrollo tecnológico, y particularmente la aplicación de la biotecnología a la solución de problemas concretos en el sector agropecuario de México es aún más compleja de alcanzar, principalmente por sus grandes rezagos y particularidades.

En adición a la problemática del campo y la brecha tecnológica, generada principalmente por una inequitativa distribución de la riqueza y falta de apoyo a los diferentes estratos sociales en el sector rural, se debe analizar detalladamente el asunto relacionado con el nivel de concentración tecnológica de las grandes corporaciones biotecnológicas transnacionales al representar un verdadero problema para la utilización de ciertas tecnologías, que debe ser resuelto de manera inteligente y mediante un esfuerzo importante y respetuoso de los diferentes actores. Es indispensable que en nuestro país las propuestas de desarrollo en el área de la biotecnología partan del principio de una mayor independencia tecnológica para la solución de los problemas específicos del campo mexicano, con lo que se fomentaría una biotecnología adecuada y congruente con la situación de los agroecosistemas y las demandas sociales y económicas del sector agropecuario mexicano. En el caso particular de la biotecnología agroecológica como un elemento de la agricultura sustentable, será necesario empezar con el establecimiento de un esfuerzo nacional que integre y concierte las disciplinas científicas básicas de la biotecnología y la agroecología para, en primera instancia, abordar algunas propuestas de líneas de investigación identificadas como relevantes para el desarrollo de la biotecnología con el objetivo de afinarlas y ponderar su viabilidad en el contexto de las condiciones de los agroecosistemas en México (4).

Ecosistemas y agroecosistemas

La economía mundial depende de los bienes y servicios derivados de cada uno de los ecosistemas y para poder obtener un aprovechamiento

óptimo de los bienes y servicios de la naturaleza es necesario comprender, en sus detalles, el funcionamiento del ecosistema y hacer una descripción adecuada de este entorno (5). La descripción y caracterización de los ecosistemas son la base fundamental para un aprovechamiento equilibrado de todos los recursos que se encuentran en ellos y asimismo la comprensión del funcionamiento de estas unidades permite que se lleve a cabo un manejo armónico y duradero de los recursos bióticos que sostienen la reproducción de cada uno de los ecosistemas. El estudio de los ecosistemas en general está íntimamente ligado a una serie de dimensiones que van más allá de lo estrictamente biológico, y que se convierten en factores determinantes de los cambios que se dan en ellos. Las sociedades y los factores económicos son las dimensiones que determinan el impacto sobre la naturaleza, porque es la humanidad y la forma de apropiarse de los ecosistemas, en un estadío económico determinado, lo que está definiendo cómo, qué y para qué se transforman los ecosistemas. Es inevitable referirse a dimensiones económicas, sociales e incluso políticas cuando se analiza la situación de los ecosistemas, en particular de los agroecosistemas, por lo que necesariamente se tendrá que incluir en el diagnóstico el análisis de dimensiones socioeconómicas con el objetivo de articularlas con la dimensión ecológica y biológica de los ecosistemas. Para definir el papel de la biotecnología en el manejo y caracterización de los recursos naturales de los agroecosistemas en México, es indispensable considerar el impacto de los factores económicos y sociales en el manejo y sustentabilidad productiva de los mismos, porque la propuesta fundamental de la biotecnología agroecológica se dirige a la solución de problemas específicos del manejo de agroecosistemas desde una perspectiva sustentable. La biotecnología agroecológica debe desarrollar una comprensión holística y concertada de todas las escalas biológicas, para generar propuestas de tecnología apropiada y pertinente a las condiciones ecológicas, sociales y económicas de las diferentes regiones agrícolas, en su relación con el resto de los ecosistemas, en nuestro país.

Una premisa fundamental de la biotecnología agroecológica es que considera que los ecosistemas poseen dinámicas y procesos naturales independientes de la humanidad y que ésta, al interactuar con la naturaleza para la obtención de recursos, necesita una comprensión precisa de tales procesos que permita el desarrollo del potencial propio y la renovación de esos sistemas naturales fundamentales (20). A pesar de la complejidad de interacciones que se llevan a cabo en las diferentes unidades ecológicas del paisaje biogeográfico de nuestro país, es indu-

dable que son el punto de partida indispensable para la caracterización de los recursos y su posterior utilización. El ecosistema se ha definido como la unidad a la que puede reducirse el paisaje natural, en la que se identifica una estructura y una función, y en donde los organismos, los flujos de energía y los ciclos biogeoquímicos se encuentran en un equilibrio inestable (20). De manera específica, se han clasificado los ecosistemas terrestres siguientes: a) bosques tropicales de hoja ancha; b) bosques de coníferas con bosques templados de hoja ancha; c) pastizales/sabanas/matorrales; y d) manglares. En México tal y como se ha señalado en el capítulo anterior, se han definido e identificado estos cinco tipos de ecosistemas terrestres, nueve de los once tipos de habitats en los cuales se encuentran 51 de las 191 ecorregiones reconocidas mediante una clasificación específica. En esta clasificación el criterio principal para su identificación corresponde al tipo de vegetación dominante y en segundo lugar al clima predominante en determinada región (15).

En el mundo, los ecosistemas se clasifican en cinco categorías principales: a) agroecosistemas; b) ecosistemas costeros; c) ecosistemas forestales; d) ecosistemas de agua dulce; y e) ecosistemas de pastizal (5). Los agroecosistemas son aquellos que contienen recursos biológicos y naturales manejados por los humanos para producir alimentos, así como otros productos no alimentarios y servicios ambientales socialmente valiosos. Una clasificación más general de los sistemas de producción en los agroecosistemas establece que se pueden diferenciar al menos dos grandes grupos (5). Uno de ellos sería el que se asocia con sistemas de baja utilización de insumos externos y poco comercializados, en el que destaca principalmente la base comunitaria de pequeñas parcelas y gran fragmentación, policultivo con variedades y razas locales de cultivos, mezcla de cultivos en diferentes estratos de la cubierta vegetal, en el que interactúa una amplia base de especies y diversidad genética basada en el conocimiento indígena tradicional. Por el contrario, el segundo es el que tiene atributos asociados con la utilización de una gran cantidad de insumos externos, alta comercialización, grandes extensiones de terreno consolidado, uso intensivo de capital en sistemas de monocultivo con variedades diseñadas y seleccionadas con el objetivo de obtener alto rendimiento además de una alta especialización con cultivos sincronizados, de diversidad genética muy limitada. Este tipo de sistema de producción se fundamenta en un extensivo componente tecnológico. Entre estos dos extremos se encuentra una amplia gama de sistemas de producción que incorporan características de ambos grupos. Se han establecido

algunos criterios especiales, desde el punto de vista agroecológico, para clasificar los agroecosistemas, que se relacionan con la manera como se establece la asociación entre cultivo y ganadería, los métodos usados para su cultivo y cría, además de la intensidad en el uso de trabajo, capital y organización, así como el producto final resultante (23). En particular, en los trópicos se reconocen los siguientes sistemas: a) de cultivo alternado, b) de cultivo semiperenne de temporal; c) de cultivo permanente de temporal; d) arables con irrigación; e) de cultivo perenne; f) de pastoreo; g) regulados que alternan cultivos arables y pastizal (23).

Los factores determinantes en la evaluación de los ecosistemas, en particular los agroecosistemas, son aquellos que en general impactan el desarrollo, funcionamiento e interacción entre los ecosistemas globales. Las problemáticas específicas en cuanto a estos factores se resumen de acuerdo con el estudio del World Resources Institute (5). Actualmente, el abastecimiento de alimentos es 24% per cápita más alto que en 1961, y los precios reales son 40% más bajos (5). Sin embargo, la producción a largo plazo está amenazada por la creciente escasez de agua y la degradación del suelo. Por ejemplo, la estrategia más representativa en cuanto a la intensificación de la agricultura, la Revolución Verde, contribuyó a la salinización del suelo, además del agotamiento de los mantos freáticos y la contaminación del agua superficial por el uso excesivo de la irrigación como un componente principal del incremento en los rendimientos en la agricultura. En algunas regiones, se prevé que la escasez de agua producirá una fuerte competencia por este recurso entre los sectores agrícola, urbano y comercial. Por lo que corresponde a la calidad del agua, un problema serio alrededor del mundo es la eutroficación producida por el escurrimiento de nutrientes a las regiones costeras. Por otro lado, el incremento en la producción de alimento por el cambio en el uso del suelo, ha reducido la capacidad neta de los ecosistemas para acumular y almacenar el carbón. Sabanas y bosques, ricos en carbón, de las zonas templadas han sido convertidos en tierra arable y pastizal forrajero que acumula mucho menos carbón por unidad de área de suelo. En los trópicos, la destrucción de bosques es mucho más grave. Asimismo, el uso cada vez más amplio de pesticidas en los cultivos ha generado el surgimiento de plagas y patógenos resistentes a los plaguicidas sintéticos. Aproximadamente 70% del agua se usa en sistemas de irrigación en los que no se aprovecha ni el 50% en promedio, para los cultivos.

Se ha determinado que de la diversidad orgánica se obtienen los materiales genéticos para el mejoramiento agrícola y pecuario, compuestos químicos para medicinas, y materia prima para la industria. La disminu-

ción de biodiversidad en los agroecosistemas es motivo de fuerte preocupación debido a que el mantenimiento de bienes y servicios en tales sistemas depende de la multiplicidad orgánica estructurada en redes interactivas que soportan el funcionamiento y la reproducción de los factores esenciales para la producción, como son el suelo y el agua. La disminución de la biodiversidad se debe, principalmente, a los siguientes factores: a) destrucción del hábitat en bosques, sabanas, humedales y manglares y su consecuente utilización para otras actividades; b) expansión de suelo arable y pastizales forrajeros para la agricultura, a costa de bosques naturales, y la intensificación agrícola que ha desplazado a las variedades tradicionales con variedades genéticamente uniformes de alto rendimiento, pero con gran demanda de insumos; c) incremento de especies invasoras, entre otros factores, por la disponibilidad de nutrientes en los suelos arables. Esto es, debido a la presión ejercida por el crecimiento poblacional y la demanda de alimentos conjuntamente con la desigual distribución de la riqueza que privilegia la máxima ganancia por encima de la satisfacción de las necesidades sociales en las formas de producción agropecuarias y de explotación forestal, se han generado procesos de degradación de los agroecosistemas que se acercan a límites muy peligrosos de insuficiencia productiva y baja sustentabilidad en el mediano plazo. Se ha advertido que las prácticas de manejo agropecuario y forestal que se utilizan en la mayoría de los países del mundo, particularmente en aquellos que tienen un grado de desarrollo más avanzado, pueden afectar de manera irreversible los agroecosistemas (24).

A nivel mundial se pueden reconocer los impactos negativos, sobre cada uno de los factores mencionados anteriormente, que se tienen en todos los ecosistemas y los efectos graves que se presentan sobre todos los organismos integrados en éstos, particularmente porque constituyen el fundamento y sostenimiento de la vida en este planeta. En particular, la situación de los agroecosistemas es muy grave por la degradación que han sufrido y la falta de atención para sostener las bases materiales de la reproducción sostenible y mantenimiento de estos ecosistemas. En la siguiente sección se revisará la situación de algunos factores, mencionados anteriormente, en los agroecosistemas de México.

Situación de los agroecosistemas en México

Un ejemplo de lo que la civilización del Valle de México pudo lograr por medio del conocimiento y uso respetuoso de la naturaleza y los eco-

sistemas, se describe en el estudio histórico-urbanístico de González de León (25) sobre la cuenca lacustre de Tenochtitlan, el cual se refiere a la creación de todo un sistema urbano "…genuinamente lacustre que les permitió (a los pueblos asentados en este ecosistema) el manejo de los lagos para recolectar y producir alimentos, para transportar personas y bienes, y para defenderse. Pero sobre todo crearon un orden urbano y arquitectónico en armonía con el medio ambiente". Esto permite establecer una comparación con las condiciones actuales de la zona metropolitana de la ciudad, después de siglos de cambios radicales en el ecosistema del Valle de México (figura XI.1). Éste es un ejemplo cercano de lo que ha pasado inevitablemente, a escala mundial, en cuanto al deterioro y degradación de los ecosistemas.

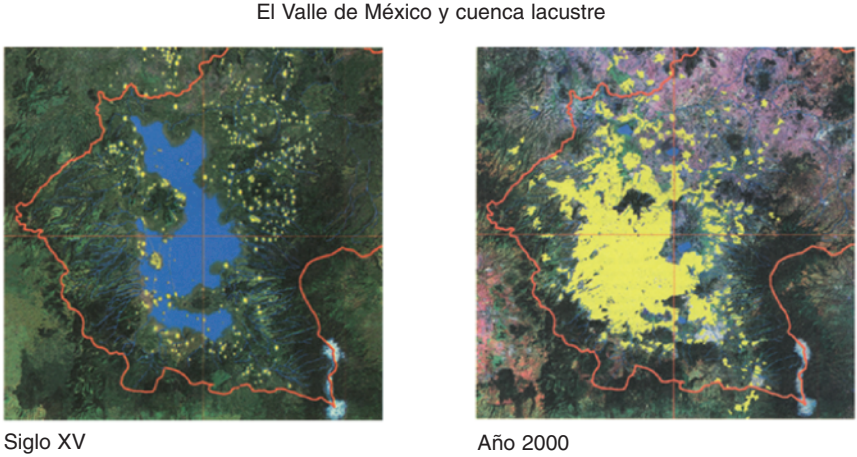


Figura XI.1

CAMBIOS EN EL SISTEMA LACUSTRE DEL VALLE DE MÉXICO, DESDE LA LLEGADA DE LOS ESPAÑOLES HASTA NUESTROS DÍAS

El área del lago del Valle de México (en color azul) y los asentamientos humanos (en color amarillo) desde el siglo XV hasta el año 2000. Figuras tomadas de González de León (25).

El ecosistema lacustre de la cuenca alta del Valle de México es un caso de extinción producido por un crecimiento caótico de los asentamientos humanos que fueron consumiendo los recursos naturales de los lagos hasta transformarlo en la zona metropolitana de la ciudad de México en el D. F. (figura XI.1). Con la extinción de este ecosistema, el agroecosistema asociado a éste desapareció casi por completo. Aunque no evidente, aún existen aproximadamente 12 000 hectáreas (Ha) de superficie

agrícola, principalmente en las delegaciones, Milpa Alta, Tláhuac y Xochimilco. En estas dos últimas se encuentran los restos del sistema chinampero mexica. El caso de la zona metropolitana de la Ciudad de México es un ejemplo extremo de la degradación de un ecosistema, pero nos sirve también de punto de partida para desarrollar un análisis comparativo de la situación de los agroecosistemas en México, que tendría como objetivo señalar las regiones, ecosistemas y agroecosistemas que a nivel nacional estarían sufriendo un deterioro acelerado y en donde se tendrían que estructurar propuestas tecnológicas para su restauración. En este sentido se presenta un diagnóstico a partir del análisis de un breve periodo histórico reciente, de 1965 a 2001, para estimar las condiciones que se enfrentarán en el futuro próximo.

A partir de los años sesenta comienza un cambio radical en la economía de México que se refleja, paulatinamente, en la estructura poblacional de sus diferentes regiones geográficas. En 1965 la población rural era de aproximadamente 20 millones de habitantes, la cual se ha mantenido más o menos constante, y en la actualidad esta población alcanza aproximadamente 25 millones de personas. En contraste, la población urbana se incrementa, desde 1965 hasta 2001, de 24 millones a más de 75 millones de habitantes (figura XI.2). Con el cambio en la estructura y dinámica de la población se producen impactos en el uso del suelo que inciden en los agroecosistemas en México, en primera instancia con los cambios en la utilización de recursos se incrementa la desaparición de hábitat para el mantenimiento de la biodiversidad en sus tres niveles, y de manera particular, la migración de la población rural a los centros urbanos, que resulta en el abandono de las actividades agropecuarias con la consecuente presión sobre las ciudades para implementar servicios e infraestructura. A pesar de la disminución de la población rural dedicada a las actividades agropecuarias en México es significativo que aún hoy, el porcentaje de agricultura tradicional y campesina en varias regiones del país se conserve (figura XI.2). Sin embargo, comienzan a presentarse síntomas de una pérdida acelerada de este tipo de agricultura.

Otro aspecto preocupante de la situación de los ecosistemas en México, en particular asociada a los agroecosistemas, es el desbalance en la utilización en el uso del suelo ya que la superficie agrícola, arable y de pastizal perenne con vegetación secundaria se ha incrementado significativamente, en contraste con la reducción significativa de superficie arbolada y forestal en nuestro territorio (figura XI.3). De 1965 a 2000 la superficie agrícola creció de 98 millones a más de 107.3 millones de Ha, de los cuales se incrementó la superficie ocupada por pastizales perma-

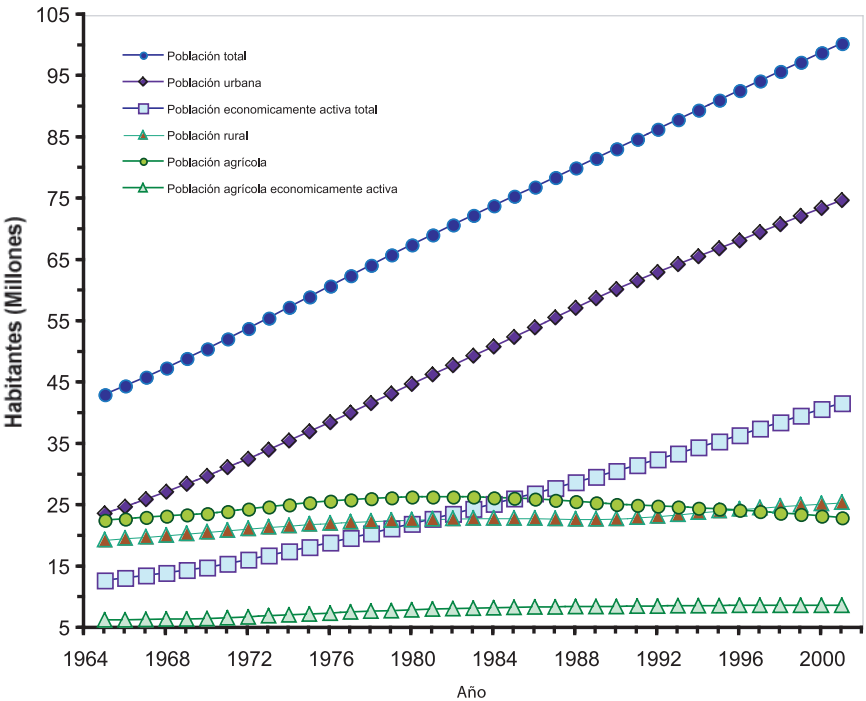


Figura XI.2
CRECIMIENTO DE LA POBLACIÓN EN MÉXICO EN EL PERÍODO DE 1965 A 2001
Gráficas elaboradas a partir de información publicada por FAO [FAOSTAT, (21)].

nentes de 74.5 a 80 millones de Ha y el conjunto de la superficie arable con los cultivos permanentes se extendió de 23.5 a 27.3 millones de Ha en ese mismo periodo. Por el contrario, el área forestal y boscosa pasó de 56.5 en el año 1965 a 48.7 millones de Ha en 1994, con un periodo de recuperación a partir de 1984 ya que el área forestal llegó a su punto más bajo en 1983 con una superficie de 46.2 millones de Ha (figura XI.3). Estas cifras representan un panorama general de la tendencia en el uso del suelo en México, en el que se puede observar una alta prioridad por el incremento en su utilización en términos de área, para la superficie agrícola, principalmente para actividades pecuarias, y un deterioro marcado del área boscosa y forestal de nuestro país. Al analizar esa tendencia, por medio de regresión lineal simple, se tiene que anualmente se incorporan aproximadamente 321 338 Ha a la superficie agrícola, mientras que 295 730 Ha se pierden del área forestal y arbolada de nuestro país (tabla XI.1).

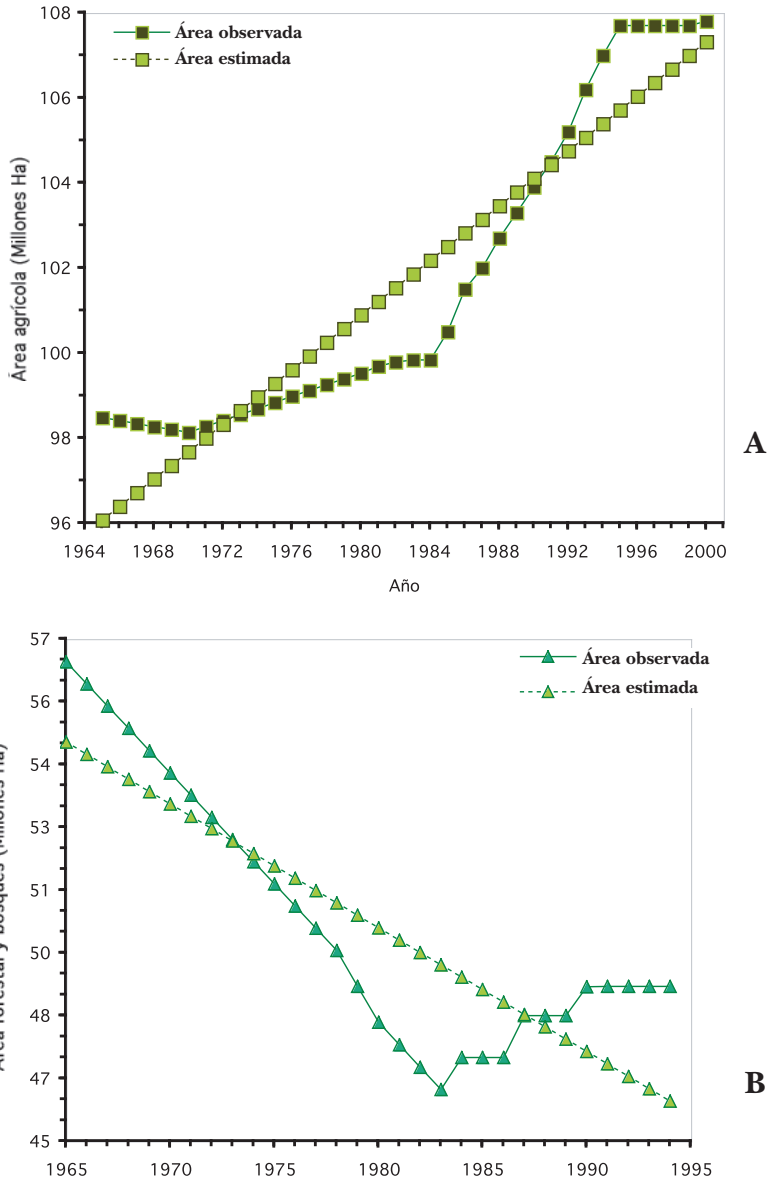


Figura XI.3
COMPARACIÓN DEL ÁREA TERRESTRE OCUPADA PARA: A) ACTIVIDADES AGROPECUARIAS Y, B) POR BOSQUES Y ARBOLADO EN MÉXICO: 1965-2000
Gráficas elaboradas por el autor a partir de la información en la base de datos publicada por FAO [FAOSTAT, (21)].

Tabla XI.1
SUPERFICIE OCUPADA PARA DIFERENTES USOS
DEL SUELO EN MÉXICO EN EL PERIODO 1965 A 2001

Tipo de uso del suelo	*Promedio de la superficie (1000Ha)*	*Desviación estándar*	*Tasa de incremento/ decremento (1000Ha/año)*	*Correlación entre observado y estimado*
Superficie agrícola	101 199.028	3 621.346	321.338	0.93
Forraje perenne	76 166.111	2 219.181	185.755	0.88
Bosques y arbolado	50 247.167	3 074.767	-295.730	0.85
Otros tipos de suelo	40 626.333	2 775.106	29.548	0.09
Cultivos arables y perennes	25 032.917	1 458.309	135.582	0.98
Suelo arable	23 280.278	1 143.156	105.682	0.97
Cultivos perennes	1 752.639	333.958	29.900	0.94

Cálculos elaborados por el autor con base en los datos publicados por FAO (FAOSTAT, (21). La tasa de incremento/decremento y el coeficiente de correlación se obtienen a partir de un análisis de regresión de una función lineal simple

El impacto de estos cambios en el uso del suelo comienzan a ser dramáticamente evidentes a nivel de ecosistemas completos. Un estudio diagnóstico del ecosistema de las selvas húmedas de México, documenta puntualmente la grave reducción en cuanto a superficie en la selva de la Huasteca, Los Tuxtlas (figura XI.4) y la selva lacandona, con tasas de deforestación del orden de 7-10%, 4.2% y entre <1 y 2.2% cada año, respectivamente (26). Lo más grave de esta situación es el indicio de que existe un grave desmonte en dichas selvas, en perjuicio de la diversidad biológica en particular florística, con el fin de utilizarse en ganadería extensiva (27). Una situación igualmente grave a la descrita en el caso de la selva húmeda se presenta para el ecosistema de la selva seca de México, la cual es una de las más diversas y con el mayor porcentaje de endemismos en el mundo. En este sentido, se ha estimado que la región del Bajío que originalmente estaba cubierta con selva seca (2 millones de Ha), en la actualidad sólo conserva 5% de esa cobertura florística (26). Se puede constatar que la región del Bajío, conocida como el "granero de México" en la década de los años sesenta y setenta en el siglo pasado, es otro ejemplo de degradación de un ecosistema. En años recientes se empiezan a presentar síntomas del impacto negativo de la degradación de la diversidad en los ecosistemas del Bajío porque el funcionamiento de las acti-

vidades agropecuarias de esa región se han deteriorado significativamente por la falta de agua, la erosión del suelo y recursos naturales, como consecuencia de la falta de atención a la conservación de su biodiversidad.

Área de Los Tuxtlas a través del tiempo

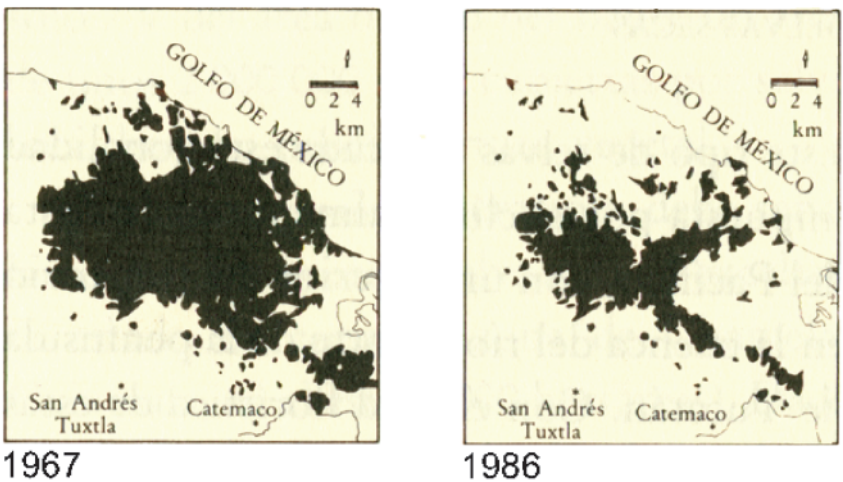
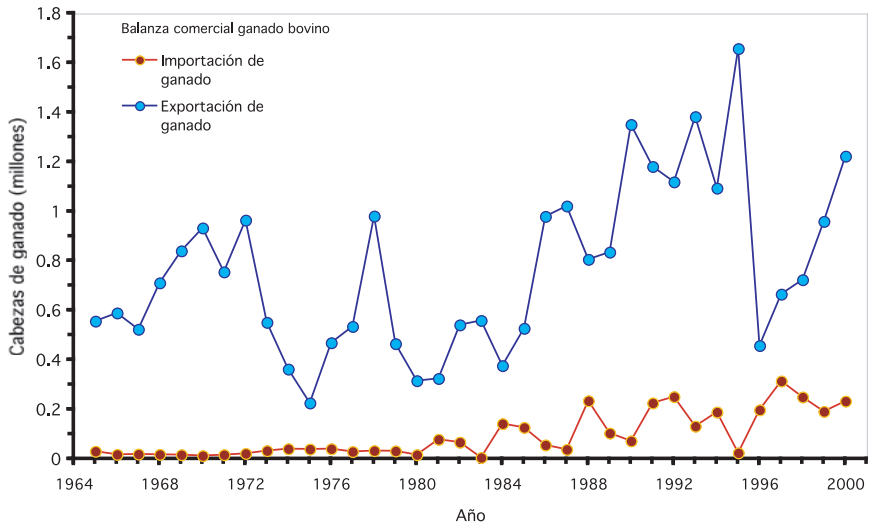


Figura XI.4
REDUCCIÓN DEL ÁREA OCUPADA POR LA SELVA HÚMEDA DE LOS TUXTLAS, VERACRUZ, DE 1967 A 1986
Fuente: Dirzo, (26).

En cuanto al incremento en la superficie agrícola, el mayor porcentaje corresponde al pastizal perenne que incorpora a su superficie 185 755 Ha por año, mientras que 135 582 Ha de tierra arable y cultivos permanentes son agregadas a la actividad agrícola cada año. Un aspecto sobresaliente es que el aumento en la superficie de pastizal no corresponde a pastizales naturales sino a potreros dedicados a la alimentación de ganado (20). En este rubro, la producción ganadera de bovinos nacional parece tener como destino el mercado de exportación y no es claro qué cantidad se utiliza para el mercado interno, al menos por la tendencia que se observa en el comercio de ganado bovino según las cifras de la FAO (figura XI.5). Por el contrario, a diferencia de la exportación de ganado en pie, la cantidad de carne de bovino que se importa a México ha crecido exponencialmente a partir de 1989.



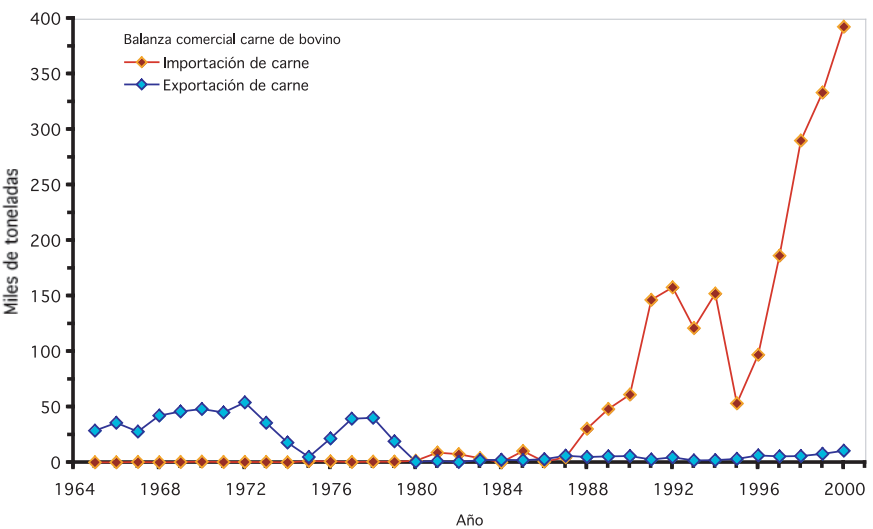


Figura XI.5
TENDENCIAS EN LA IMPORTACIÓN Y EXPORTACIÓN DE BOVINOS EN PIE Y CARNE: 1965-2000
Gráficas elaboradas con datos publicados por FAO [FAOSTAT, (21)].

La actividad ganadera y la expansión de actividades pecuarias que utilizan los agroecosistemas de pastizal o forraje perenne para la producción de ganado en pie destinado a la exportación, tienen un alto costo ambiental para los ecosistemas de México sin que se puedan identificar los beneficios económicos derivados de esta actividad. Además, no parece existir un beneficio en términos de abastecimiento de productos derivados del ganado bovino porque como se observa en la figura XI.5, la importación de carne ha crecido enormemente desde hace más de 10 años. El análisis de estos datos (figura XI.5) indican que la producción ganadera en México utiliza de manera extensiva los recursos de los agroecosistemas de pastizal y forraje perenne de nuestro país, junto con un complemento en forma de alimentos balanceados lo cual representa un alto costo económico porque se utiliza un alto porcentaje de los cereales de importación, para una producción que se destina a la exportación. El beneficio público derivado de este altísimo costo ambiental y económico de los recursos naturales de México utilizados en la producción ganadera de exportación es prácticamente inexistente ya que sigue incrementándose la tendencia de importación de carne, con un alto valor agregado.

Con relación a la capacidad de producción primaria que se observa en muchas de las actividades del sector agropecuario, se analizan a continuación los datos de algunos productos importantes en México. Según las estadísticas de FAO, la producción y el rendimiento de los cereales ha crecido moderadamente desde 1965 hasta 2001 (tabla XI.2). Dicho crecimiento no significa un acoplamiento con las necesidades y demandas de la población en términos de autosuficiencia alimentaria y utilización para el resto de las actividades agropecuarias, ya que el nivel de importaciones de los cereales principales, así como de frijol, sigue siendo significativamente alto (figura XI.6). Llama la atención que aunque en el cultivo del maíz, sostén de la actividad agropecuaria en términos de jornales totales, se han incrementado los rendimientos de 1.2 a 2.7 toneladas (ton)/Ha por año desde 1965 hasta 2001, lo que ha permitido que la superficie dedicada a este cereal no se incremente aún más, la importación de maíz continúa con una tendencia a la alza desde hace una década. Por otra parte, se observa que los cereales ocupan la mayor superficie de suelo arable con 9 927 250 Ha (tabla XI.2) y cada año se incorporan a la producción un promedio de 32 929 Ha y se incrementa la producción de cereales con 498 553 ton. El maíz ocupa el mayor porcentaje del área dedicada a los cereales (72.73%); sin embargo, existe una muy ligera tendencia negativa en el uso del suelo arable con este cultivo por lo que

Tabla
ESTADÍSTICAS DE LOS PRINCIPALES CULTIVOS ANUALES, PERENNES Y
Los cálculos se elaboraron con base en los datos pu

Cultivo	*Promedio área (Ha)*	*Desviación estándar del área*	*Tasa de área (Ha/año)*	*Correlación observados/ estimados (Ar)*	*Promedio de producción (t)*
Cereales	9 927 250	714 994	32 929	0.50	21 102 504
Maíz	7 220 076	613 992	-323	0.01	12 561 859
Frijol	1 767 788	266 592	-152	0.01	1 007 129
Sorgo	1 397 912	447 244	32 731	0.79	4 346 169
Trigo	845 154	154 121	2 779	0.20	3 212 444
Caña de Azúcar	545 866	54 556	4 266	0.85	38 091 013
Café	531 244	152 307	13 358	0.95	275 334
Citricos	279 199	97 918	8 240	0.91	3 231 768
Cebada	258 309	42 398	565	0.14	441 492
Soya	234 545	137 110	547	0.04	427 831
Naranja	191 078	65 342	5 117	0.85	2 257 937
Arroz	134 103	42 152	-2 593	0.67	450 486
Tomate	81 680	15 712	1 023	0.70	1 590 131
Mango	78 942	49 413	4 530	0.99	820 906
Platano	73 988	5 846	60	0.11	1 563 337
Chiles y Pimientos	70 661	34 393	2 657	0.84	673 019
Limón y lima	66 601	27 635	2 457	0.96	705 192
Centeno	65 369	24 299	-41	0.02	82 257
Papa	62 508	12 155	723	0.64	926 574
Aguacate	56 722	27 471	2 489	0.98	502 169
Manzanas	44 235	17 630	1 517	0.93	346 201
Uva	38 384	15 379	866	0.61	389 940
Cebolla	29 669	9 850	812	0.89	501 224
Durazno y nectarina	27 688	10 904	903	0.90	154 068
Melones	26 159	8 702	605	0.75	349 593
Papaya	12 954	5 416	401	0.80	354 223
Elotes	10 665	9 668	816	0.91	106 126
Piña	9 566	2 279	-32	0.15	374 143
Ejote	8 123	1 707	-1	0.01	36 345
Coliflor	7 936	7 591	631	0.90	92 789
Ajo	6 933	1 066	44	0.44	45 361
Espárrago	6 517	3 890	310	0.86	26 838
Zanahoria	6 178	4 299	372	0.94	153 703
Fresa	5 925	1 410	-31	0.23	96 777
Pera	4 713	957	45	0.51	37 953
Lechuga	4 529	3 195	287	0.97	85 770
Calabazas	3 988	2 008	173	0.93	117 155

I.2

SEMIPERMANENTES EN LOS AGROECOSISTEMAS DE MÉXICO: 1965 - 2001.

blicados por FAO (Fuente: FAOSTAT database, (21).

Desviación estándar de la producción	*Tasa de producción (t/año)*	*Correlación observados/ estimados (Pr)*	*Promedio de rendimiento (Hg/Ha)*	*Desviación estándar del rendimiento*	*Tasa de rendimiento [(Hg/Ha)]/año*	*Correlación observados/ estimados (Rr)*
5 662 606	498 553	0.95	21 107	4 829	430	0.96
3 809 651	317 409	0.90	17 364	4 808	425	0.96
207 996	7 774	0.40	5 695	744	39	0.57
1 619 661	117 204	0.78	30 412	3 542	183	0.56
910 037	53 935	0.64	37 716	6 873	562	0.89
6 074 135	502 006	0.89	694 527	49 852	3 642	0.79
75 086	5 611	0.81	5 252	676	-22	0.36
1 283 015	109 024	0.92	114 903	11 890	377	0.34
147 835	9 786	0.72	17 005	4 672	362	0.84
263 867	1 048	0.04	17 898	2 161	-69	0.35
820 537	66 506	0.88	118 558	15 200	211	0.15
114 661	-1 358	0.13	35 173	7 471	642	0.93
573 957	49 696	0.94	189 984	51 144	4 207	0.89
448 848	39 918	0.96	122 728	47 599	-3 012	0.68
457 716	36 007	0.85	210 532	57 623	4 764	0.89
490 359	39 426	0.87	87 045	25 262	2 061	0.88
363 637	31 011	0.92	102 263	11 673	750	0.70
41 833	1 813	0.47	12 531	4 429	334	0.82
356 570	31 680	0.96	144 558	42 595	3 705	0.94
249 022	22 512	0.98	91 590	15 320	-526	0.37
148 424	11 546	0.84	81 141	17 760	-531	0.32
171 254	11 467	0.72	98 613	15 561	1 109	0.77
280 060	24 661	0.95	131 925	20 857	4 140	0.96
44 810	-406	0.10	67 954	33 637	-2 916	0.94
134 251	11 048	0.89	156 525	46 842	1 240	0.64
197 882	14 360	0.79	260 060	48 933	2 939	0.65
96 051	8 073	0.91	59 137	49 709	3 877	0.84
113 146	3 257	0.31	392 100	74 721	4 495	0.65
15 735	1 327	0.91	45 641	19 324	1 639	0.92
89 944	7 521	0.91	112 919	11 201	580	0.56
14 670	1 114	0.82	64 601	15 844	1 239	0.85
14 507	1 070	0.80	42 508	7 200	-176	0.26
96 990	8 171	0.91	272 994	63 733	-4 279	0.73
26 606	131	0.05	163 579	26 102	1 026	0.43
8 335	-127	0.17	81 970	17 431	-1 235	0.77
66 525	5 948	0.97	172 297	28 193	2 386	0.92
79 638	6 874	0.93	261 798	71 688	6 073	0.92

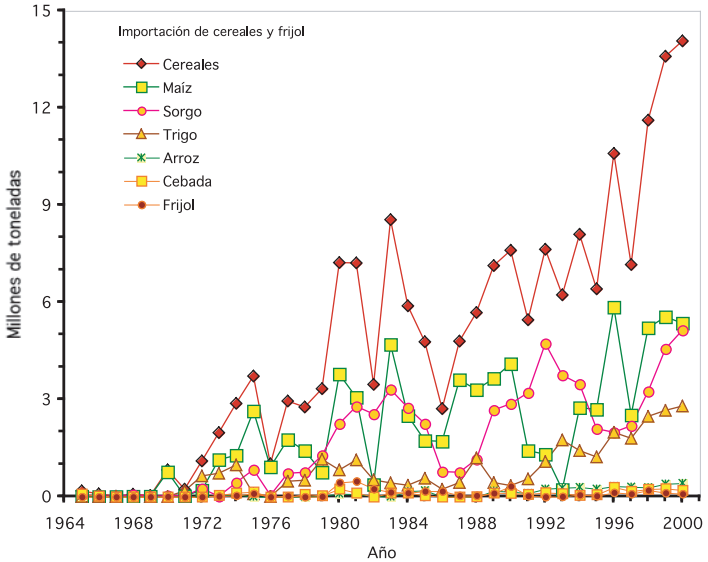
cada año, 323 Ha no se usarían para el cultivo del maíz. Esta misma tendencia se observa en la producción de frijol ya que 152 Ha de suelo se restan a este cultivo anualmente. En comparación, se observa que cereales como el sorgo, trigo, cebada y una leguminosa, la soya, han incrementado paulatinamente su superficie de suelo arable con 32 731, 2 779, 565 y 547 Ha por año, respectivamente. Desde 1965 a 2001, por otra parte, el cultivo del arroz ha perdido en promedio 2 593 Ha de superficie arable, aunque en compensación su tasa de incremento en rendimiento ha sido de las más altas entre los cultivos anuales (64.2 Kg/Ha), lo cual no ha servido para recuperar un nivel de producción ascendente ya que se ha perdido un promedio de 1 358 ton al año.

Esta aparente paradoja en el caso del arroz, por su dinámica en el incremento de rendimiento que haría pensar que no existen problemas técnicos en su producción, se puede explicar desde la perspectiva económica del impacto de la apertura comercial, como parece ser el factor determinante en la situación de muchas actividades agropecuarias en nuestro país. Según Schwentesius y Gómez (28), el sector agropecuario de los Estados Unidos ha sido el gran beneficiario de la liberalización comercial a partir del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN), en particular en el caso del arroz por el aumento en su participación "espectacular e inesperada" en el mercado mexicano. Las causas de esta fuerte dependencia de la producción arrocera de los Estados Unidos para el abasto nacional, radican en cuatro factores principales (28): a) reducción de la superficie para la producción del cultivo; b) quiebra de la industria arrocera; c) importaciones ascendentes y pérdida de autosuficiencia alimentaria; d) desarticulación de la cadena productiva. Asimismo, estos cuatro factores son el resultado de factores adicionales como: los cambios en la política macroeconómica, sustitución de la producción nacional por la internacional, así como por la aplicación de muy altos subsidios a la producción de arroz en los Estados Unidos (28). Se debe insistir que en muchos casos es necesario acudir al análisis de otros factores y dimensiones, fuera de los meramente tecnológicos, para explicar situaciones paradójicas que inciden en la sustentabilidad de los agroecosistemas y en el comportamiento irregular de la producción de los cultivos, que muchas veces no es el resultado sólo de condiciones climatológicas adversas o de falta de tecnología apropiada. Tal es el caso de la productividad nacional de trigo, en la que se observa el nivel más alto de rendimiento entre los cereales (tabla XI.2), pero que no se refleja en la economía porque sigue aumentando la relación

importación/consumo de trigo en perjuicio de la producción interna (29) (figura XI.6). Una vez más, factores de política económica semejantes a los que han afectado la producción de arroz inciden sobre la producción de trigo en México.

Para los cultivos hortícolas, la caña de azúcar, frutales y cultivos permanentes se destinan áreas muy por debajo de las 7.2 millones de Ha que se utilizan para la producción de maíz. Las superficies dedicadas al frijol (1.8 millones de Ha), el sorgo (1.4 millones de Ha), el trigo (0.9 millones de Ha), la caña de azúcar (0.6 millones de Ha) y el café (0.5 millones de Ha), son las que siguen en orden de magnitud en cuanto a superficie cosechada, con el resto de algunos cultivos representativos produciéndose en superficies mucho menores (tabla XI.2). Entre estos cultivos se debe resaltar el caso de la caña de azúcar que ha incrementado su producción en un promedio de 502 006 ton por año desde 1965 al 2001, con un promedio de producción, en el mismo periodo, de 38 millones de ton por año. Entre los cultivos perennes destaca la producción de naranja, que alcanza un promedio de 2.3 millones de ton por año, con un incremento anual de producción de 66 506 ton. En sentido opuesto, la tasa de producción promedio anual de pera y durazno ha disminuido 127 y 406 ton, respectivamente, junto con una disminución de la tasa de rendimiento anual de 291.6 y 301.2 Kg/Ha para cada uno de estos cultivos. Asimismo, se debe hacer notar que se ha dado una reducción en la tasa de rendimiento del café con 2.2, soya con 6.9, aguacate con 52.6, manzana con 53.1 y mango con 301.2 Kg/Ha por año, desde 1965 hasta 2001. En el caso particular de la producción de durazno se ha determinado que una conjunción de problemas técnicos y de apertura comercial incidieron para dar como resultado una disminución notable en la producción y en la productividad de este cultivo (30), mientras que en el caso del aguacate es difícil determinar las causas que han producido la reducción de su rendimiento promedio, en particular porque la apertura comercial y el levantamiento de restricciones generales para la entrada de aguacate mexicano a Estados Unidos, pudiesen representar un incentivo para la producción del aguacate en México (31).

Otro aspecto que es necesario analizar, por su impacto en el funcionamiento y regulación de los ecosistemas, es la dinámica en el uso y manejo de pesticidas y fertilizantes de origen químico en la producción agrícola en nuestro país. Una de las características principales de la agricultura convencional es su dependencia de insumos agroquímicos para maximizar la producción y la rentabilidad de los cultivos u otros productos agro-



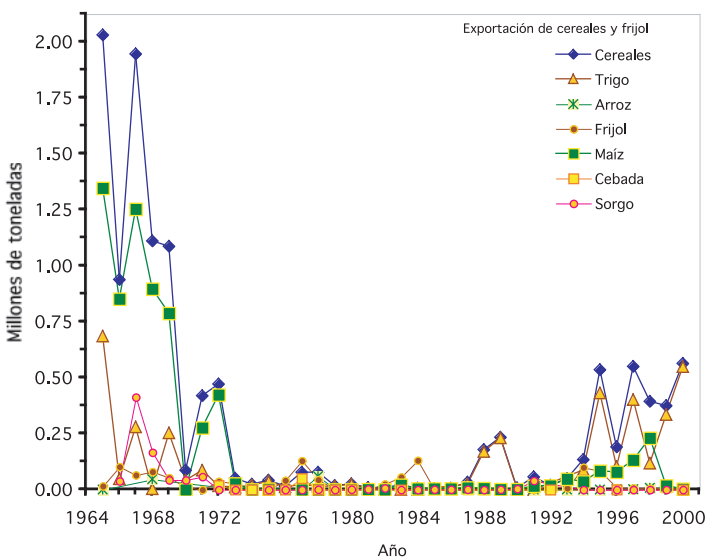


Figura XI.6

BALANZA COMERCIAL DE CEREALES Y FRIJOL: 1965-2000

Fuente: FAOSTAT, (21).

pecuarios y forestales (1). Los Estados Unidos son el líder en la producción agropecuaria a nivel mundial; sin embargo ya comienza a ser evidente que el esquema de producción convencional que ha permitido incrementos sostenidos durante tanto tiempo, tiene repercusiones en otros ecosistemas. En las costas de Louisiana, en la desembocadura del río Mississippi, se detectó desde 1991 un aumento significativo de la eutroficación del mar del Golfo de México. Para 1998, la "zona muerta" en las costas de Louisiana por la eutroficación marina alcanzó una dimensión de 700 millas cuadradas. Esta "zona muerta", producida por el agotamiento del oxígeno utilizado por el crecimiento desmedido de algas, es el resultado del acarreo de siete millones de ton de fertilizantes a través del río Mississippi desde un gran número de regiones agrícolas de los Estados Unidos. En México se observa un crecimiento acelerado en el consumo de fertilizantes, en concordancia con las tendencias en la mayoría de las economías mundiales. En la figura XI.8(a) se ilustra el consumo aparejado con la producción de fertilizantes y el incremento en años recientes de la importación de estos insumos. Comparativamente, el nivel de consumo de fertilizantes está muy lejos de sus socios comerciales del TLCAN; sin embargo, es conveniente empezar a analizar a fondo el por qué y las consecuencias del incremento en la tendencia en el consumo de fertilizante para diseñar estrategias alternativas innovadoras y respetuosas del medio ambiente y la biodiversidad.

En la agricultura convencional el "paradigma de los pesticidas" (32) es otro elemento fundamental. La protección de los productos del campo, por el tipo de prácticas intensivas en la agricultura convencional, se inicia desde el primer paso del proceso de producción, pasando por el almacenamiento hasta el momento de su distribución en el mercado. Se tienen datos muy dispersos del consumo real de pesticidas totales en México; en particular, en la base de datos de FAO (21) no se encuentra registrada la cantidad de pesticidas que se utiliza en el campo mexicano. Sin embargo, se puede inferir la tendencia en la utilización de pesticidas en nuestro país a partir de los datos de comercialización de estos productos como se ilustra en la figura XI.7(b) (21). El nivel de importación de pesticidas a México se mantuvo en un nivel bajo de 1964 a 1984. A partir de 1986 se inicia un crecimiento exponencial en las importaciones de pesticidas totales que inició con un gasto de aproximadamente 13 millones de dólares en ese año, hasta llegar a un gasto de casi 234 millones de dólares en el año 2000. Esta tendencia permite inferir que, al menos en las áreas económicas más fuertes de la producción agrope-

cuaria y forestal, se continúa privilegiando el uso de agroquímicos en contraposición de alternativas más amigables con el ambiente.

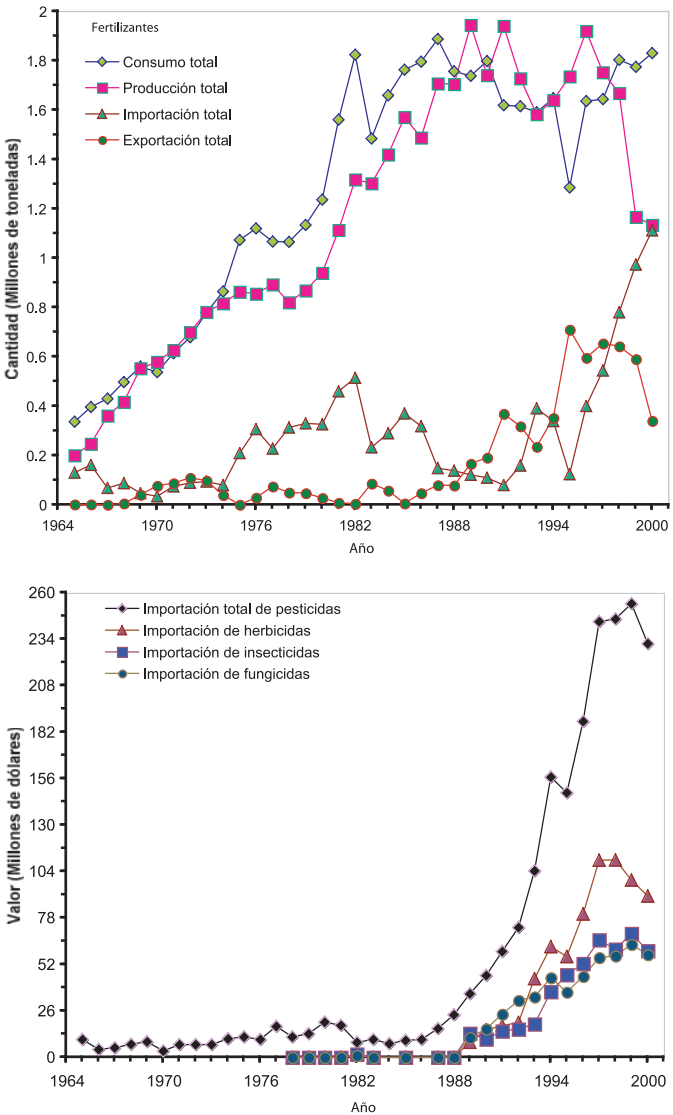


Figura XI.7

A) USO DE FERTILIZANTES EN MÉXICO: 1965–2000.

B) VALOR DE LAS IMPORTACIONES DE PESTICIDAS EN MÉXICO: 1965–2000

Gráficas elaboradas a partir de los datos publicados por FAO [FAOSTAT, (21)].

La dinámica de utilización de los agroecosistemas en México bajo el esquema de una agricultura convencional —que no ha podido satisfacer los requerimientos básicos de la población y los propios del sector agropecuario y forestal, si se toma en cuenta los niveles de importación ascendentes— no ha cambiado sustancialmente y por el contrario, se ha carecido de una política de Estado que pondere los beneficios de alternativas innovadoras para la producción con un buen balance entre ésta y la conservación y aprovechamiento de los recursos bióticos de los ecosistemas. La constante sigue siendo una promoción de la rentabilidad de las actividades agropecuarias que conduzcan a la generación y fortalecimiento de productos de exportación hacia los mercados internacionales, preferencialmente hacia los Estados Unidos y Canadá (33). En general, la visión preponderante en los análisis del sector agropecuario y forestal tiende a minimizar o ignorar los factores que se relacionan con la autosuficiencia, y el mantenimiento de los ecosistemas como fundamento de la obtención de bienes, servicios y formas de vida autosustentables (33).

En conclusión, el horizonte agropecuario está alcanzando su límite y comienzan a notarse síntomas del desgaste de los agroecosistemas nacionales para soportar la producción de alimentos en nuestro país. En muchos casos, al menos en los términos de las estadísticas globales, las crisis en la producción no parecen estar ligadas solamente a problemas tecnológicos sino también a factores económicos y políticos que impactan negativamente las formas de producción y los recursos de los propios agroecosistemas. Por lo anterior, resulta de fundamental importancia comenzar a definir una estrategia de producción que incorpore salvaguardas para el mantenimiento de los recursos naturales, detener el deterioro de los agroecosistemas en particular y restaurar el equilibrio de los ecosistemas en general.

Agricultura sustentable y biotecnología agroecológica

La agricultura sustentable es un sistema integrado de prácticas de producción de plantas y animales con una aplicación local específica cuyos objetivos principales son la satisfacción de las necesidades humanas de alimentos y fibras, sin afectar la calidad del ambiente para evitar destruir la base de los recursos naturales de los que depende la economía agrícola. A largo plazo, el reto para este tipo de agricultura es sostener el equilibrio de la producción agropecuaria, la sustentabilidad de estos procesos

de producción, la conservación de la biodiversidad y la bioseguridad (1). El conocimiento a profundidad de la diversidad de ambientes así como del funcionamiento de los agroecosistemas en nuestro país, son las condicionantes fundamentales para el desarrollo de la agricultura sustentable que minimice el impacto de las actividades humanas que se emplean para la producción de alimentos, bienes y servicios derivados de los recursos naturales y biológicos contenidos en éstos. Un primer paso en este sentido debe darse en cuanto a la construcción de herramientas teóricas, metodológicas y prácticas que auxilien la puesta en marcha de una nueva estrategia de desarrollo sustentable. Como se ha señalado, el estudio de la naturaleza desde la escala de la biología molecular hasta la escala ecológica deberá permitir una visión integral y rica de los múltiples y complejos procesos que se dan en ella, y en este sentido la biotecnología agroecológica sería un espacio muy importante para crear un puente entre estas dos visiones de la naturaleza que conformara el fundamento científico de la agricultura sustentable. La biotecnología agroecológica podría ser uno de los elementos clave para la sustentabilidad, de integrarse a un programa más amplio que comprenda una visión complementaria de los procesos y sistemas ecológicos, con lo que se podrían diseñar propuestas para el desarrollo de tecnologías y prácticas que permitan optimizar el balance de la productividad, detengan la degradación y al mismo tiempo resguarden y restablezcan la biodiversidad en las condiciones particulares de nuestro país (1).

Realizar un recorrido de toda la escala, desde el ámbito biogeográfico de las poblaciones de organismos en interacción con el ambiente, hasta el nivel genómico de los organismos y las funciones celulares que se llevan a cabo dentro de ellos, permite identificar las áreas posibles de estudio de la biotecnología agroecológica. En primer lugar, partiendo de la escala mayor, para caracterizar la extensión del ecosistema y el uso del suelo, es indudable que la teledetección satelital junto con los sistemas de información geográfica, son las herramientas fundamentales en este propósito. En esta megaescala la información derivada de la distribución espacial de los ecosistemas y del uso del suelo y su variación a través de los datos satelitales, permitirían monitorear los patrones y la extensión de los ecosistemas, su estructura física y atributos, y las tasas de cambio en el paisaje. Con esta tecnología se pueden cuantificar cambios en la cubierta del suelo y los patrones de uso del mismo. En México, y en general en la mayoría de los países del mundo, todavía no se cuenta con una buena cantidad de datos útiles para analizar la condición en la que se

encuentran los ecosistemas (5). Aun en los casos en los que se cuenta con datos adecuados, es muy limitada la comprensión científica del cómo los cambios en los sistemas biológicos afectarán la provisión de bienes y servicios. Todavía no se cuenta con los datos y la metodología para cuantificar en qué medida se pierde la capacidad de recuperación del ecosistema como resultado de la pérdida de biodiversidad, o cómo esta pérdida pudiese afectar a la aportación de bienes y servicios. Sin embargo, el resurgimiento de la biología de sistemas y de manera complementaria el desarrollo de la bioinformática y la biología computacional, podrían constituir las herramientas básicas para el análisis jerárquico de los sistemas desde el nivel molecular hasta el de redes en ecosistemas (11), desde la perspectiva de la biotecnología agroecológica.

La capacidad futura, en función de la productividad de largo plazo de los ecosistemas, está influida por procesos biológicos tales como: la formación de suelo, ciclos de nutrientes, el proceso de purificación natural de agua y su reciclaje. Como una parte integral de este esquema, los agroecosistemas y su dinámica evolutiva en estrecha correspondencia con su manejo para la obtención de recursos, están involucrados con los otros ecosistemas en su conjunto por lo que estos procesos inciden directamente en su propio funcionamiento. Se tienen identificados factores de gran importancia en el funcionamiento de los agroecosistemas los cuales será necesario analizar desde una perspectiva global de la agricultura sustentable. La extensión y cambio de uso del suelo en los agroecosistemas, la cantidad y calidad del agua disponible, la producción de alimentos, el almacenamiento de carbono, la biodiversidad, y la contaminación de los ecosistemas, constituyen factores cuyas problemáticas requieren la participación de multidisciplinas entre las que la biotecnología agroecológica podría aportar soluciones a estos problemas concretos. Sin embargo, en este estrato, la biotecnología agroecológica sólo contribuiría al estudio y análisis de estos procesos, en particular de la biodiversidad y en la determinación de cuáles son los mecanismos inherentes en estos sistemas para el mantenimiento de esta diversidad orgánica en el nivel de poblaciones y especies. Las herramientas de la biotecnología se deben utilizar para caracterizar, en particular a nivel molecular, y establecer catálogos de las especies de plantas y animales originarias de México y de manera particular aquellas que actualmente son endémicas en nuestro país. Para el estudio, caracterización, manejo y conservación de la riqueza biológica de los ecosistemas en general, y los agroecosistemas en particular de nuestro país, la biotecnología puede aportar en el

futuro próximo soluciones tecnológicas para abordar cada uno de estos aspectos. Por ejemplo, en este sentido se considera de importancia estratégica la generación de nueva infraestructura básica y complementaria para el mantenimiento y consolidación de la ya existente, de los bancos de germoplasma, de cepas y de genes, que corresponden a la biota singular de nuestro país, además de los esfuerzos que ya se realizan en cuanto a la conservación, *in situ,* de especies de importancia agropecuaria y forestal. Por medio de la biotecnología moderna, se podría acelerar la caracterización de los bancos de germoplasma lo que a su vez permitiría identificar, entre otros aspectos, las fuentes de resistencia de los materiales nativos a regiones ecológicas específicas. La biotecnología debe buscar también formas innovadoras de aprovechamiento del conocimiento convencional, incluyendo el indígena, acerca de los recursos biológicos y nativos que por siglos se han acumulado. En este sentido, la biotecnología podría auxiliar en el aprovechamiento de los bancos de germoplasma de los principales cultivos de México (34).

Asimismo, en el futuro próximo los productos de la biotecnología moderna estarán bajo un escrutinio estrecho para evaluar su impacto y posibles riesgos en el medio ambiente y la salud humana, por lo que se presenta un escenario interesante de interacción entre la tecnología de teledetección, junto con los sistemas de información geográfica, y la biotecnología agroecólogica ya que ésta podría estar aportando muchos de los datos, que a nivel de tierra se necesitan confirmar y cuantificar (*ground truth*) para contrastar con los datos de los sistemas de detección satelital, que aquella tecnología requiere para alimentar sus bases de datos en la generación de sistemas de monitoreo. Tanto para los aspectos de evaluación de posibles riesgos (bioseguridad), como en el nivel del conocimiento básico de los agroecosistemas, la biotecnología agroecológica en este nivel macro estaría aportando datos muy importantes acerca de los mecanismos y el funcionamiento de los agroecosistemas que se podrían incorporar a la miríada de factores que se evalúan en esta escala ecológica. Como ejemplo se prevé que el monitoreo de los cambios en la biota del suelo, a través de marcadores moleculares y huellas genéticas, permitiría implementar acciones efectivas y tempranas ante los procesos de degradación del suelo agrícola y su restauración. Asimismo, y en el futuro próximo, este conjunto de información y conocimiento será de gran relevancia para diferentes aspectos de bioseguridad del país. Los datos de distribución, flujo genético entre especies silvestres y organismos genéticamente modificados (OGMs), dispersión y análisis de impacto de

OGMs deberán ser evaluados desde una perspectiva que se enmarca en el campo de acción de la biotecnología agroecológica.

Como se ha señalado, muchos de los análisis a nivel global recientes han determinado que la producción de alimentos ha ido creciendo con relación proporcional al de la población (5). Lo anterior representa un buen indicador de la capacidad de los agroecosistemas para proveer los satisfactores necesarios para la sociedad. Sin embargo, y como ya se comentara, se observa que la utilización de pesticidas y fertilizantes siguen siendo los factores sobre los que descansa el éxito de esta tendencia ascendente. Se debe resaltar que factores económicos, políticos y sociales, en muchas ocasiones distorsionan y perjudican a la distribución de los productos, servicios y alimentos que se obtienen de los agroecosistemas. En México, como se observa a partir de los datos analizados en el inciso anterior, se tienen tasas de incremento del rendimiento de varios cultivos importantes a través de muchos años. Estas tasas sostenidas de crecimiento, pueden ser indicadores de que la aplicación de tecnologías que permiten aumentar la producción han sido eficientes o bien que el uso de fuertes cantidades de insumos agroquímicos ha sido constante y en aumento. Empero, a pesar de estas tendencias, la importación de muchos productos básicos en la alimentación de los mexicanos, sigue siendo extremadamente alta, lo cual es preocupante por la generación de una fuerte dependencia externa en materia de producción agropecuaria. En este sentido, de particular importancia será el desarrollo y utilización de biotecnologías adecuadas y pertinentes para la solución de problemas de nuestra nación, que consideren la agricultura convencional y el conocimiento de los ecosistemas particulares de México.

La profundización en el conocimiento de los ecosistemas, en especial de los agroecosistemas de nuestro país, es indispensable para poder establecer estrategias básicas de su utilización y mantenimiento. No se podrán desarrollar biotecnologías propias y pertinentes, si no se conocen los mecanismos íntimos del funcionamiento y los organismos que conforman estos ambientes. Uno de los problemas principales en la utilización de la biotecnología es que en diferentes casos no está necesariamente diseñada en concordancia con principios ecológicos adecuados, o bien para condiciones ambientales específicas. Se requieren entonces biotecnologías pertinentes, aplicables a situaciones y ambientes particulares de México que, en muchos casos, deberán adaptarse como apoyo a tecnologías tradicionales probadas. No es adecuada la imposición de esquemas tecno-

lógicos no sustentables que continúen deteriorando la base de los mecanismos de renovación y reproducción de los agroecosistemas. Es por esto que se deberán retomar algunas estrategias de la agroecología que se puedan presentar como opciones, por ejemplo, a la estrategia general del "molino de los pesticidas" que es la tendencia sobresaliente en los sistemas de producción agrícola a nivel mundial. Se ha estimado que, a nivel mundial, el desarrollo de plagas resistentes a pesticidas ha ido en aumento y en la actualidad se tienen aproximadamente mil especies de organismos plaga que son inmunes a plaguicidas químicos (5). Todos los organismos tienen mecanismos de defensa propios que han evolucionado en correspondencia con las situaciones particulares a las que se enfrentan en ambientes específicos (factores abióticos) y a otros organismos (factores bióticos). Una estrategia establecida en diferentes tiempos, lugares y con grados variables de éxito, ha sido la de estudiar, identificar, analizar y manejar estos mecanismos de defensa de los organismos. Se han identificado y utilizado variedades que presentan altos niveles de tolerancia o resistencia a diversos factores bióticos y abióticos, los cuales han servido como material élite para desarrollar variedades con propiedades específicas para condiciones particulares. En este sentido, también se han hecho esfuerzos durante muchos años, para probar, identificar y utilizar el germoplasma que se preserva en bancos de conservación *ex situ,* como fuentes de resistencia a diversos agentes bióticos, que posteriormente se incorporan a programas de mejoramiento. Estas estrategias, en algunos casos se han llevado hasta el nivel de resolución de los factores específicos bioquímicos que permiten a algún organismo la defensa de su integridad orgánica ante el desafío de diferentes agentes físicos y biológicos. Se han reportado muchos ejemplos en diferentes variedades de plantas, como los compuestos fenólicos que se producen en los estigmas del elote de la raza de maíz Zapalote Chico y que le confieren resistencia a la infestación de insectos del complejo *Helicoverpa,* que constituyen una primera línea de defensa ante el ataque de insectos de postcosecha, o los inhibidores de proteinasas en garbanzo que han demostrado un buen nivel de protección a la infestación de un rango amplio de insectos. La biotecnología moderna puede contribuir a la determinación de las bases moleculares de todos estos mecanismos y provocar desarrollar tecnologías congruentes con las defensas propias de los organismos. En este contexto será importante evaluar también, caso por caso, las ventajas y riesgos posibles del uso de organismos genéticamente modificados,

para enfrentar los problemas de las plagas de los cultivares, pero tomando en cuenta en esta evaluación las diferentes alternativas existentes para contender con este problema particular de las plagas.

En la actualidad se empieza a notar un incremento notable en el uso de biofertilizantes, en particular en la agricultura orgánica en la que tradicionalmente se ha utilizado y desarrollado empíricamente este tipo de de mecanismos biológicos de fertilización. En virtud de los beneficios que en términos ecológicos se derivan del uso de los biofertilizantes, es pertinente explorar las alternativas biotecnológicas para manejar los microorganismos integrantes de la rizosfera, a los cuales se les podría incorporar un componente biotecnológico. Por ejemplo, el manejo de la rizosfera es una alternativa que intenta mantener el balance adecuado de uno de los factores más importantes de la agricultura sustentable: el suelo. En este sentido, para mejorar la base biológica de la agricultura sustentable se ha propuesto que se debe incrementar la materia orgánica del suelo junto con agregados estables al agua, el acoplamiento entre el cultivo y el medio ambiente, el incremento de las actividades microbianas en la rizosfera, la selección de especies micorrízicas más benéficas y mejores acoplamientos entre micorrizas vesiculares arborícolas con los cultivos (35). Algunas de las áreas de investigación que los biólogos moleculares pueden explorar para proponer soluciones complementarias al conocimiento tradicional en el manejo de la rizosfera en la agricultura orgánica podrían ser la determinación de los mecanismos de control genético de los exudados radiculares, muy importantes para la comunidad microbiana del suelo ya que estos exudados abastecen el metabolismo microbiano. En general, los compuestos químicos producidos por las raíces de los cultivos son determinantes en las relaciones simbióticas que auxilian en la absorción de nutrientes para la propia planta (35). Sin duda, el aprovechamiento de suelos marginales por medio de cultivos resistentes a las condiciones adversas en ese tipo de ambientes, debería ser uno de los principales objetivos de la biotecnología en México. Así como en el renglón de biofertilizantes y de controles alternativos de plagas y enfermedades de cultivos, se ha avanzado significativamente en la manipulación genética de plantas que pudiesen adaptarse a suelos que por muchos años han sido abandonados para la producción, por su alto grado de toxicidad, debido a la alta concentración de aluminio (36). En la actualidad se ha sugerido que cultivos como el maíz modificado genéticamente, ocupen suelos ácidos y con alto contenido de aluminio gra-

cias a la inserción de genes que le confieren resistencia a esas condiciones tóxicas.

El factor más relevante, y la pieza fundamental para el desarrollo de la agricultura sustentable, probablemente sea la diversidad biológica del país y en especial la que se desarrolla en los agroecosistemas, particularmente en aquellos que se fundamentan en el manejo de policultivos y en dispositivos biológicos de interacción de especies, como en el caso del amortiguamiento del daño de plagas por medio del control biológico. El funcionamiento y mantenimiento de los agroecosistemas depende de la diversidad para su estabilidad a lo largo del tiempo. Los sistemas complejos son más estables y por el contrario, la inestabilidad de los más simples se manifiesta en su incapacidad para recuperarse en condiciones cambiantes. Se ha documentado cómo el monocultivo y la homogeneización de los cultivares es altamente susceptible a la acción de factores bióticos y abióticos adversos, y que son muy demandantes de insumos externos para su función y mantenimiento. La biotecnología deberá también contribuir al estudio detallado de los mecanismos moleculares que permitan un mejor diseño de estrategias de producción agrícola en sistemas de policultivo, o de la reducción en la utilización de insumos en los cultivos convencionales en sistemas intensivos. Un objetivo a largo plazo sería la instrumentación de mecanismos ecológicos con componentes biotecnológicos que permitiesen mayor sustentabilidad a los agroecosistemas aun en condiciones de producción intensiva. Ya se empieza a acumular evidencia que indica que los ecosistemas diversos y su estabilidad tienen muchas bondades para la producción de bienes y su mantenimiento a través del tiempo (37).

Bibliografía

1. Serratos-Hernández J.A., A. Larqué-Saavedra, J.J. Olivares-Villegas, D. Zizumbo. Biotecnología agroecológica para el campo mexicano. En: Biotecnología Agrícola (Módulo 3) F. Bolívar y L. Herrera (coordinadores), pp. 101-114, Fronteras de la Biología en los Inicios del Siglo XXI: retos y oportunidades. El Colegio Nacional, México D.F. (2003).
2. Chasan R. Molecular biology and ecology: A marriage of more than convenience. *Plant Cell* 1143-1145 (1991).
3. Eastmond A., Robert M.L. Biotecnología y agroecología: ¿Paradigmas opuestos o complementarios? *Agrociencia serie Fitociencia* 3(1): 7-22 (1992).

4. Herrera Estrella L., Larqué Saavedra A., Serratos Hernández J.A. La biotecnología en el sector agrícola. En: *"Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: Retos y oportunidades"*. F. Bolívar (coordinador, editor) Conacyt, México, D.F. pp. 147-166 (2001).
5. Wood S., K. Sebastian, S.J. Scherr. Pilot Analysis of Global Ecosystems, Agroecoystems. International Food Policy Research Institute and World Resources Institute, Washington, D.C. USA, (2000).
6. Chapin III, F.S., B.H. Walker, R.J. Hobbs, D.U. Hooper, J.H. Lawton, O.E. Sala, D. Tilman. Biotic control over the functioning of ecosystems. *Science* 277: 500-503, (1997).
7. Dobson *et al.* (1997).
8. Matson, P.A., W.J. Parton, A.G. Power, M.J. Swift. Agricultural intensification and ecosystem properties. *Science* 277: 504-509, (1997).
9. Vitousek, P.M., H.A. Mooney, J. Lubchenco, J.M. Melillo. Human domination of earth's ecosystems. *Science* 277: 494-499, (1997).
10. Rasmussen *et al.* (1998).
11. Kitano H. Computational systems biology. *Nature* 420: 206–210 (2002).
12. Hasty J., D. McMillen, J.J. Collins. Engineered gene circuits. *Nature* 420: 224–230 (2002).
13. Searls D.B. The language of genes. *Nature* 420: 211–217 (2002).
14. Koonin E.V., Y.I. Wolf, G.P. Karev. The structure of the protein universe and genome evolution. *Nature* 420: 218–223 (2002).
15. Conabio. La diversidad biológica de México: Estudio de país. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D.F., (1998).
16. Wellhausen, E.J., L.M. Roberts, E. Hernández-X., P.C. Mangelsdorf. Razas de maíz en México, su origen, características y distribución. Folleto técnico No. 5, Oficina de Estudios Especiales, Secretaría de Agricultura y Ganadería. México, D.F., (1951).
17. Hernández-Xolocotzi E., A. Ramos-Rodriguez. Metodologías para el estudio de agroecosistemas con persistencia de tecnología agrícola tradicional. En: "Xolocotzia. Obras de Efraím Hernández Xolocotzi. Tomo I". Revista de Geografía Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México. pp. 189–194 (1985).
18. Ramos-Rodríguez A., E. Hernández-Xolocotzi. Reflexiones sobre el concepto de agroecosistemas. En: "Xolocotzia. Obras de Efraím Hernández Xolocotzi. Tomo I". Revista de Geografía Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México. pp. 195–200 (1985).
19. Hernández X., E. Biología agrícola. CECSA, México, p. 170 (1985).
20. Toledo V.M., J. Carabias, C. Mapes, C. Toledo. Ecología y autosuficiencia alimentaria. Siglo XXI Editores, México, D.F. Cuarta edición. pp. 15–28 (1993).

21. FAO (Food and Agriculture Organization). FAOSTATS Agriculture Data. *http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture,* (2002).
22. Arriaga-Arellano E., A. Larqué-Saavedra. Diagnóstico de la situación de la Biotecnología en México. F. Bolívar (coordinador y editor) En: *"Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: Retos y oportunidades"*. Conacyt, México, D.F. pp. 43-70 (2001).
23. Hecht, S.B. The evolution of the agroecological thought. In: M. Altieri, *"Agroecology. The scientific basis of alternative agriculture"*. Westview press/IT publications, Boulder Colorado, Estados Unidos de América, (1987).
24. Tilman, D., K.G. Cassman, P.A. Matson, R. Naylor, S. Polasky. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671–677 (2002).
25. González de León, T. Ciudad lacustre y desarrollo urbano. En: *"Una visión integradora. Universo, Vida, Hombre y Sociedad"*. Bolivar Zapata, F.G. y P. Rudomín (Compiladores), El Colegio Nacional, México D.F. pp. 419-431 (2001).
26. Dirzo, R. Diversidad florística y estado de conservación de las selvas tropicales de México. En: "México ante los retos de la biodiversidad", Sarukhán, J. y R. Dirzo, Conabio, México, D.F. pp. 283-290 (1992).
27. Gómez-Pompa A. En: *"México ante los retos de la biodiversidad"*, Sarukhán, J. y R. Dirzo, CONABIO, México, D.F. pp. 312-321 (1992).
28. Schwentesius-Rinderman, R., Gómez-Cruz, M. A. Ajuste y cambio estructural en la agricultura mexicana: El caso del arroz. En: *"La agricultura y la agroindustria ante los retos del nuevo milenio. Memoria del Seminario"*. Cervantes-Escoto, F., R. Altamirano-Cárdenas y V.H. Palacio-Muñoz (coord.), CIESTAAM, UACH. Texcoco, México. pp. 41–67 (2000).
29. Ávila-Dorantes, J.A., H. Santoyo-Cortés, R. Schwentesius-Rinderman, V.H. Palacio-Muñoz. El mercado del trigo en México ante el TLCAN. En: *"La agricultura y la agroindustria ante los retos del nuevo milenio. Memoria del Seminario"*. Cervantes-Escoto, F., R. Altamirano-Cárdenas y V.H. Palacio-Muñoz (coord). CIESTAAM, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México. pp. 69-78 (2000).
30. Sánchez-Fabián, V. Los efectos de la apertura comercial en la producción de durazno en México. En: *"La agricultura y la agroindustria ante los retos del nuevo milenio. Memoria del Seminario"*. Cervantes-Escoto, F., R. Altamirano-Cárdenas y V.H. Palacio-Muñoz (coord.), CIESTAAM, UACH. Texcoco, México. pp. 105–115 (2000).
31. Contreras-Castillo, J.M. El aguacate mexicano ante los retos de la apertura comercial. En: *"La agricultura y la agroindustria ante los retos del nuevo milenio. Memoria del Seminario"*. Cervantes-Escoto, F., R. Altamirano-Cárdenas y V.H. Palacio-Muñoz (coord.), CIESTAAM, UACH. Texcoco, México. pp. 79-91 (2000).

32. Altieri, M.A. The environmental risks of transgenic crops: an agroecological assessment. *http://nature.berkeley.edu/~agroeco3,* (2002).
33. Téllez-Kuenzler, L. La modernización del sector agropecuario y forestal. Fondo de Cultura Económica, México, D.F. México. pp 86-88 (El cambio tecnológico); pp. 33-61 (Sector Agrícola); pp. 62-75 (Sector Pecuario); pp. 204-212 (Acciones en investigación, ciencia y tecnología), (1994).
34. Tanksley, S., S. McCouch. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277: 1063-1066 (1997).
35. Hoffman C.A., C.R. Carroll. Can we sustain the biological basis of agriculture? *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 26: 69-92 (1995).
36. De la Fuente, J.M., V. Ramírez-Rodríguez, J.L. Cabrera-Ponce, L. Herrera-Estrella. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* 276: 1566-1568 (1997).
37. Kennedy, T.A., S. Naeem, K.M. Howe, J.M.H. Knops, D. Tilman, P. Reich. Biodiversity as a barrier to ecological invasion. *Nature* 417: 636-638 (2002).

FUNDAMENTOS Y CASOS EXITOSOS DE LA BIOTECNOLOGÍA MODERNA

2ª Sección

Casos exitosos

LA VACUNA CONTRA LA HEPATITIS B
UN ÉXITO DE LA BIOTECNOLOGÍA

C. F. Arias Ortiz

Introducción

El uso de vacunas desde principios del siglo pasado, y la introducción de los antibióticos y de las prácticas de higiene modernas unas cuantas décadas después, han contribuido significativamente a disminuir la frecuencia de enfermedades que han sido responsables de una gran parte de la morbilidad y mortalidad ocurridas en la historia de la humanidad. Las vacunas representan uno de los grandes éxitos en la historia de la medicina, y son también consideradas como la intervención médica con una mejor relación costo-beneficio. Esta tecnología ha resultado en la erradicación de la viruela, la inminente erradicación de la poliomielitis y una disminución importante en la prevalencia de muchas otras enfermedades infecciosas. Se estima que en la actualidad la inmunización salva la vida de aproximádamente tres millones de niños al año (1). Sin embargo, todavía mueren en el mundo alrededor de 13 millones de personas anualmente, por enfermedades que son potencialmente prevenibles por vacunación (2). Como un ejemplo de esto, la hepatitis B es responsable de aproximadamente 600 000 muertes cada año.

Contribución de la biotecnología al campo de la vacunación

Tuvo que pasar casi un siglo entre el desarrollo de la primera vacuna contra la viruela, obtenida por Edward Jenner en 1796, y la segunda, para rabia, producida en 1885 por Louis Pasteur (3). Sin embargo, el desarrollo de este campo se aceleró durante el transcurso del siglo pasado, gracias a la identificación en las décadas posteriores de los patógenos responsables de un gran número de enfermedades. En los primeros 50 años del siglo xx se autorizaron para su uso doce vacunas, mientras que

30 más fueron licenciadas entre 1951 y 1998 (4). En la actualidad, con la disponibilidad de las técnicas de la biotecnología moderna, parecería que estamos en el mejor momento para desarrollar nuevas vacunas, ya que esta tecnología ofrece la posibilidad de producir vacunas para enfermedades que han sido, hasta ahora, refractarias a los métodos tradicionales, como por ejemplo la malaria, el sida, o el cáncer cervicouterino producido por papilomavirus. Igualmente, la biotecnología moderna tiene el potencial para mejorar algunas de las vacunas ya existentes, al hacerlas más seguras (con menos riesgos de efectos colaterales), estables (importante para mantener la vacuna en buen estado durante su distribución y almacenamiento) y eficaces (aumentando su potencia para estimular el sistema inmune), o por ejemplo, desarrollando cepas vacunales que protejan contra más de una enfermedad al mismo tiempo. Los inmunógenos producidos por métodos recombinantes deberán también resultar, en algunos casos, más baratos que las vacunas tradicionales, debido a los métodos novedosos de producción que se utilizan. La elaboración de vacunas por métodos recombinantes también permite, en principio, responder de manera más rápida a la aparición de nuevas cepas virulentas.

En reconocimiento al potencial de las vacunas recombinantes para aliviar la carga de las enfermedades infecciosas, un estudio reciente llevado a cabo por el Centro de Bioética de la Universidad de Toronto, en el cual participaron científicos renombrados de diversas partes del mundo, consideró a esta tecnología como la segunda biotecnología más promisoria para mejorar la salud de los países en desarrollo en los próximos cinco a diez años, sólo después del diagnóstico molecular (sencillo y económico) de las enfermedades infecciosas. Los beneficios de la biotecnología en el área de la vacunación muy probablemente sobrepasarán por mucho los riesgos potenciales de su aplicación (5).

Las estrategias metodológicas empleadas para producir las vacunas recombinantes incluyen:

- **La producción por métodos de ingeniería genética de la proteína del patógeno responsable de inducir una inmunidad protectora (antígeno).** Para esto, se introduce el gen del antígeno a bacterias (por ejemplo *Escherichia coli,* que está muy bien caracterizada y no es patógena), o a células eucariontes (como levaduras, células de mamífero o células de insecto, que sintetizan proteínas más complejas que las bacterias), para que funcionen como "fábricas vivas" para producir el antígeno deseado, el cual después se purifica para ser administrado como vacu-

na. Este tipo de vacunas, conocido como de "subunidades", tiene la ventaja de que no utiliza al patógeno completo para estimular al sistema inmune, sino sólo aquellas partes del mismo que son importantes para inducir la inmunidad, por lo que no pueden causar la enfermedad. El nivel más sofisticado para producir vacunas de subunidades es generar animales transgénicos, por ejemplo ovejas, que produzcan en la leche el antígeno protector (6).

- **La utilización de virus o bacterias, atenuados, como vectores de antígenos de microorganismos patógenos.** En contraste con las vacunas de subunidades, los virus y las bacterias que se utilizan como vectores se inoculan completos, pero son microorganismos modificados de tal manera que no causan ninguna enfermedad. A los vectores microbianos se les introduce por métodos de ingeniería genética el gen que codifica por el antígeno del patógeno, y una vez modificados, se utilizan como vehículos de ese gen para la vacunación. Una vez que el vector recombinante ha ingresado a las células de la persona, se sintetiza en el interior de estas células el antígeno que estimulará al sistema inmune del individuo, protegiéndolo así de una infección posterior por el patógeno (7, 8).
- **El uso de vacunas de ácidos nucleicos (DNA y RNA) "desnudos".** Esto es, sin ninguna proteína asociada. Este tipo de vacunas se basa en la utilización de moléculas de DNA (plásmidos) o RNA (genomas de virus no patógenos) que portan el gen del patógeno y que están diseñadas para dirigir la síntesis del antígeno protector directamente en la persona vacunada. Al igual que las vacunas de subunidades, estas vacunas son muy seguras porque no se administra el patógeno completo. Además, su producción es potencialmente más barata (9, 10).
- **La producción de vacunas comestibles.** Éstas se basan en la generación de plantas transgénicas, como el plátano o el jitomate, que han sido modificadas genéticamente para que sinteticen, por ejemplo, en el fruto, la proteína del patógeno, la cual servirá como antígeno cuando la ingiera la persona, induciendo así una inmunidad protectora. Alternativamente, las plantas pueden usarse como "biorreactores" para producir el antígeno a gran escala, el cual posteriormente es purificado y administrado a la persona. Este enfoque también tiene el potencial de producir vacunas de bajo costo (11, 12).
- **La atenuación de patógenos por métodos de DNA recombinante.** Donde se modifica el material genético del patógeno para reducir o eliminar su virulencia. Esta modificación consiste en la remoción o alteración de los genes del patógeno que son esenciales para replicarse efi-

cientemente en la persona infectada y producir la enfermedad. Este método sustituye a los métodos clásicos de atenuación, en los cuales los microorganismos patógenos se debilitan por tratamientos químicos o físicos que alteran al microbio de manera no controlada y que tienen el riesgo de que éste recupere su virulencia (13).

La vacuna contra la hepatitis B: un éxito de la biotecnología

La producción de vacunas por métodos recombinantes ha dado ya frutos importantes. La vacuna contra la hepatitis B, una de las enfermedades más comunes que se conocen y la novena causa de mortalidad en todo el mundo, ha alcanzado una amplia aceptación y uso internacional. El caso del virus de la hepatitis B (VHB) es uno de los mejores ejemplos de la estrecha relación que existe entre la investigación de los aspectos moleculares de la replicación de un virus y los avances en el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de una enfermedad.

Durante muchos años el estudio de la biología de VHB se dificultó debido a que el virus sólo infecta chimpancés y humanos, lo que impedía contar con modelos animales convencionales para estudiar el proceso de infección y enfermedad. Igualmente, el virus no podía crecerse de manera eficiente en el laboratorio, impidiendo su estudio a nivel molecular. Sin embargo, la clonación y secuenciación del genoma del virus, el desarrollo de sistemas basados en cultivo de células hepáticas para estudiar la replicación viral, y el descubrimiento de animales (marmotas, ardillas) que se infectan de manera natural con virus de la misma familia que el VHB, permitieron avanzar de manera importante en el conocimiento de la biología del virus, lo que llevó finalmente al desarrollo de una vacuna recombinante (14).

Epidemiología e importancia médica de la hepatitis B

Como su nombre lo indica, el virus de la hepatitis B infecta preferencialmente las células del hígado (hepatocitos), dañándolas, y causando en humanos la enfermedad conocida como hepatitis. La infección en adultos resulta en una enfermedad seria, caracterizada por un mal funcionamiento del hígado, con síntomas que duran varias semanas y que incluyen amarillamiento de la piel y los ojos (ictericia), orina oscura, fati-

ga extrema, náusea, vómito y dolor abdominal. Aunque la muerte por hepatitis fulminante no es común, ésta se presenta en alrededor del 1% de los casos agudos. El periodo de incubación (tiempo que transcurre entre el momento de la infección y la aparición de la enfermedad) es largo, de 45 a 180 días, y aunque la convalescencia es normalmente mayor de dos meses, más del 90% de los adultos que se infectan con VHB se recuperan completamente. Sin embargo, en aproximadamente el 10% de estos casos, el virus no se elimina totalmente del organismo, y la infección se convierte en crónica. La infección en neonatos o niños muy pequeños cursa usualmente de manera asintomática, pero contrariamente a lo que sucede en adultos, hasta el 90% de los infantes que se infectan durante el primer año de vida y del 30% al 50% de los niños que se infectan entre uno y cuatro años de edad, pueden desarrollar infecciones crónicas. Las infecciones crónicas pueden permanecer asintomáticas, y aun en algunos pocos casos desaparecer, especialmente en los adultos. Sin embargo, otros pacientes desarrollan hepatitis crónica activa que puede progresar hacia cirrosis o cáncer (ver adelante). El riesgo de muerte por cirrosis y cáncer relacionados con la infeción por VHB es del 25% para aquellas personas que se infectan crónicamente durante la niñez (14, 15).

El VHB se contagia primordialmente por contacto con sangre contaminada (por ejemplo por inyecciones o transfusiones no seguras), relaciones sexuales, y de la madre al infante durante el nacimiento, de la misma manera que el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), causa del sida; sin embargo, el VHB es 50 a 100 veces más infeccioso que el VIH. El virus se encuentra en concentraciones altas en la sangre (por ejemplo, los individuos con infecciones crónicas pueden tener títulos de hasta 10,000 millones de virus/ml), el suero y los exudados de las heridas, y en concentraciones moderadas en el semen, el fluido vaginal y la saliva. La mayoría de los contagios en el mundo ocurren de madre a hijo, por contacto entre niños, y por el reciclamiento de agujas y jeringas no esterilizadas, aunque también puede transmitirse al compartir navajas de rasurar, cepillos de dientes, y por el uso de instrumentos no esterilizados para hacer tatuajes o perforaciones en orejas, nariz, lengua, etc. En buena parte de los países en desarrollo (en África al sur del desierto del Sahara y en la mayoría de Asia y el Pacífico), la población se infecta con VHB durante la infancia. En países industrializados (Europa occidental y América del Norte) el patrón es diferente, ya que la mayoría de infecciones las adquieren los adultos jóvenes a través de la actividad sexual y el uso de drogas inyectables [14, 15].

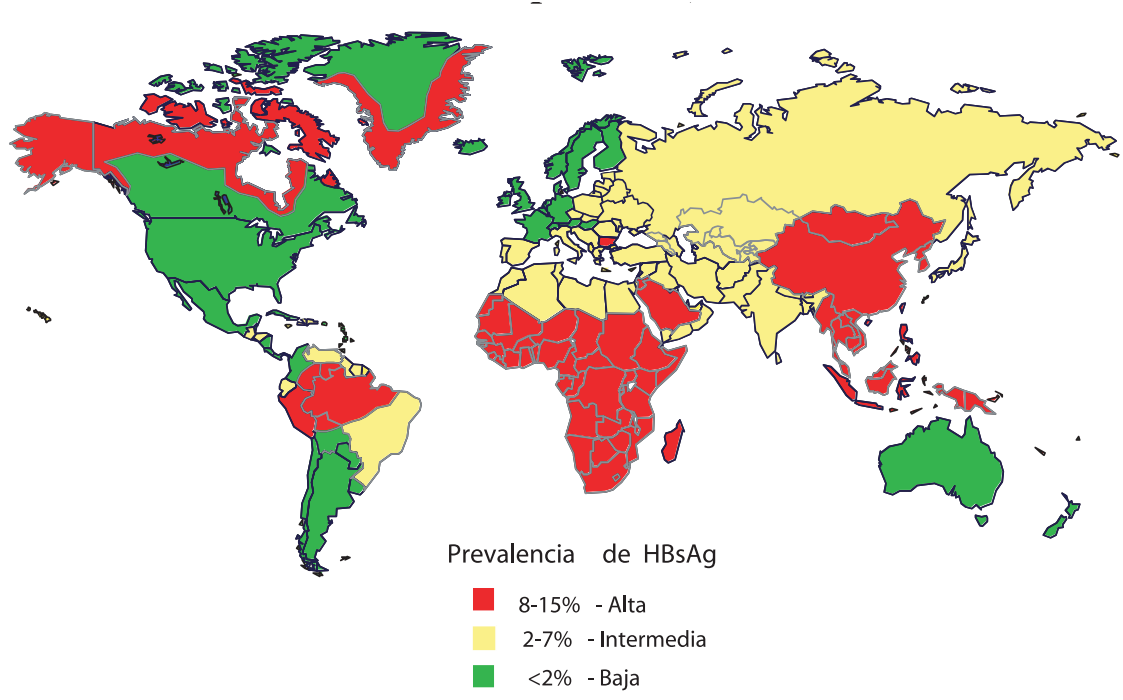


Figura 1

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS INFECCIONES CRÓNICAS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B REGISTRADA EN EL AÑO DE 1998

Se indica el porcentaje de la población (prevalencia) en los diferentes países que es positiva para el antígeno de superficie del virus, HbsAg o proteína S, como indicador de una infección crónica. Los están datos tomados del Programa Sobre Enfermedades y Vacunas de la OMS (www. who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/hepbprev.htm).

Se cree que la infección crónica adquirida durante el nacimiento es el mecanismo principal por el cual el virus persiste en la naturaleza. Hasta 90% de los bebés que nacen de madres con infecciones agudas o crónicas de VHB estarán infectados por VHB, y como se mencionó anteriormente, la mayoría de éstos desarrollarán una infección crónica. Se estima que en el mundo hay 350 millones de portadores (individuos infectados crónicamente) de VHB. El porcentaje de la población crónicamente infectada con VHB varía de 0.1-0.5% en países desarrollados hasta 5-15% en Asia del Sur y en los países africanos localizados al sur del desierto del Sahara (figura 1). Se estima que 60% de las personas que viven en regiones donde más del 8% de la población está infectada crónicamente, serán infectados en algún momento del transcurso de su vida; en lugares donde la prevalencia de cronicidad es de 2 a 8%, el riesgo es de entre 20 y 60%, y en regiones con cronicidad de la población inferiores a 2%, el riesgo es menor a 20% (14, 15).

La infección por VHB también está asociada a un alto riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (CHC), y parece ser el factor individual más importante para desarrollar esta forma de cáncer de hígado. El CHC se encuentra entre los 10 tipos de cáncer más frecuentes en humanos y causa más de 500 000 muertes al año en todo el mundo. El CHC es más común en regiones que exhiben una alta cronicidad para VHB (16).

Debido a la gravedad potencial de las infecciones crónicas por VHB, lo cual incluye la posibilidad de infectar a otros, se ha mantenido un esfuerzo continuo para desarrollar métodos que permitan controlar o eliminar la infección en personas infectadas crónicamente. Se han probado diversos medicamentos incluyendo el interferón, de acción anti-viral inespecífica, y un análogo de nucleósidos conocido como lamivudina, que inhibe la transcriptasa reversa del virus (ver adelante) que pueden ayudar a algunos pacientes, aunque el porcentaje de éxito es relativamente bajo y el tratamiento es muy caro. El transplante de hígado se emplea en algunos pacientes con cirrosis; sin embargo, el virus circulante invariablemente reinfecta el transplante. Por estas razones, la mejor estrategia para evitar las infecciones crónicas es prevenir la infección a través de la vacunación.

Conocimiento de la biología del virus como antecedente necesario para el desarrollo de la vacuna recombinante

El genoma del virus de la hepatitis B es circular, formado por aproximadamente 3 200 pares de bases. Consiste de DNA que es casi, en su tota-

lidad, de doble cadena. El genoma está asociado a una proteína que se conoce como el antígeno nuclear (HBcAg), y a la polimerasa (transcriptasa reversa) viral, que es la responsable de replicar el genoma del virus a través de un intermediario de RNA. Este complejo de DNA y proteína, conocido como nucleocápside, está envuelto por una capa de lípidos que contiene la glicoproteína externa del virus, la que se conoce clásicamente como antígeno de superficie (HBsAg), antígeno Australia, o bien, como más recientemente se le ha llamado, proteína S. Los viriones maduros tienen un tamaño de 42 nm y se conocen como partículas "Dane", en honor de D. S. Dane, quien las describió en 1970 en el suero de pacientes infectados (figura 2A). La proteína S en la superficie de los virus de 42 nm se presenta en tres versiones, que comparten el extremo carboxilo terminal y difieren en su extremo amino (figura 2B): la proteína S, con un peso molecular de 24 000 daltones, es la más abundante; la proteína M, que comprende totalmente a la proteína S, más una región extra en el extremo amino y; la proteína L, la cual contiene integramente a la proteína M, más un fragmento adicional en el extremo amino terminal. Las proteínas L, M y S se encuentran aproximadamente en una relación 1:1:4. El fragmento adicional que tiene la proteína L en su extremo amino, comparada con las proteínas M y S, es necesario para que el virus se pueda unir al receptor celular y ser por lo tanto capaz de infectar la célula (17).

Además de las partículas Dane de 42 nm, en las células infectadas también se producen en abundancia partículas de 20 nm (en un exceso de 10 000 a un millón de veces sobre las partículas Dane). Estas partículas contienen las proteínas S y M, pero no la proteína L (o en muy bajas cantidades), y les falta la nucleocápside viral, es decir, el genoma del virus asociado a la polimerasa y al antígeno nuclear, por lo que no son infecciosas. No se sabe por qué el virus produce cantidades tan altas de tales partículas, que pueden llegar a concentraciones de hasta 10^{13}/ml en un paciente infectado, y la concentración de proteína S presente en estas partículas puede llegar a ser más de 100 mg/ml de suero (15, 17).

Con la tecnología del DNA recombinante, y la posibilidad de tener clonado el genoma de VHB, se logró expresar el gen de la proteína S en diversos tipos de células, encontrándose que las células de mamífero que sintetizan la proteína S de manera individual, son capaces de ensamblar y secretar partículas de 20 nm, morfológicamente idénticas a las que se producen en una infección natural (18). Esto hizo posible el desarrollo de una vacuna recombinante contra VHB, la primera vacuna basada en la metodología de DNA recombinante autorizada para una enfermedad infecciosa en humanos.

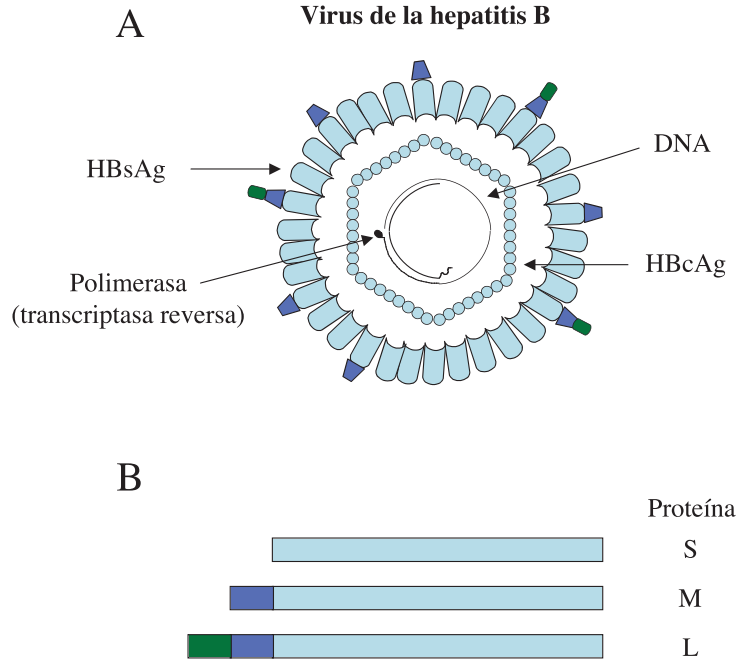


Figura 2

VIRUS DE LA HEPATITIS B

(A) Esquema de la estructura del virus de la hepatitis B, donde se muestran los componentes principales del virión, incluyendo el genoma del virus (DNA), la enzima encargada de replicar el genoma del virus (transcriptasa reversa), el antígeno nuclear (HbcAg) y el antígeno de superficie (HbsAg). (B) Se esquematizan las tres variantes del antígeno de superficie del virus, proteínas S, M y L.

La primera vacuna, licenciada en 1981 (Heptavax-B, Merck, Sharp & Dohme), se preparaba a partir de plasma sanguíneo de individuos infectados crónicamente. Consistía de preparaciones altamente purificadas de las partículas de 20 nm tratadas para inactivar cualquier infectividad viral residual, ya fuera de VHB o de cualquier otro virus. Esta vacuna era efectiva y segura; sin embargo, la poca disponibilidad del plasma de estos pacientes, los altos costos de producción, y el riesgo de obtener productos contaminados con virus desconocidos presentes en el plasma humano motivó el desarrollo de una vacuna producida por ingeniería genética. Así, el grupo de Pablo Valenzuela y colaboradores diseñaron y construyeron el primer microorganismo genéticamente modificado, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (la misma que se usa para hacer pan), para la producción de lo que fue la primera vacuna recombinante contra el virus de la hepatitis B (18), (figura 3). La obtención del antígeno protector (la proteína S) del virus de la hepatitis B a partir de células de levadura elimina los problemas mencionados anteriormente. El tiempo de producción de la vacuna a partir de estas células es aproximadamente cinco veces menor al de la obtenida de plasma; la variabilidad entre lotes vacunales es también menor y prácticamente no existen limitaciones en la cantidad que se puede obtener. Por estas razones, cuando se comercializó el uso de la vacuna recombinante en 1987, la vacuna obtenida de plasma prácticamente dejó de utilizarse. Sin embargo, este tipo de vacunas todavía se producen en varios países como Corea, China, Indonesia, Mianmar y Vietnam.

En la actualidad hay varias vacunas recombinantes contra la hepatitis B en el mercado, producidas en células de levadura o en células de mamífero (células CHO, de ovario de hamster chino). Con excepción de uno de los sistemas de expresión en células CHO (Genehevac-B, Pasteur-Merieux), que consiste en una mezcla de proteínas M y S, todas las otras preparaciones tienen sólo la proteína S. Las vacunas de hepatitis B autorizadas en la mayoría de los países son obtenidas en levadura. Para producir la vacuna, se introduce a las células de levadura un plásmido de expresión (molécula pequeña de DNA circular capaz de autorreplicarse dentro de una célula, a partir de la cual se expresa el gen clonado para sintetizar la proteína de interés) que contiene el gen S del virus de la hepatitis B bajo el control de un promotor de un gen de levadura (figura 3). Para liberar la proteína S producida en el interior de las células, éstas se rompen agitándolas con perlas de vidrio y posteriormente la proteína se purifica a través de varios métodos bioquímicos estándar que incluyen

ultrafiltración, cromatografía y ultracentrifugación. Finalmente, la proteína purificada se adsorbe a partículas de hidróxido de aluminio (el cual se utiliza como adyuvante para aumentar la respuesta inmune), y en algunos casos se trata previamente con formaldehído para inactivar cualquier agente infeccioso contaminante. Estas vacunas contienen menos del 2% de proteínas de levadura y no contienen material genético de estas células [14].

A diferencia de otras vacunas, el riesgo de efectos colaterales serios ocasionados por la vacuna recombinante de hepatitis B es extremadamente bajo. La reacción generalmente se limita a un brazo adolorido (en el sitio de la inyección) y a fiebre ligera. La razón principal de la inocuidad de esta vacuna es que contiene únicamente agregados proteicos altamente purificados, en ausencia absoluta de virus infeccioso, el cual sí puede generar reacciones secundarias severas o infectar a la persona y producir la enfermedad. Las dos vacunas más ampliamente distribuidas son Recombivax HB (Merck & Co.), autorizada en 1987 y Engerix-B (GlaxoSmithKline), licenciada dos años más tarde, aunque vacunas similares se producen en varios países como Francia, Corea del Sur, Cuba, Japón y la India, o se encuentran en diferentes estados de desarrollo en varios otros países.

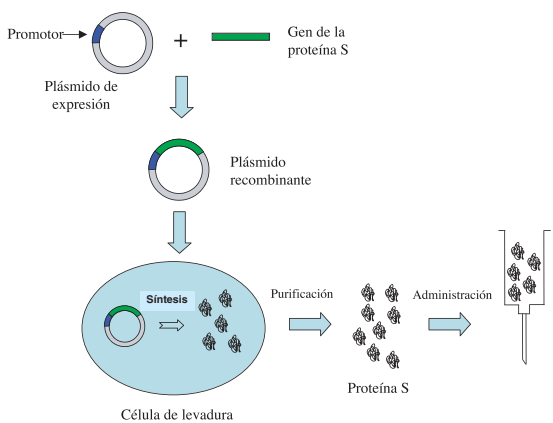


Figura 3

ESQUEMA DE LA PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA S DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN CÉLULAS DE LEVADURA

El gen de la proteína S se inserta en un plásmido de expresión bajo el control de un promotor de levadura. El plásmido recombinante obtenido se introduce a células de levadura, las cuales utilizarán la maquinaria celular para sintetizar la proteína S a partir del plásmido. La proteína S se extrae de las levaduras y se purifica de contaminantes celulares, para ser utilizada como vacuna recombinante.

La vacuna es bastante efectiva para prevenir la hepatitis aguda si se administra antes de la exposición al virus o poco tiempo después de la infección, ya que el periodo de incubación de VHB es lo suficientemente largo para dar la oportunidad a que el sistema inmune de la persona responda a la vacuna y controle la infección. Normalmente esta vacuna se aplica como una serie de tres dosis intramusculares.

Aunque la vacuna no elimina una infección crónica, es altamente eficaz (90-95%) para prevenir las infecciones agudas (de corta duración), y es igualmente efectiva para evitar que niños y adultos desarrollen una infección crónica si se aplica antes de la infección. Se recomienda la vacunación para adultos en alto riesgo, tales como personal médico, personal de laboratorio que manipula muestras de sangre potencialmente infectadas, individuos sexualmente activos con múltiples parejas, personas que se inyectan drogas, o individuos de grupos étnicos que presentan una alta incidencia de VHB. Igualmente, se recomienda la vacunación de todos los niños al nacer, en parte para prevenir el establecimiento de infecciones crónicas en bebés nacidos de madres infectadas, pero también para eventualmente eliminar el virus de la población. Se ha visto que la inmunización de los infantes 12 hr. después de nacidos, seguidos de tres o cuatro inmunizaciones adicionales, es efectiva para prevenir la infección crónica con VHB, aun en infantes nacidos de madres positivas para VHB.

En resumen, se ha demostrado que la inmunización contra el virus de la hepatitis B confiere protección inmediata y de largo plazo contra la infección por VHB y reduce significativamente la incidencia de infecciones crónicas y el establecimiento de CHC. Estudios comparativos de grupos de niños nacidos en 1991 o en 1997, permitió estimar que los programas actuales de vacunación han evitado que más de 2.4 millones de personas se conviertan en portadores y han disminuido en más de medio millón el número de muertes relacionadas con la hepatitis B. En varios países de Asia (por ejemplo, Tailandia, Indonesia, China, Taiwan y Gambia) y en la región de Alaska en el continente americano, donde la transmisión perinatal es alta y existen programas nacionales de inmunización, la prevalencia de portadores se ha reducido de entre 5% y 15% a menos de 1%. El impacto de la vacunación también ha sido importante para reducir la frecuencia de CHC en Taiwan y Gambia, donde representa una

causa importante de muerte en la población adulta, al igual que en otros países al sur del Sahara y en Asia (14).

La disponibilidad de vacunas eficaces y seguras contra la hepatitis B ofrece la oportunidad de reducir la incidiencia de VHB a través de programas de inmunización masiva. Para conseguir esto, hasta octubre de 2000, 116 países en el mundo, incluyendo México, habían integrado la vacuna recombinante de la hepatitis B a sus programas nacionales de inmunización, como lo recomienda la OMS. El estado actual de vacunación contra VHB a nivel mundial se muestra en la figura 4. Dado el número cada vez mayor de vacunas que se administran en la niñez, la tendencia es crear vacunas combinadas para disminuir el número de inyecciones que reciben los niños durante sus visitas al médico. En el caso de la vacuna contra la hepatitis B, ésta se ha integrado a una vacuna pentavalente que protege al mismo tiempo contra difteria, tétanos, tosferina y *Haemophilus influenzae* tipo b.

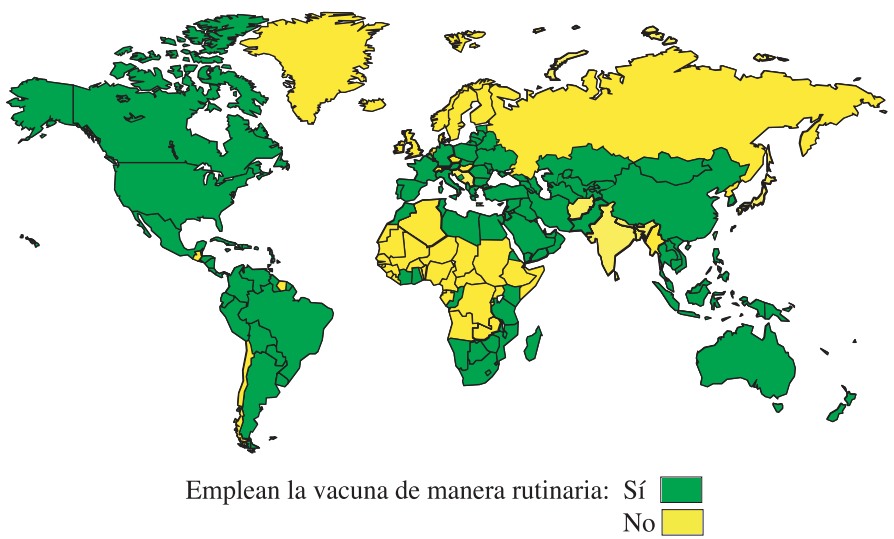


Figura 4

PAÍSES QUE INCLUYEN LA VACUNA CONTRA HEPATITIS B EN SU PROGRAMA NACIONAL DE INMUNIZACIÓN

Distribución de los países que incluyen la vacuna contra la hepatitis B en su programa nacional de inmunización de manera rutinaria. Datos de marzo del 2002, tomados del Programa Sobre Enfermedades y Vacunas de la OMS (www.who.int./vaccines-surveillance/graphics/htmls/hepb.htm).

Esfuerzos en países en desarrollo para producir la vacuna recombinante de VHB

Después de que las patentes que cubrían la producción de vacunas por métodos recombinantes han vencido, empresas en varios países han empezado a producir la vacuna para consumo local o regional. Así, por ejemplo, Shanta Biotech y Bharat Biotech están produciendo la vacuna de la hepatitis B en India a precios más bajos que los de la vacuna importada (19). En el caso de México, la compañía Probiomed S.A. de C.V., la cual ha sido pionera en la producción e introducción al mercado nacional de productos recombinantes (por ejemplo, las proteínas de uso terapeútico eritropoyetina, interferones y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos), está en proceso de elaboración de una vacuna recombinante producida en células de levadura, que se estima estará en el mercado próximamente.

Investigación en México sobre vacunas recombinantes

México tiene una larga e importante tradición en la producción de las vacunas esenciales para las enfermedades prevenibles más frecuentes. Además de los Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V. (BIRMEX), existen varios grupos trabajando en el diseño y elaboración de vacunas para prevenir enfermedades prioritarias para el país, como son dengue, cáncer cervicouterino y enfermedades gastrointestinales, como las causadas por rotavirus, salmonella, amibas y *E. coli*. Las investigaciones que se están realizando en México por grupos de la UNAM, CINVESTAV, IMSS y los Institutos Nacionales de Salud, entre otros, incluyen la caracterización de los antígenos relevantes de los patógenos que estimulan una respuesta inmune protectora, el empleo de oligosacáridos para interferir la unión de agentes infecciosos a las células blanco, el desarrollo de vacunas de subunidades, de DNA y RNA, la producción de antígenos virales en plantas, etc. Asimismo, existen varios grupos que tienen experiencia en ensayos clínicos y en nuevas estrategias de inmunización, como es la aplicación de vacunas por las mucosas, así como en la vigilancia epidemiológica y molecular de varias enfermedades.

La biotecnología moderna ofrece enormes posibilidades para el desarrollo de una nueva generación de vacunas más estables, eficaces, seguras, e idealmente más económicas. Esta tecnología ofrece también la posibilidad de desarrollar vacunas contra enfermedades que han sido hasta ahora refractarias a la elaboración de inmunógenos por métodos tradicionales, tales como sida, malaria y el cáncer cervicouterino, y será importante para disminuir la incidencia de algunos cánceres de origen infeccioso, como el de estómago (*Helicobacter pylori*), y los hepatocarcinomas (virus de las hepatitis B, C y D). Finalmente, debido a los sucesos recurrentes y cada vez más frecuentes de terrorismo, no debe desatenderse la producción de vacunas, tanto tradicionales como mejoradas por ingeniería genética, contra agentes que son claros candidatos para el bioterrorismo, en particular contra el virus de la viruela, por el devastador efecto que tendría su liberación en una población no protegida inmunológicamente, esto es, no vacunada, tal como está la población mundial actual.

El desarrollo de la vacuna contra el virus de la hepatitis B es un ejemplo claro de la importancia del estudio de la biología molecular de los microorganismos patógenos y del gran potencial de la biotecnología en el área de la vacunación. En este sentido, es importante impulsar el estudio de la biología de los patógenos humanos, incluyendo la secuenciación de su genoma, lo que deberá contribuir al entendimiento de los mecanismos de generación de la enfermedad (patogénesis) y al diseño de métodos eficaces de tratamiento y prevención (20), y debe ser considerada también como una prioridad de investigación en el campo de la salud (5).

Tomando en cuenta la experiencia que existe en el campo de la investigación y producción de vacunas en México, así como la elevada prevalencia que aún tienen las enfermedades infecciosas en nuestro medio y los costos asociados a las mismas, en un estudio reciente, en el cual se analizaron las perspectivas de la biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI, se consideró que el desarrollo de vacunas debe ser identificado como un proyecto de alta prioridad en salud pública (21). Esta conclusión es reforzada por el hecho de que en el diseño de vacunas es importante considerar las variaciones genéticas de los agentes infecciosos en diferentes regiones del mundo, ya que las vacunas que se emplean con éxito en un país dado, no siempre tienen la misma

eficacia en un país diferente. Por esta razón debe estudiarse la genética de los agentes infecciosos que afectan nuestra población y diseñar vacunas tomando en cuenta dicha diversidad.

El desarrollo de vacunas en nuestro país podría verse beneficiado de manera casi inmediata con la creación de un centro virtual para el desarrollo y evaluación de vacunas que coordine el esfuerzo de los grupos que realizan actualmente investigación en este campo. En un futuro se podría considerar la conveniencia de establecer un centro con representación de las instituciones participantes, y con una o varias vinculaciones académicas, para asegurar, por un lado, la formación de recursos humanos, y por otro, espacios futuros para investigadores jovenes.

Bibliografía

1. Widdus, R. The potential to control or eradicate infectious diseases through immunisation. *Vaccine* 17: p. S6-S12 (1999).
2. Organización Mundial para la Salud, Informe sobre las enfermedades infecciosas: Eliminar obstáculos al desarrollo sustentable (1999). www.who.int/infectious-disease-report/idr99-spanish/index.htm
3. Pasteur, L. Methode pour prevenir la rage press morsure. *C.R. Acad. Sci.* Paris 101: 765-780 (1885).
4. Hilleman, M.R. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine* 18: 1436-1447 (2000).
5. Daar, A.S., *et al.* Top Ten Biotechnologies for Improving Health in Developing Countries. University of Toronto Joint Centre for Bioethics (2002), www.utoronto.ca/jcb/_genomics/top10biotechnologies.pdf.
6. Liljeqvist, S. S. Stahl Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J. Biotechnol.* 73: 1-33 (1999).
7. Bonnet, M.C., *et al.* Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers. *Immunol Lett.* 74: 11-25 (2000).
8. Medaglini, D., *et al.* Immunization with recombinant *Streptococcus gordonii* expressing tetanus toxin fragment C confers protection from lethal challenge in mice. *Vaccine,* 19: 1931-1939 (2001).
9. Agapov, E.V., *et al.* Noncytopathic Sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 12989-12994, (1998).
10. Amara, R.R., *et al.* Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 292: 69-74 (2001).
11. Langridge, W.H.R. Edible Vaccines. *Scientific American* (septiembre) 48-53, (2000).

12. Mason, H.S., *et al.* Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol Med* 8: 324-329 (2002).
13. Dertzbaugh, M.T. Genetically engineered vaccines: an overview. *Plasmid* 39: 100-113 (1998).
14. Hollinger, F.B., T.J. Liang Hepatitis B Virus. En: *Fields Virology,* D.N. B. N. Knipe, Howley, P. M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, R. A., Roizman, B., y Straus, S. E., Editor. Raven Press N.Y., USA. pp. 2971-3036 (2001).
15. Strauss, J.H., E.G. Strauss Family Hepadnaviridae. En: *Viruses and Human Disease.* Academic Press: San Diego. pp. 210-219 (2002).
16. Feitelson, M.A. Hepatitis B in hepatocarcinogenesis. *J Cell Physiol* 181: 188-202 (1999).
17. Ganem, D., R.J. Schneider. Hepadnaviruses: The viruses and their replication. En: *Fields Virology,* D.N. B. N. Knipe, Howley, P. M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, R. A., Roizman, B., y Straus, S. E., Editor. Raven Press: N.Y., USA. 2923-2969 (2001).
18. Valenzuela, P., *et al.* Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature.* 298: 347-350 (1982).
19. Joshi, N., *et al.* Safety and immunogenicity of indigenous recombinant hepatitis B vaccine (Shanvac-B) in comparison with commercially available vaccine. *Indian J Gastroenterol* 19: 71-73 (2000).
20. Pizza, M., *et al.* Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287: 1816-1820 (2000).
21. Arias, C.F., O. Muñoz. Biotecnología en el Sector Salud, En: *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI,* F. Bolívar, Editor. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Fondo de Cultura Económica. México, pp. 169-184(2002).

LA PRODUCCIÓN DE HORMONAS DEL CRECIMIENTO POR TÉCNICAS DE INGENIERÍA GENÉTICA
SU UTILIZACIÓN EN LOS SECTORES DE LA SALUD Y PECUARIO

H. A. Barrera Saldaña
I. P. Rodríguez Sánchez
C. N. Sánchez Domínguez
A. A. Pérez Maya
J. A. Ascacio Martínez
G. Padilla Rivas

Introducción

La biotecnología moderna y la producción de hormonas proteicas

En su concepción moderna, la biotecnología es la manipulación a través de las técnicas de la ingeniería genética de los microorganismos, plantas y animales para fabricar comercialmente productos y procesos que beneficien al hombre. La biotecnología incide en áreas tan diversas como la producción de alimentos, degradación de desechos industriales, la minería y la medicina. Los logros recientes incluyen a las plantas y animales transgénicos y la producción de medicamentos por éstos, así como también a la explotación comercial de las secuencias génicas generadas por los proyectos del genoma humano, y los similares en proceso y por iniciar de las principales plantas y animales de interés comercial.

Como se ha señalado en el capítulo IV de este libro, las técnicas pilares de esta revolución en la biotecnología permitieron, desde mediados de la década de 1970, aislar y manipular genes específicos y con ello el desarrollo de microorganismos transgénicos que fabrican proteínas de origen eucarióntico con utilidad terapéutica, como vacunas, enzimas y hormonas. Esto a su vez condujo a la creación en esa época de una nueva clase de empresas de biotecnología moderna como Genentech, Amgen, Biogen y Cetus, que hicieron de la producción de proteínas derivadas de

la expresión de genes de origen humano insertados en bacterias, un nuevo y muy próspero negocio en EUA y Europa.

De facto es importante señalar que la hormona de crecimiento humano fue, después de la insulina, el segundo producto de esta nueva tecnología, que arribó a las farmacias a principios de la década de los ochenta. Este producto se desarrolló y comercializó inicialmente por la empresa Genentech, y se utilizó en un principio en la clínica para el tratamiento de problemas de crecimiento y enanismo (1). Además, las hormonas de crecimiento de diferentes especies animales también se han producido en organismos transgénicos y se han empleado en diferentes ejemplos en los sectores pecuario y acuícola.

La familia de la hormona del crecimiento (GH)

Las GHs pertenecen a una familia de proteínas con similitud estructural y algunas funciones comunes, que incluye también a la prolactina (Prl), la somatolactina (SL), el lactógeno placentario (PL), la proliferina (PLF), y proteínas relacionadas con Prl (PLP) (2). Esta familia representa uno de los grupos proteicos fisiológicamente más diversos que han evolucionado por duplicación génica. Los dos miembros más estudiados de la familia han sido la GH y la Prl, habiendo sido descritas desde los peces primitivos hasta los mamíferos; sin embargo, los otros miembros de la familia no están muy ampliamente distribuidos, ni estudiados.

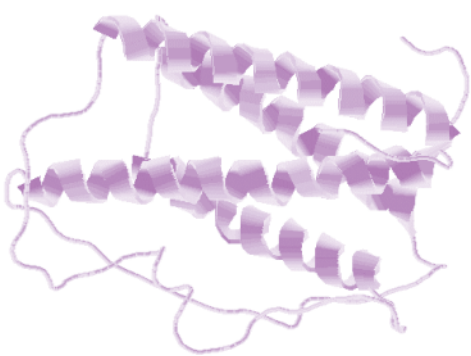


Figura 1
ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL CONSENSO DE LAS HORMONAS DEL CRECIMIENTO
Las GHs poseen en general 190 residuos de aminoácidos, cuatro hélices alfa y dos puentes disulfuro.

Las GHs son proteínas de aproximadamente 190 residuos aminoacídicos, con un peso molecular de 22 000 daltones (22kDa), y que en general no requieren de modificaciones postraduccionales. Son sintetizadas en los somatotropos de la hipófisis en el cerebro, interviniendo como un factor endocrino importante en el crecimiento somático postnatal y durante la lactación (figura 1).

Hormonas del complejo GH-PL del humano

HGH22k

Como se ha señalado, además de ser la cura para el enanismo hipofisiario, la HGH22k se emplea como anabólico en el atletismo y en el tratamiento de traumatismos por sus propiedades regenerativas (tabla 1) (3).

HGH22k es el producto principal del gene hGH-N y es responsable del crecimiento postnatal, así como un importante modulador del metabolismo de carbohidratos, lípidos, nitrógeno y minerales. Es la hormona más conocida y la única comercializada de los miembros de la familia HGH.

HGH20k

Además del RNAm de la HGH22k, una vía alternativa del procesamiento del transcrito primario del gene hGH-N, genera un segundo RNAm responsable de la producción de la llamada isoforma 20k de la HGH o HGH20k. Su menor tamaño se debe a la eliminación de los primeros 45 nucleótidos del tercer exón en el RNAm y por ende a la carencia de los residuos aminoacídicos correspondientes a las posiciones 32-46 en la hormona, dando como resultado una proteína de 176 residuos de aminoácidos (4).

Esta isoforma constituye aproximadamente 10% de toda la GH producida en la hipófisis y aunque no se ha demostrado que sea el agente etiológico de alguna enfermedad conocida, se sabe que sus niveles son significativamente más altos en pacientes con acromegalia activa y en pacientes con anorexia nerviosa (5).

La administración de la HGH20k exógena suprime la secreción endógena de la HGH22k en sujetos sanos, lo que sugiere que la regulación de la secreción de ambas hormonas es fisiológicamente similar (6). Hallazgos *in vitro* sugieren que ambas hormonas pueden estimular por igual la remodelación de hueso y permitir los efectos anabólicos sobre tejido esquelético, cuando son administradas *in vivo* a animales de laboratorio (7).

HGHV

Del gene hGH-V se derivan también otras isoformas (tabla 1). El RNAm más abundante de este gene en la placenta a término codifica también para una isoforma de 22 kDa. Una isoforma menos abundante (HGHV2) retiene el cuarto intrón que codificaría para una proteína de 26 kDa que se anclaría a la membrana y podría tener una acción local (8). También de la isoforma de 22 kDa se derivaría una proteina de 25 kDa por glicosilación en el residuo 140 de asparagina (9, 10). Finalmente, dos nuevos transcritos de este gene han sido recientemente identificados: uno de ellos produciría una proteína de 20 kDa y el otro, conocido como hGH-V3, una de 24 kDa (11).

Tabla 1
ISOFORMAS DE HGH-V GENERADAS POR PROCESAMIENTO ALTERNATIVO

Isoforma	*Tamaño*	*Longuitud*	*Característica*
HGH-V 22k	22 kDa	191 aa	Isoforma principal.
HGH-V 25k	25 kDa	191 aa	Versión glicosilada de la HGH22k.
HGH-V 2	26 kDa	230 aa	Retiene el cuarto intrón.
HGH-V 20K	20 kDa *	176 aa	Deleción de los residuos aa 32 a 46.
HGH-V 3	24 kDa *	219 aa	Procesamiento alternativo a nivel del exón 4.

* Sólo se han identificado los RNAms que las codifican.

Durante el embarazo, mientras que la HGH de la pituitaria desaparece progresivamente de la circulación materna hasta alcanzar valores indetectables en las semanas 24 a 25, los de la HGHV incrementan sostenidamente hasta el momento del parto, sugiriendo que lleva a cabo un papel clave durante la gestación humana (12). Ademas, se ha encontrado que en casos de retardo en el crecimiento intrauterino (IUGR), los niveles circulantes de HGHV medidos entre la semana 31 y la fecha del parto, son menores que los reportados para embarazos normales (13, 14, 15).

Aunque la función de la HGHV no está totalmente definida, su actividad biológica ya ha comenzado a ser estudiada, clasificándola en dos categorías generales:

a. Actividades somatogénicas. Implican el crecimiento lineal de hueso y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos; efectos que en parte son mediados por la generación local y hepática del factor de crecimiento semejante a insulina-I (IGF-I). La actividad somatogénica de la HGHV ha sido estudiada por estimulación de la ganancia de peso corporal en ratas hipofisectomizadas, reportándose un incremento lineal comparable al inducido por la proteína HGH22k (16).

b. Actividades lactogénicas. Incluyen la estimulación de la lactación y funciones reproductivas (17). La actividad lactogénica de esta misma hormona ha sido estudiada empleando un modelo celular (mediante la respuesta mitogénica de células Nb2) y se reporta una respuesta paralela a la generada por HGH22k, pero significativamente menor (16).

Finalmente, aunque niveles bajos de esta hormona se han asociado con retardo del crecimiento intrauterino, también se han reportado casos de embarazos con deleción del gene hGH-V, pero sin patología alguna aparente (18).

Lactógeno placentario humano (HPL)

Aparte de los dos genes hGH (normal y variante), tres HPLs complementan la familia multigénica HGH-HPL del genoma humano y se acomodan en el siguiente orden: HGH-N, HPL-1, HPL-2, HGH-V y HPL-3 (19, 20) (figura 2). Mientras que el HPL-l es un pseudogene, el HPL-2 y HPL-3 son muy activos en placenta e interesantemente las versiones maduras de las hormonas que codifican, son idénticas (21).

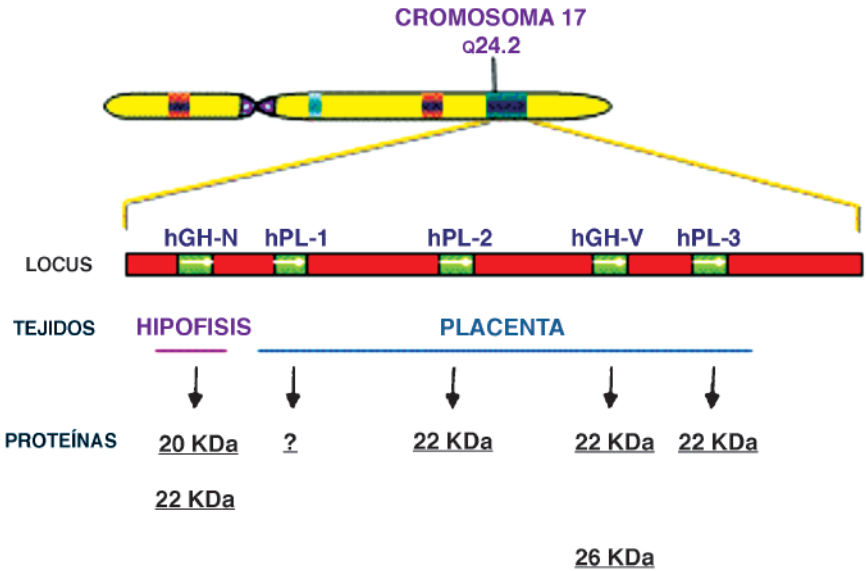


Figura 2

EL COMPLEJO MULTIGÉNICO HGH-HPL

Se indica la localización en el cromosoma 17 de los genes que lo constituyen, tejidos en que se expresan y las isoformas proteicas a las que dan origen.

En los últimos años en la Universidad Autónoma de Nuevo León se han clonado y expresado en cultivo celular todos los genes del complejo hGH-hPL, y estudiado en particular los factores que afectan sus niveles de expresión (22).

De la misma manera, y recurriendo al empleo de la reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos consensos, se han aislado también varios nuevos genes y DNA complementarios de un buen número de GHs, principalmente de mamíferos (23).

Hormonas del crecimiento de origen animal

Hormona del crecimiento bovino (BGH)

La hormona del crecimiento bovino (BGH) o somatotropina bovina mejora la eficiencia de producción de leche (por unidad de alimento consumido) (24), y la producción (peso corporal) y composición (rela-

ción músculo:grasa) de la carne (25). En el caso del ganado lechero, esto permite la reducción del número de animales requeridos para la producción de leche y el consecuente ahorro en el mantenimiento, alimento, agua, medicamentos, etc.; también se reduce la producción de estiércol, del nitrógeno en la orina y del metano (26) (tabla 2).

La leche de vacas tratadas con BGHr, no difiere de la de vacas no tratadas (27, 28). Las características que han sido evaluadas al respecto incluyen el punto de congelación, pH, propiedades térmicas, susceptibilidad a oxidación, y características sensoriales, incluyendo el sabor; de hecho, todas sus propiedades organolépticas se conservan. Tampoco se han encontrado diferencias en las propiedades requeridas para producir queso, incluido el crecimiento inicial del cultivo, coagulación, acidificación, producción y composición (29).

Tabla 2
CONSIDERACIONES ECONÓMICAS Y DE BIOSEGURIDAD DE LA BGHr

- Su administración a animales incrementa la tasa de crecimiento, ganancia de peso y producción de carne y leche (26).
- Incrementa la producción de leche en el ganado vacuno lechero hasta 25% en promedio (25).
- Estudios de la FDA de EUA demostraron que la BGHr no tiene efecto en dosis diarias equivalentes a 2.3 millones de veces a lo que sería expuesto un humano en cinco vasos de ocho onzas de leche al día (28).
- El uso de BGHr en ganado vacuno lechero no representa ningún riesgo para la salud de los consumidores (28, 29).

La administración de la BGH*r* se lleva a cabo por vía subcutánea y la formulación que actualmente se utiliza comercialmente es una suspensión de liberación prolongada que se aplica en un intervalo de tiempo determinado. El sabor de la carne y leche de bovinos tratados con BGH*r* no es alterado, pero el contenido de grasa en la carne es menor.

Hormona del crecimiento caprino (CHGH)

Para los pequeños rumiantes existen estudios en cabras en lactación en las que la administración de la BGHr incrementó en 23% la produc-

ción láctea y se estimuló el crecimiento de la glándula mamaria por encima del grupo estimulado con ordeña frecuente, pareciéndose en ello a la prolactina (30). Sin embargo, no se ha reportado la fabricación de la CHGH recombinante, la cual por cierto es idéntica a la ovina y por ende pudiera emplearse en ambos ganados.

Hormona del crecimiento equino (ECGH)

Con relación a los caballos, la GH se utiliza en la prevención del desgaste muscular, en la reparación de tendones y de huesos fracturados, así como en el tratamiento de la anovulación en yeguas. Aparte de esto, también se utiliza en la reparación de tejido muscular y como tonificador y vigorizante en caballos de registro y de competencia, lo mismo que para mejorar las condiciones físicas en caballos de edad avanzada, restaurando el balance del nitrógeno. Además, es capaz de estimular el crecimiento y la maduración temprana de caballos jóvenes, de incrementar la producción de leche en yeguas lactantes y de promover la cicatrización de heridas, particularmente de huesos y cartílagos (31, 32), tal y como ocurrió con el caso referido en la figura 3.

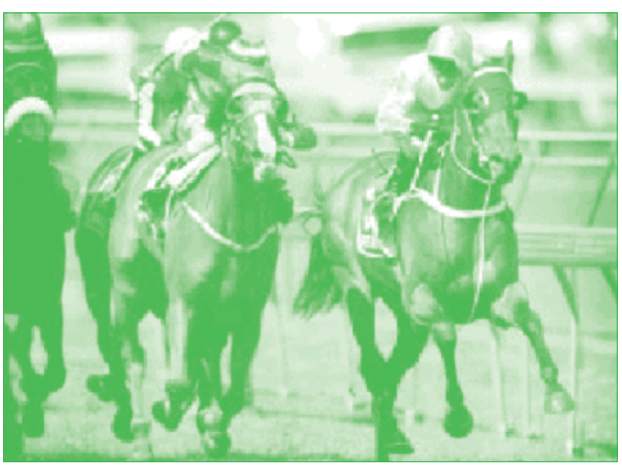


Figura 3

USOS DE LA GH EQUINA

Se muestra a "Might and Power", un caballo de carreras (derecha) que resultó ganador de la copa de Melbourne, Australia en 1997. En 1999 se lastimó severamente el tendón de una de sus patas, fue sometido a tratamiento con ECGH, se recuperó y en el año 2000 pudo regresar a las competencias de carreras (32, 33).

Hormona del crecimiento canino (CFGH)

Respecto al perro (*Canis familiaris*), cada día hay mas evidencia del papel que juega su GH (CFGH) en el tratamiento de fracturas óseas, sobre las que la hormona ayuda a disminuir el tiempo de restauración del hueso. No es menos importante el tratamiento de obesidad en perros, gracias a la activación que del metabolismo hace la hormona para la remoción de ácidos grasos, y en general, para contrarrestar todos los síntomas derivados de la ausencia o disminución de ésta. Además, por ser esta hormona idéntica a la GH del cerdo (PGH) (33), todas sus virtudes son también válidas para la aplicación de la CFGH en la industria porcícola, donde genera carne más magra (34) y por ende de mayor valor.

Hormona del crecimiento felino (FCGH)

Aunque existe escasa literatura acerca de la GH del gato (FCGH), sin duda los beneficios identificados en las otras GHs se aplicarían sobre esta especie felina, ya que estos animales también presentan los síntomas arriba referidos para el perro, originados por la ausencia o baja concentración de la FCGH (enanismo y alopecia, entre otros síntomas). Además, como está referido en la literatura, los ensayos biológicos de actividad adipogénica en células en cultivo, utilizan suero de gato (que contiene FCGH) en lugar del bovino, por carecer la FCGH de adipogenicidad (35). Por ende, la producción recombinante de esta GH sería de gran utilidad en los ensayos mencionados. Huelga decir sobre la utilidad que tendría la FCGH recombinante en las investigaciones que están por venir sobre el estudio y papel metabólico de esta hormona en su misma y otras especies felinas, incluidos por supuesto los grandes felinos en cautiverio.

Potencial biotecnológico de las GHs

Hormonas de origen humano

Si bien la HGH22k está ampliamente comercializada, no sucede lo mismo con el resto de las proteínas e isoformas pertenecientes a la familia. A saber, la isoforma de 20kDa de la HGH, la HGHV, la isoforma también

de 20 kDa de esta última (HGHV20k) y por último el HPL. En parte por ello, aún se desconoce mucho sobre sus funciones y mecanismos de acción.

Importa señalar que en 1998 la revista *Time* divulgó noticias sobre los efectos que se están descubriendo a esta hormona para contrarrestar algunos problemas de la vejez. Todavía más, se sospecha que algunas de las variantes naturales menos abundantes de la hormona, como la HGH20k, pudieran retener las propiedades deseables de la hormona principal y carecer de las otras indeseables de ésta, tales como el efecto diabetogénico que se desencadena con su uso prolongado (36).

Tabla 3
NUEVAS FUNCIONES ATRIBUIDAS A LA HGH22K

Inmunización y cicatrización
- Resistencia a enfermedades comunes
- Capacidad de cicatrización
- Cicatrización de lesiones antiguas
- Cicatrización de otras lesiones
- Tratamiento de úlceras

Piel y pelo
- Elasticidad de la piel
- Engrosamiento de la piel
- Textura de la piel
- Crecimiento de pelo nuevo
- Desaparición de arrugas
- Hidratación de la piel

Factores sexuales
- Duración de la erección
- Aumento de la libido
- Potencia/frecuencia de la actividad sexual
- Frecuencia de la micción nocturna
- Regulación y control del ciclo menstrual
- Bochornos y síntomas asociados
- Efectos positivos en el sistema reproductivo
- Incrementa el volumen de la leche materna

Función mental
- Estabilidad emocional
- Memoria
- Aspecto general y actitud
- Energía mental y claridad de pensamiento

Fuerza y tono muscular
- Aumenta la fuerza muscular
- Promueve la ganancia de masa muscular
- Proporciona energía en general

Sistema Circulatorio
- Mejora la circulación
- Estabiliza la presión sanguínea
- Mejora el funcionamiento del corazón

Grasas
- Remoción de ácidos grasos
- Eleva los niveles de colesterol "bueno" (HDL)
- Reducción de grasa

Hueso
- Aumenta la flexibilidad en la espalda y articulaciones
- Tratamiento de fracturas óseas.
- Tratamiento de osteoporosis

El potencial biotecnológico de las GHs pudiera ser enorme, pues aparte de su uso en sus especies de origen, se ha demostrado que las GHs de los mamíferos tienen actividad en animales filogenéticamente inferiores. Así, por ejemplo, la BGH y la GH porcina (PGH) han sido utilizadas experimentalmente para el tratamiento del enanismo hipofisiario en perros (37) y en gatos (38).

En cuanto a animales de granja, los ganados porcino, bovino, caprino y ovino, han sido tratados con GH exógena para mejorar la producción, pues aumenta la eficiencia de conversión alimenticia, la tasa de crecimiento, la ganancia de peso y la producción de leche y carne. Más sorprendente ha sido el hallazgo en el que la BGH estimula el crecimiento del salmón, y todavía más interesante aún, el que el lactógeno placentario (PL) bovino funciona aún mejor (39).

Sistemas de expresión para las hormonas del crecimiento

Historia de la GH recombinante de origen humano

Como se ha señalado, de entre los primeros genes clonados y expresados en la bacteria *Escherichia coli* se encuentra precisamente el de la HGH (1). Este sistema de expresión se ha utilizado desde 1985 para la producción de HGH recombinante por la compañía Genentech (protropin), a la que luego le siguieron Lilly (humatrope), Biotech (biotropin), Novo Nordisk (norditropin), Serono (serostim) y otras más.

Hospederos biotecnológicos distintos de bacterias

Debido a que de *E. coli* la proteína recombinante se recupera frecuentemente con modificaciones indeseables (metionina extra, plegamiento incorrecto, formas agregadas, etc.) y contaminada con sustancias de alta pirogenicidad, se requiere de esquemas de purificación laboriosos para obtenerla con la pureza, estructura y actividad biológica deseadas.

Por ello, los esfuerzos subsecuentes se enfocaron a la búsqueda de mejores sistemas de expresión, habiéndose intentado la producción en

Saccharomyces cerevisiae (40), *Bacillus subtilis* (41), cultivos de células de mamíferos (42, 43), lo mismo que en animales transgénicos (44). Desafortunadamente estos sistemas de expresión no ofrecen un nivel de producción superior al de *E. coli* y por lo tanto no son rentables.

En nuestro laboratorio se tuvo éxito produciendo la HGH22k en *E. coli*, fusionándola a la proteína de unión a maltosa (HGH-MBPr) en 1994 (45). Sin embargo, dado que para recuperar la hormona, ya sea del periplasma o del citoplasma bacteriano, se requiere de estrategias complicadas, sumado a las limitaciones del sistema bacteriano para plegar y procesar proteínas extrañas correctamente, se propuso buscar un sistema de expresión que permitiera sintetizar la proteína, purificarla con mayor facilidad y retener su funcionalidad. Es por ello que se inició en la ULIEG de la UANL, la evaluación de distintos sistemas de expresión, resultando ser la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* el mejor (46).

Pichia pastoris *como sistema de expresión*

Las levaduras ofrecen lo mejor de los dos mundos, pues además de realizar algunas de las modificaciones postraduccionales comunes a los organismos superiores, son casi tan fáciles de crecer en matraces y biorreactores como las bacterias, empleando medios de cultivo simples y baratos (47).

P. pastoris es una levadura metilotrófica (capaz de crecer en metanol como única fuente de carbono) que lleva a cabo modificaciones postraduccionales, produce niveles de proteínas recombinantes de uno a dos órdenes de magnitud por encima de *Saccharomyces cerevisiae* (48), es capaz de secretar proteínas heterólogas al medio de cultivo (donde los niveles de proteínas nativas son muy bajos) y que en contraste con esta última, puede cultivarse a densidades celulares de más de 100 g/l de peso seco (49).

Hormonas recombinantes del crecimiento: una oportunidad para México

En la ULIEG de la UANL se identificó como un objetivo científico y una ventaja tecnológica, el construir y evaluar cepas de *P. pastoris* productoras de proteínas de la familia GH. Esto como un primer paso para evaluar su

potencial tanto en el área médica como en la productividad y sanidad animal, buscando a la par desarrollar tanto la infraestructura, como la experiencia para producirlas, purificarlas y ensayar su actividad biológica.

Aún más, como se mencionó arriba, las GHs de mamíferos tienen actividad en animales filogenéticamente inferiores, y no obstante se pueden desencadenar reacciones potencialmente adversas a la terapia con GHs heterólogas, por lo que el contar con la GH especie-específica evitaría tales efectos indeseables.

Con respecto a las hormonas humanas, se propuso construir cepas productoras de la isoforma de 22kDa de HGH (tanto unicopia, como multicopia), la isoforma de 20 kDa (HGH 20k), la variante placentaria (HGHV) de la HGH y el lactógeno placentario (HPL). Por lo que a las GHs animales concierne, nos abocamos a construir cepas para producir las GHs animales bovina (BGH), caprina (CHGH), ovina (OGH), equina (ECGH), canina (CFGH), porcina (PGH) y felina (FCGH); todas basadas en el sistema de expresión de la levadura *Pichia pastoris*.

Para ello se planteó la siguiente estrategia experimental:

a. Obtener, clonar y manipular los DNA complementarios de las hormonas de interés.
b. Construir y transferir *P. pastoris* los casetes de expresión de dichas hormonas.
c. Desarrollar los procesos de fermentación para cada nueva cepa.
d. Evaluar esquemas de purificación de las hormonas recombinantes.
e. Evaluar *in vitro* la actividad biológica de las hormonas recombinantes.

Como resultado del trabajo experimental realizado, se obtuvieron los siguientes logros:

i. Se obtuvo la clonación por diversas vías metodológicas (RT-RCP, RCP mutagénico, subclonación) de los DNA complementarios de las hormonas del crecimiento humano de 22 kDa, humano de 20 kDa, humano variante, latógeno placentario, bovina, caprina-ovina, canina-porcina, equina y felina, en un "casete" de expresión para *Pichia pastoris*.
ii. Se integraron los respectivos "casetes" de expresión al genoma de *Pichia pastoris* y se verificó esta integración mediante la técnica de PCR.
iii. Se logró obtener una cepa multicopia de *P. pastoris* que produce 44% más de HGH22k con respecto a la monocopia obtenida por Escamilla-Treviño en 1996.

iv. Se logró sobreproducir y secretar al medio de cultivo cada una de las hormonas respectivas.
v. Los datos arrojados en los ensayos de actividad biológica, muestran que la metodología aquí descrita genera proteínas heterólogas que son biológicamente activas.

Perspectivas

Los logros alcanzados propician el inicio de gestiones para vincular este esfuerzo con el sector productivo, para desarrollar la tecnología de producción de las GHs aquí estudiadas y manipuladas de interés humano y pecuario.

Las perspectivas a corto plazo son producir las diferentes GHs con cantidad, calidad y actividad aceptables para iniciar evaluaciones a nivel de campo, con el propósito de investigar sus potenciales en la biotecnología pecuaria, para luego ofrecerlas como una opción en tratamientos veterinarios y para estimular la producción ganadera, lo mismo que para el sector salud. Además de la obvia aplicación veterinaria o pecuaria, su disponibilidad permitirá también descubrirles actividades biológicas inesperadas. Por ejemplo, como se mencionó arriba, el PL bovino posee una fuerte capacidad para promover el crecimiento de los salmónidos (39), mejor que la de la propia GH, sugiriendo que existen propiedades biológicas de los miembros de la familia GH que están esperando ser descubiertas. Por lo que el paso que aquí hemos dado es sin duda en la dirección correcta.

Bibliografía

1. Goeddel D.V., Heyneker H.L., Hozumi T., Arentzen R., Itakura K., Yansura D.G., Ross M.J., Miozarri G., Crea R., Seeburg P. Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature* 281(5732): 544-548 (1979).
2. Niall H.D., Hogan M.L., Sayer R., Rosenblum I.Y., Greenwood, F.C. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene duplication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 68: 866-869 (1971).
3. Elian G.J.J., Gross S. *Staying young: growth hormone and other natural strategies to reverse the aging process.* Age Reversal Press. First Edition, 120 pp. (1999).

4. De Noto F, Rutter J.W., Goodman H.M. Human growth hormone DNA sequence and mRNA structure: possible alternative splicing. *Nucleic Acid Res.* 9: 3719-30 (1981).
5. Tsushima T., Katoh Y., Miyachi Y., Chihara K., Teramoto A., Irie M., Hashimoto, Y. Serum concentrations of 20K human growth hormone in normal adults and patients with various endocrine disorders. Study Group of 20K hGH. *Endocr. J.* 47 Suppl: S 17-21 (2000).
6. Hashimoto Y., Kamioka T., Hosaka M., Mabuchi K., Mizuchi A., Shimazaki Y., Tsuno M., Tanaka T. Exogenous 20 K growth hormone (GH) suppresses endogenous 22K GH secretion in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85(2): 601-606 (2000).
7. Wang D.S., Sato K., Demura H., Kato Y., Maruo N., Miyachi Y. Osteo-anabolic effects of human growth hormone with 22K- and 20K Daltons on human osteoblast-like cells. *Endocr. J.* 46(1): 125-132 (1999).
8. Cooke N.E., Ray J., Emery J.G., Liebhaber S.A. Two distinct species of human growth hormone-variant mRNA in the human placenta predict the expression of novel growth hormone proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 9001-9006 (1988).
9. Ray J., Jones B., Liebhaber S.A., y Cooke N.E. Glycosylated human growth hormone variant. *Endocrinology* 125:566-568 (1989).
10. Frankenne F., Scippo M., Van Beeumen J., Igout A., Hennen G. Identification of placental human growth hormone as the growth hormone-V gene expression product. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 15-18 (1990).
11. Boguszewski C.L., Svensson P.A., Jansson T., Clark R., Carlsson M.S. Carlsson B. Cloning of two novel growth hormone transcripts expressed in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83(8): 2878-2885 (1988).
12. Frankenne F., Closset J., Gomez F., Scippo M.L., Smal J., Hennen G. The physiology of growth hormones (GHs) in pregnant women and partial characterization of the placental GH variant. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66(6): 1171-1180 (1988).
13. Mirlesse V., Frankenne F., Alsat E., Poncelet M., Hennen G., Evain-Brion D. Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growht retardation. *Pediatr Res.* 34: 439-442 (1993).
14. Chowen J.A., Evain B.D., Pozo J., Alsat E., García Segura L.M., Argente J. Decreased expression of placental growth hormone in intrauterine growth retardation. *Pedriatr. Res.* 39 (4 Pt 1): 736-739 (1996).
15. Pardi G., Marcini A.M., Cetin I. Pathophysiology of intrauterine growth retardation: rol of the placenta. *Acta Pediatr. Suppl.* 423: 170-172 (1997).
16. MacLeod J.M., Worsley I., Ray J., Friesen H.G., Liebhaber S.A., Cooke N.E. Human growth hormone-variant is a biologically active somatogen and lactogen. *Endocrinol.* 128(3): 1298-1302 (1991).

17. Cooke N.E. Prolactin: normal synthesis and regulation. En DeGroot L.J. (ed.) *Endocrinology*. Saunders, Philadelphia., 1: 384-407 (1989).
18. Rygaard K., Revol A., Esquivel-Escobedo D., Beck B.L., Barrera-Saldaña H.A. Absence of human placental lactogen and placental growth hormona (HGH-V) during pregnancy: PCR análisis of the deletion. *Human Genet.* 102(1): 87-92 (1998).
19. Chen E.Y., Liao Y.C., Smith D.H., Barrera-Saldaña H.A., Gelinas R.E., Seeburg P.H. The human growth hormone locus: nucleotide sequence, biology, and evolution. *Genomics.* 4(4): 479-97 (1989).
20. Barrera-Saldaña H.A. Growth hormone and placental lactogen: biology, medicine and biotechnology. *Gene* 211: 11-18 (1998).
21. Barrera-Saldaña H.A., Seeburg P.H., Saunders G.F. Two structurally different genes produce the secreted human placental lactogen hormone. *J. Biol. Chem.* 258: 3787-3793 (1983).
22. Canizales-Espinoza M., Martínez-Rodríguez H.G., Vila V., Revol A., Jiménez-Mateo O., Egly J.M., Catrillo J.L., Barrera-Saldaña H.A. Differntial strength of transfected human growth hormone and placental lactogen genes promoters. *Arch. Med. Res.* (en prensa) (2003).
23. Barrera-Saldaña H.A., Sánchez–Domínguez C.N., Gallardo-Blanco H.L., Ascacio-Martínez J.A., Palma-Nicolás J.P., Reyes-Ruiz J.M. Clonación y expresión en *Pichia pastoris* de hormonas de crecimiento de interés pecuario. *Ciencia UANL.* Enviado (2003).
24. Peel C.J. Bauman D.E. Somatotropin and lactation. *J. Dairy Sci.* 70: 474-486 (1987).
25. Etherton T.D., Kensinger R.S. Endocrine regulation of fetal and postnatal meat animal growth. *J Anim Sci.* 59(2): 511-528 (1984).
26. Bauman D.E. Regulation of nutrient partitioning: homeostasis, homeorhesis and exogenous somatotropin. Keynote lecture. En: Seventh International Conference on Production Disease in Farm Animals, F.A. Kallfelz pp. 306-323 (1989).
27. Sun M. Market sours on milk hormone. *Science* 17: 246(4932): 876-877 (1989).
28. Juskevich J.C., Guyer C.G. Bovine growth hormone: human food safety evaluation. *Science* 24: 249(4971): 875-884 (1990).
29. Gallardo-Blanco H.L. Construcción de cepas de *Pichia pastoris* portadoras del ADNc de la hormona del crecimiento bovino. Tesis de maestría. Facultad de Medicina, UANL (1999).
30. Boutinaud M., Rulquin H., Keisler D.H., Djiane J., Jammes H. Use of somatic cells from goat milk for dynamic studies of gene expression in the mammary gland. *J. Anim. Sci.* 80(5): 1258-69, (2002).
31. Stewart F., Tuffnell, P.P. Cloning the cDNA for horse growth hormone and expression in *Escherichia coli*. *J. Mol. Endocr.* 6: 189-196 (1991).

32. http://www.jockeysite.com/stories/e_melbournecup1.htm
33. Ascacio-Martínez J.A., Barrera-Saldaña, H.A. A dog growth hormone cDNA codes for mature protein identical to pig growth hormone. *Gene* 143: 299-300 (1994)
34. Evock *et al.* (1988).
35. Morikawa M., Green H., Lewis U.J. Activity of human growth hormone and related polypeptides on the adipose convertion of 3T3 cells. *Molecular and Cellular Biology* 4(2): 228-231 (1984).
36. Daughaday W.H. *The anterior pituitary.* Williams textbook of Endocrinology. Ed. Philadelphia, WB Saunders. 568-613 (1985).
37. Eigenmann J.E. Diagnosis and treatment of dwarfism in a german shepherd dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 17: 798-804 (1981).
38. Muller G.H., Kirk R.W., Scott D.W. *Small animal dermatology.* Philadelphia.WB. Saunders. 4th Edition, 575-657 (1989).
39. Devlin R.H., Byatt J.C., Maclean E., Yesaki T.Y., Krivi G.G., Jaworski E.G., Clarke W.C. Bovine placental lactogen is a potent stimulator of growth and displays strong binding to hepatic receptor sites of coho salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 95: 31-41 (1994).
40. Tokunaga T., Iwai S., Gomi H., Kodama K., Ohtsuka E., Ikehara M., Chisaka O., Matsubara K. Expression of synthetic human growth hormone gene in yeast. *Yeast* 39: 117-120 (1985).
41. Franchi E., Maisano F., Testori S.A, Galli G., Toma S., Parente L., Ferra F.D., y Grandi G. A new human growth hormone production process using a recombinant *Bacillus subtilis* strain. *J. Biotechnology* 18: 41-54 (1991).
42. Pavlakis G.N., Hizuka N., Gorden P., Seburg P.H., Hamer D.H. Expression of two human growth hormone genes in monkey cell infected by simian virus 40 recombinants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 7398-7402 (1981).
43. Ortiz-López R. Análisis molecular y caracterización de la cardiomiopatía dilatada ligada al cromosoma X. Tesis de maestría. Facultad de Medicina, UANL, México (1999).
44. Kerr D.E., Liang F., Bondioli K.R., Zhao H., Kreibich G., Wall R.J., Sun T.T. The bladder as a bioreactor: Urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nature Biotechnology,* 16: 75-78 (1997).
45. Martínez-Torres A. Un vector de expresión eucariótica con módulos activadores de la transcripción intercambiables y un gene de referencia. Tesis de maestría. Facultad de Medicina, UANL, México (1991).
46. Escamilla-Treviño L.L., Viader Salvado J.M., Barrera Saldaña H., Guerrero Olazaran, M. Biosynthesis and secretion of recombinant human growth hormone. En: *Pichia Pastoris. Biotechnology Letter* 22: 109-114 (2000).
47. Romanos M.A., Scorer C.A., Clare. J.J. Foreign gene expression in yeast: A review. *Yeast* 8: 423-488 (1992).

48. Faber K.N., Harder W., Veenhuis, M. Review: Yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* 11: 1131-1344 (1995).
49. Siegel R.S., Brierley R.A. Methylotrophic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentation with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 34: 403-404 (1989).

BIOTECNOLOGÍA FARMACÉUTICA MODERNA EN MÉXICO
EL CASO DE PROBIOMED S.A. DE C. V.

O. T. Ramírez Reivich
J. Uribe de la Mora

Introducción

La biotecnología y su trascendencia en el área médico-farmacéutica

Una de las áreas en donde las promesas de la biotecnología se han concretado con mayor claridad es, sin lugar a dudas, el de la salud humana. El desarrollo de las vacunas y el descubrimiento de los antibióticos representaron hitos trascendentales que mejoraron sustancialmente la calidad de vida del ser humano a lo largo de los siglos XIX y XX. Como se ha señalado con más detalle en el capítulo IV de este libro, el desarrollo de la ingeniería genética y de la tecnología de hibridomas, a partir del último cuarto del siglo XX, ha tenido también una trascendencia equiparable, posibilitando la producción masiva y segura de proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales y otras macromoléculas biológicas, nuevas o poco abundantes en la naturaleza, cuyos usos abarcan la terapia, profilaxis y el diagnóstico. En el momento actual nos encontramos otra vez ante nuevos adelantos de la biotecnología que seguramente cambiarán en forma radical la práctica médica y la industria farmacéutica del siglo XXI. Se trata de la expansión de células troncales (o madre) y de la regeneración de tejidos *in vitro,* la clonación de animales superiores y el desciframiento detallado del genoma humano, así como el de muchas especies de animales, plantas y microorganismos. La aplicación de tal conocimiento será una herramienta poderosa en la identificación, prevención y solución de enfermedades que hasta la fecha no han encontrado cura a pesar de los avances de la medicina. Estos desarrollos inéditos también acarrearán nuevos dilemas, particularmente de carácter ético, por lo que no solamente es de esperarse, sino que será deseable, que sean discutidos a fondo por la sociedad en general.

En los últimos 20 años la biotecnología moderna, o aquella basada en técnicas de la ingeniería genética y la fusión celular, ha brindado un renovado vigor a la industria farmacéutica tradicional. Esto puede apreciarse en el hecho que alrededor de 20% de los nuevos medicamentos introducidos al mercado en los últimos tiempos son productos de la biotecnología moderna (1). Además, se espera que para la siguiente década aproximadamente la mitad de los nuevos medicamentos serán de origen biotecnológico y que técnicas propias de la biotecnología se empleen en alguna o varias de las etapas del desarrollo de todos los demás medicamentos. En la figura 1 se muestra el número de aprobaciones que la Agencia Federal de Alimentos y Drogas (FDA) de los EUA ha otorgado en el área farmacéutica a productos biotecnológicos desde 1982. Las aprobaciones incluyen tanto productos nuevos como nuevas aplicaciones de productos previamente autorizados. Se puede observar que las aprobaciones han ido creciendo consistentemente a lo largo de los últimos 20 años, lo que indica no solamente un aumento en el número de productos sino también un aumento en los padecimientos tratados por tales productos. La tendencia exponencial de aprobaciones acumuladas refleja el gran dinamismo del área (figura 1).

Los productos de la biotecnología moderna están orientados a tratar más de 200 padecimientos, incluyendo sida, artritis, lupus, diabetes, anemia falciforme, fibrosis quística, enfermedades cardio-vasculares, tuberculosis, hepatitis, esclerosis múltiple, Parkinson, Alzheimer, asma y cáncer, entre otros (2). Además, a través del desarrollo de sistemas y estuches de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* basados en anticuerpos monoclonales, y recientemente en información derivada del conocimiento del genoma humano, la biotecnología moderna ha contribuido a la detección oportuna, y por consiguiente aplicación de tratamientos tempranos y de mayor eficacia, de una cantidad importante de padecimientos. Actualmente existen más de 75 proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales que constituyen el principio activo de un número mayor de distintos medicamentos (2). Si a tal lista se agregan moléculas pequeñas desarrolladas por compañías biotecnológicas y productos basados en ingeniería de tejidos, entonces el número aumenta a más de 155 (3, 4). Adicionalmente, más de 360 medicamentos biotecnológicos se encuentran en diversas etapas de desarrollo y pruebas clínicas (2). Es de esperarse también la aparición de nuevos productos farmacéuticos biotecnológicos

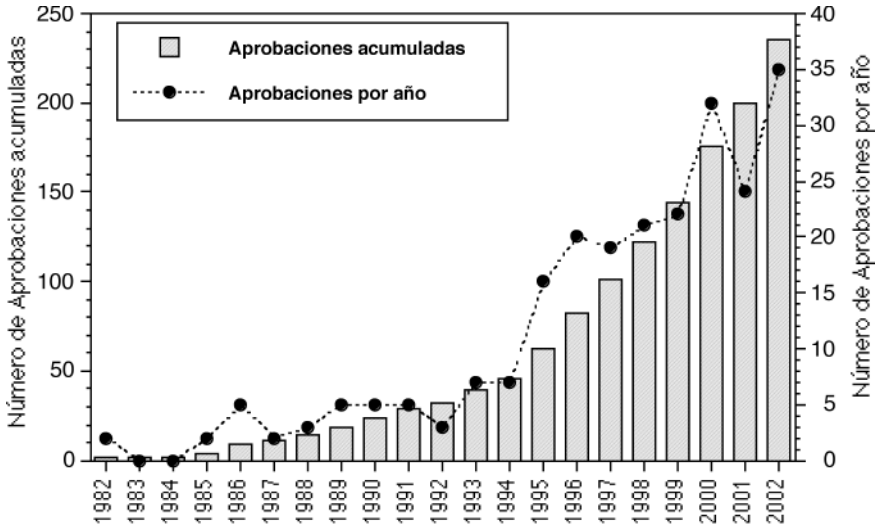


Figura 1
NÚMERO DE MEDICINAS BIOTECNOLÓGICAS Y VACUNAS APROBADAS POR EL CBER Y EL CDER
Los datos se refieren a la suma de aprobaciones tanto de productos nuevos como de nuevas aplicaciones de productos previamente aprobados. Se muestran las aprobaciones por año y acumuladas. (Adaptado de (3)). El CBER es el Centro de Evaluación e Investigación de Biológicos de la Agencia Federal de Alimentos y Drogas (FDA) de EUA. El CBER tiene la función de asegurar la eficacia y seguridad de los biológicos, entendidos éstos como cualquier virus, suero terapéutico, toxina, antitoxina, vacuna, sangre, componente o derivado de la sangre, producto alergénico o producto análogo aplicable a la prevención, tratamiento o cura de enfermedades y heridas humanas. Entre tales productos se encuentran las proteínas recombinantes, anticuerpos monoclonales, terapia por células somáticas, terapia génica y bancos de tejidos humanos. El CDER es el Centro de Evaluación e Investigación de Drogas de la FDA y su función es similar a la del CBER, sólo que para moléculas no contempladas como biológicos.

para luchar contra la amenaza de posibles agresiones terroristas con agentes biológicos, lo que se ha convertido en una preocupación creciente derivada del nuevo entorno mundial. En la tabla 1 se listan los productos biotecnológicos y biológicos (tanto recombinantes como no recombinantes) aprobados por la FDA desde 1997 hasta la fecha (5). Una reco-

Producto (Tipo)	*Nombre comercial*	*Compañía*
Agentes terapéuticos y profilácticos aprobados por el CBER: proteínas recombinantes (PR) ó anticuerpos monoclonales (AcM)		
Alefacept (PR de fusión dimérica)	Amevive	Biogen
Pegfilgrastim (PR, G-CSF pegilado)	Neulasta	Amgen
Ibritumomab Tiuxetan (AcM inmunoconjugado con quelador)	Zevalin	IDEC Pharmaceuticals
Interferon beta-1a (PR)	Rebif	Serono
Toxoides de difteria y tétanos y vacunas combinadas de pertussis acelular, hepatitis B y poliovirus inactivado (vacuna, PR)	Pediarix	SmithKline Beecham
Adalimumab (AcM contra factor de necrosis tumoral)	Humira	Abbott
Rasburicasa (PR, enzima urato-oxidasa tetramérica)	Elitek	Sanofi-Synthelabo
Peginterferon alfa-2a (PR, interferón alfa-2a pegilado)	Pegasys	Hoffman-La Roche
Peginterferon alfa-2b (PR, interferon alfa-2b pegilado)	PEG-Intron	Schering
Alemtuzumab (AcM humanizado dirgido a glicoproteínas de superficie de células CD52)	Campath	Millennium & ILEX Partners
Vacuna de Hepatitis A inactivada y Hepatitis B (PR, vacuna)	TWINRIX	SmithKline Beecham
Darbepoetin alfa (PR estimulante de eritrocitos)	Aranesp	Amgen

IOTECNOLÓGICOS DE LA FDA ENTRE 1997 Y 2003

*A**	*Indicación principal*	*B**
2003	Psoriasis crónica	
2002	Neutropenia febril	
2002	Linfoma no-Hodgkins folicular o de células B	
2002	Esclerosis múltiple	
2002	Inmunización contra virus de difteria, tétanos, pertussis, subtipos de hepatitis B y poliomielitis	
2002	Daño estructural en pacientes con artritis reumatoide	
2002	Acido úrico en plasma de pacientes con leucemia, linfoma y tumores sólidos malignos	17
2002	Hepatitis C crónica	
2001	Hepatitis C crónica	
2001	Leucemia linfocítica crónica de células B	
2001	Inmunización contra virus de hepatitis A y subtipos B	
2001	Anemia asociada a falla renal	1

Anakinra (PR, antagonista no glicosilado del receptor de Il-1)	Kineret	Amgen
Drotrecogin alfa (PR, proteína C)	Xigris	Eli Lilly
Tenecteplasa (PR, tPA modificado)	TNKasa	Genentech
Factor antihemofílico (Glicoproteína)	ReFacto	Genetics Institute
Factor de coagulación Vlla (Glicoproteína)	NovoSeven	Novo Nordisk
Denileukina diftitox (PR autotóxica, fragmentos de toxina diftérica e IL-2)	Ontak	Seragen
Etanercept (fusión IgG1 y PR receptor TNF)	Enbrel	Immunex
Trastuzumab (PR, AcM contra HER2)	Herceptin	Genentech
Infliximab (AcM quimérico ratón/humano)	Remicade	Centocor
Palivizumab (AcM)	Synagis	MedImmune
Basiliximab (AcM, quimérico ratón/humano)	Simulect	Novartis
Vacuna enfermedad Lyme (Vacuna, PR, lipoproteínas de *Borrelia burgdorferi*)	LYMErix	SmithKlime Beecham
Daclizumab (AcM quimérico ratón/humano)	Zenapax	Hoffman-LaRoche
Rituximab (AcM quimérico ratón/humano)	Rituxan	IDEC Pharmaceutical/ Genentech
Factor de coagulación IX (PR)	Benefix	Genetics Institute
Interferon alfacon-1 (PR)	Infergen	Amgen
Oprelvekin (PR, Il-11)	Neumega	Genetics Institute

Agentes terapéuticos y profilácticos aprobados por el CDER: proteínas recombinantes (PR) ó anticuerpos monoclonales (AcM)

Teriparátido (PR, fracción hormona paratiroidea)	FORTEO	Elli Lilly

2001	Reducción de síntomas de artritis reumatoide	
2001	Reducción de la mortalidad en pacientes adultos con sepsis severa	
2000	Reducción de la mortalidad asociada con infarto al miocardio agudo	1
2000	Control de hemorragias	1
1999	Control hemorragias: hemofilia A o B	3
1999	Tratamiento linfoma cutáneo de células T cuyas células malignas expresan CD25 del receptor IL-2	13
1998	Artritis reumatoide	1
1998	Cáncer mamario	1
1998	Enfermedad de Crohn	4
1998	Profilaxis de virus syncytial respiratorio	5
1998	Profilaxis de rechazo agudo de órganos	4
1998	Inmunización activa contra enfermedad de Lyme	13
1997	Profilaxis de rechazo agudo de órganos	6
1997	Linfoma no Hodgkin de células B	1
1997	Control de hemorragias: hemofilia B	1
1997	Hepatitis C crónica	13
1997	Prevención de trombocitopenia severa	
2002	Osteoporosis en mujeres postmenopáusicas	13

Nesiritido (PR, péptido natriurético)	Natrecor	Scios
Insulina glargina (PR, insulina biosintética)	Lantus	Aventis
Gemtuzumab ozogamicin (AcM unido a caliceamicina)	Mylotarg	Celltech Chiroscience/ Wyeth-Ayerst
Insulina aspartato (PR, análogo de insulina, sustitución de prolina por aspártico B28)	NovoLog	Novo Nordisk
Gonadotropina coriónica humana (PR)	Ovidrel	Serono
Somatropina (PR, HGH en microesferas de poliláctido-coglicólido)	Nutropin Depot	Genentech & Alkakermes
Follitropina alfa (PR, hormona estimulante de folículo	Gonal-F	Serono
Ribavirin y alfa interferón (combinación con PR)	Rebetron	Schering-Plough
Lepirudín (PR)	Refludan	Hoechst Marion Roussel
Tirotropina alfa PR)	Thyrogen	Genzyme
Factor antihemofílico humano (PR)	Alphanate	Alpha Therapeutic
Follitropina beta (PR, hormona estimulante de folículo)	Follistim	Organon

Vacunas, proteínas, inmunoglobulinas y demás biológicos no recombinantes aprobados por el CBER

Toxoides difteria y Tetánico, vacuna acelular (Vacuna)	DAPTACEL	Aventis Pasteur
Digoxin (Fracción Fab anticuerpo ovino)	DigiFab	Protherics Inc.
Inmunoglobulina humana	Nabi-HB	Nabi
BCG	PACIS	BioChem Pharma
Anticrotálido (Fracción Fab anticuerpo)	Crofab	Protherics

2001	Descompensación aguda de corazón	13
2000	Diabetes tipo 2	13
2000	Tratamiento de leucemia mieloide aguda positiva CD33	5
2000	*Diabetes mellitus*	17
2000	Infertilidad en mujeres	1
1999	Deficiencia de hormona de crecimiento pediátrico	13
1998	Infertilidad en hombres y mujeres	
1998	Hepatitis C crónica	13
1998	Anticoagulación en heparin-trombocitopenia inducida y desórdenes trombóticos	
1998	Diagnóstico *in vivo* para detectar tiroglobulina en suero	17
1997	Hemofilia A o deficiencia adquirida del factor VII	
1997	Tratamiento de infertilidad	13
2002	Inmunización activa contra difteria, tétanos pertussis y pertussis	
2001	Toxicidad y sobre dosis de digoxina	14, 16
2001	Exposición aguda a antígeno de superficie de hepatitis B	15
2000	Carcinoma	
2000	Envenenamiento por crotálidos	14

Toxina Botullinum Tipo B	MYOBLOC	Elan Pharmaceuticals
Interferon α-n1 linfoblastoide (Glicoproteína)	Wellferon	Wellcome
Factor antihemofílico/von Willebrand (Humano)	Humate-P	Centeno Pharma
Toxoides difteria y tetánico, vacuna pertussis acelular	CERTIVA	North American Vaccine
Toxoide difteria		Stantens Seruminstitut
Toxoide tetánico		Stantens Seruminstitut
Vacuna Rotovarus, tetravalente	RotaShield	Wyeth
Globulina Anti-Timocito (Inmunoglobulina de conejo)	Thymo-globulin	Pasteur Meriex
Toxoides difteria y tetánico,		Chiron Behring
Toxoides difteria y tetánico, vacuna pertussis	Infanrix	SmithKline Beecham
Toxoides difteria y tetánico, Vacuna contra rabia	RabAvert	Connaught Labs Chiron Behring

Sistemas de diagnóstico y otros dispositivos y servicios

Ensayo HIV-1/HCV	Procleix	Gen-Probe
Virus Hepatitis C	COBAS AmpliScreen HCV	Roche Molecular Systems
Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1	COBAS AmpliScreen HIV -1	Roche Molecular Systems
Ensayo de virus de hepatitis C por reacción en cadena de polimerasa transcriptasa reversa	UltraQual HCV RT-RNA de HCV PCR	National Genetics Institute
Ensayo de inmudodeficiencia humana Tipo 1 por reacción en cadena de polimerasa	UltraQual HIV-1 RT-PCR	National Genetics Institute
Anti-A (AcM murino)	ID Micro Typing Systems	Micro Typing Systems
Anti-B	ID Micro	Micro Typing

2000	Distonia cervical	
1999	Hepatitis C crónica	2
1999	Tratamiento de hemofilia A	15
1998	Inmunización activa contra difteria, tétanos	
1998	Inmunización activa contra difteria y pertussis	
1998	Inmunización activa contra tétanos	
1998	Inmunización activa contra rotavirus	7
1998	Rechazo renal agudo; inmunosupresor	18
1997	Inmunización activa contra difteria y tétanos	
1997	Inmunización primaria de infantes	
1997	Inmunización de infantes y niños	
1997	Inmunización contra rabia	
2002	Detección cualitativa del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 y/o RNA virus de hepatitis C	
2002	Detección *in vitro* de RNA de HCV	
2002	Detección *in vitro* de RNA de HCV	
2001	Análisis de ácidos nucleicos para detectar RNA de HIV-1	
2000	Detección *in vitro* de antígeno A	19
2000	Detección *in vitro* de antígeno B	20

Anti-A y B (AcM murino)	ID Micro Typing Systems	Micro Typing Systems
Anti-D (AcM humano)	ID Micro Typing Systems	Micro Typing Systems
Antígeno HTLV-1 p21E Humanos	HTLV-I p21E	Organon Teknika
MicroELISA	Vironostika HTLV-I y II	Organon Teknika
Aislante de Fibrina	Tisseel VH Kit	Osterreichisches Inst. Fur Haemoderivate Ges.
Inmunoensayo para detectar virus T-linfotrófico humano tipo I y II (AcM)	Abbott HTLV-I/ HTLV-II EIA	Abbott
Cultivo autólogo de controcitos	Carticel SM Service	Genzyme Tissue Repair

A*, Año de la primera aprobación.
B*, Célula hospedera: 1, células CHO (ovario de hamster chino); 2, línea celular linfoblastoide hu te; 5, línea celular NSO recombinante; 6, línea celular SP2/0; 7, línea celular FRhL-2; 8, fibro infectados; 11, hibridomas murinos; 12, células de mamífero; 13, *E. coli* recombinante; 14, suero de dificada genéticamente; 18, IgG de conejo; 19, anticuerpo monoclonal derivado de la línea celular derivado de la líneas celulares ES-15 y ES-4; 22, anticuerpo monoclonal derivado de la línea celular gre humana y sus componentes aprobados por el CBER: 2003 (0); 2002 (1); 2001 (6); 2000 (2);1999

2000	Detección *in vitro* de antígeno A y B	21
2000	Detección *in vitro* de antígeno D	22
1998	Detección virus T- linfotrópico humano tipos I y II	
1998	Detección de anticuerpos de HTLV-I y II	
1998	Control de hemorragias y efectos de cirugías cardiovasculares o en abdomen	
1997	Inmunoensayo enzimático para detectar virus T-linfotrófico humano tipo I y II	10
1997	Reparación de defectos cartilaginosos	9

mana; 3, células de riñón de hamster bebé (BHK); 4, línea celular de mieloma murino recombinan-
blastos diploides de humano MRC-5; 9, condrocitos; 10, linfocitos T y B humanos crónicamente
ovejas y digestión de papaína; 15, obtenido de plasma; 16, digestón de papaína; 17, *S. cerevisiae* mo-
BIRMA-1; 20, anticuerpo monoclonal derivado de la línea celular LB-2; 21, anticuerpo monoclonal
MS-201; 23, *Micromonospora echinospora* sp. *calichensis.caliceamicina*) Productos derivados de san-
(16); 1998 (16); 1997 (18); Total (59).

pilación de productos farmacéuticos recombinantes anteriores a 1997 se puede consultar en Ramírez *et al.* (6), Ramírez (7) y Walsh (8). Es interesante notar que de los productos aprobados entre 1997 y 2003 por el Centro de Evaluación e Investigación de Biológicos (CBER, por sus siglas en inglés) de la FDA, excluyendo la sangre y sus derivados, aproximadamente la mitad fueron proteínas recombinantes o anticuerpos monoclonales, 54% correspondieron a productos terapéuticos, 23% a profilácticos y 23% a estuches y dispositivos de diagnóstico *in vitro* (tabla 1). Asimismo, es posible apreciar que once anticuerpos monoclonales ya han sido aprobados para terapia y muchos más se encuentran en desarrollo, lo que indica que se han empezado a cumplir las expectativas que generaron hacia principios de 1980 pero cuyo impacto sólo se había dado en el área del diagnóstico. También es de llamar la atención que, además de sangre y sus derivados, ya aparecen servicios concernientes a la expansión de células humanas para transplantes heterólogos y proteínas recombinantes para aplicaciones de diagnóstico *in vivo*.

En conjunto, el mercado mundial de los productos farmacéuticos de uso humano derivados de la biotecnología moderna rebasa los 40 000 millones de dólares (de éstos, en el orden de 28 000 millones corresponden al mercado estadunidense), valor que representa aproximadamente 10% del total de la industria farmacéutica (3, 4, 8). Además, el crecimiento anual es del orden de 14%, lo que supera entre dos y tres veces el crecimiento del sector farmacéutico en general (7). La magnitud y crecimiento del sector se pueden apreciar simplemente de los ingresos obtenidos por las cinco empresas biotecnológicas norteamericanas más importantes (Genentech, Amgen, Biogen, Chiron y Genzyme) durante los últimos 20 años (figura 2). Se puede observar que la suma de los ingresos de estas cinco compañías ha aumentado continuamente desde 1980, ascendiendo a más de 9 300 millones de dólares para el año 2001 (3). Tal cifra indica que solamente estas cinco compañías norteamericanas poseen alrededor de una quinta parte del mercado mundial del área. En cuanto al impacto sobre la generación de empleos directos, la biotecnología farmacéutica moderna no se caracteriza por ser una industria intensiva en mano de obra. Por ejemplo, en EUA existían en el año 2001 alrededor de 1 460 empresas biofarmacéuticas que empleaban alrededor de 191 000 empleados (3, 4). A su vez, datos del año 2000 indican que en la Unión Europea existían 1 570 empresas en donde laboraban 65 000 empleados (9). Esto significa que el tamaño promedio de las empresas biofarmacéuticas es de entre 40 y 130 empleados. Si bien esta rama de la

actividad industrial no genera una gran cantidad de empleos directos, los empleos indirectos generados sí son apreciables. Además, los recursos humanos requeridos son de una muy alta especialización, lo cual es una característica que distingue a las empresas generadoras de riquezas y a los países económicamente desarrollados. Otra característica notable de la industria biofarmacéutica es el muy elevado porcentaje de las ventas que es dedicado a investigación y desarrollo. Por ejemplo, en EUA tal porcentaje llega a ser de 20% en promedio, es decir, unas cinco veces mayor de lo que la industria en general de aquel país invierte en investigación y desarrollo. Solamente en el año 2000 los gastos de EUA y la Unión Europea destinados a investigación y desarrollo de biofarmacéuticos fueron aproximadamente de 11 300 y 5 000 mil millones de dólares, respectivamente. Una discusión más detallada sobre la situación y características de la industria farmacéutica en biotecnología moderna, tanto internacional como nacional, se describe en Ramírez (7).

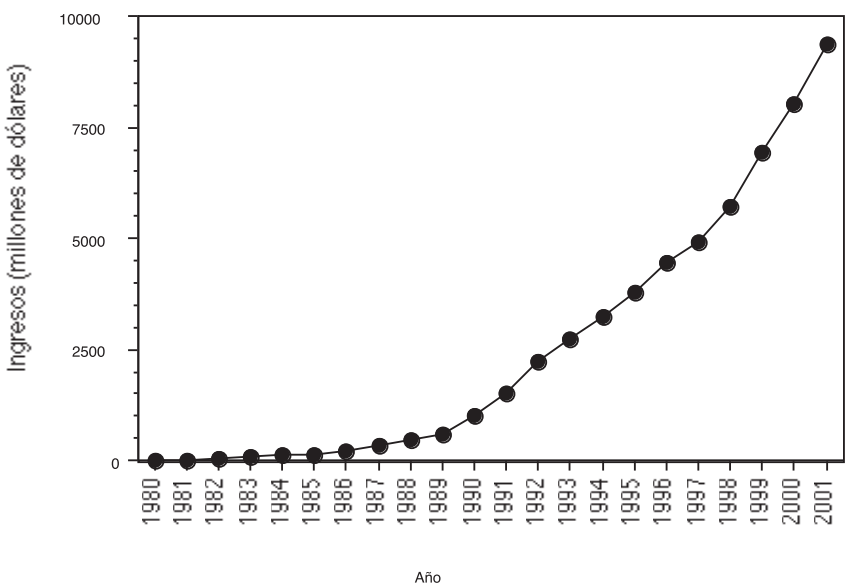


Figura 2

LAS EMPRESAS NORTEAMERICANAS MÁS IMPORTANTES

Ingresos obtenidos por las cinco empresas biotecnológicas norteamericanas más importantes durante los últimos 20 años: Genentech, Amgen, Biogen, Chiron y Genzyme (adaptado de (3)).

Todos los datos anteriores indican claramente que la biotecnología no solamente ha sido un instrumento eficaz para mejorar la salud y calidad de vida humana, sino que ha sido también un factor clave de generación de riqueza para compañías y bienestar para países que han sabido explotarla a través de productos de alto valor agregado. Desafortunadamente, para nuestro país los beneficios tanto médicos como económicos de la biotecnología farmacéutica se han concentrado fundamentalmente en países desarrollados (7). No obstante, la biotecnología puede ser un factor particularmente determinante para mejorar la salud de los habitantes de países en desarrollo, tal como se concluye en un reporte preparado por distinguidos científicos de diversas partes del mundo (10). Es interesante señalar que en dicho reporte, ocho de las diez biotecnologías más importantes para mejorar la salud en países en desarrollo son materia de las industrias biofarmacéuticas. En particular es de destacarse que la producción de vacunas recombinantes y proteínas terapéuticas recombinantes son dos de las diez biotecnologías mencionadas. Como se detallará en las siguientes secciones, es precisamente la producción de proteínas terapéuticas y vacunas recombinantes el área en la que ha incursionado Probiomed S.A. de C.V., el caso de éxito nacional descrito en la presente contribución.

Tendencias en biotecnología farmacéutica relevantes para el caso Probiomed

Resulta indispensable entender ciertas tendencias y circunstancias de la industria biofarmacéutica internacional y nacional antes de abordar el caso Probiomed en detalle. En primer lugar, es importante advertir que las primeras proteínas recombinantes terapéuticas fueron aprobadas en el mundo hace más de 20 años (6, 7, 8, 11). Esto significa que al igual que en otras tecnologías, existen productos de la biotecnología moderna cuyo ciclo de vida ha entrado a una etapa de madurez la cual se caracteriza por el vencimiento de patentes, la reducción de precios y la aparición de nuevos competidores (7, 12, 13). Consecuentemente, empieza a surgir un mercado importante de biogenéricos, tal y como existe en los productos farmacéuticos tradicionales. De hecho, la industria de medicamentos genéricos ha experimentado un crecimiento dramático (14). Solamente en EUA, la penetración de medicamentos genéricos en el

mercado creció de 19% a 47% entre 1984 y 2000 (2). Porcentajes similares existen en otros mercados del mundo. De tal forma, es de esperarse que en algunos años tal tendencia se repita también para los medicamentos biotecnológicos. Por otro lado, el desarrollo de nuevas moléculas terapéuticas o profilácticas es un proceso muy tardado y costoso, que puede exceder 10 años y 800 millones de dólares, respectivamente (2). Dado el tamaño del sector farmacéutico nacional en general y el de las empresas farmacéuticas mexicanas en particular (ver Ramírez (7) para una discusión detallada al respecto), resulta improbable que una compañía mexicana tenga la capacidad financiera para llevar a cabo todo el proceso de desarrollo de un medicamento, desde su descubrimiento hasta la introducción en el mercado. Es por eso que una de las rutas para que la industria mexicana pueda entrar de lleno a la biotecnología moderna es en la medida en que pueda mejorar y especializar la tecnología recombinante existente (7). Tal es el camino que inicialmente siguió Probiomed y que ha colocado a la empresa en la capacidad de iniciar el desarrollo de productos innovadores propios.

De la tabla 1 es interesante notar que la mayoría de los productos recombinantes recientes son producidos por cultivo de células animales (15), en particular células de ovarios de hamsters chinos (CHO, por sus siglas en inglés). El otro hospedero particularmente empleado es la bacteria *Escherichia coli*. Como se verá más adelante, son precisamente estos hospederos en los que Probiomed tiene gran parte de su experiencia y en los que se basan las tecnologías para producir la mayoría de las proteínas terapéuticas recombinantes que actualmente tiene en el mercado. Esta plataforma tecnológica le permite a Probiomed cubrir, en principio, los productos más importantes del campo además de conferirle una gran versatilidad y competitividad. Una tendencia preocupante que se percibe en los productos biofarmacéuticos (tabla 1), es que las grandes empresas farmacéuticas transnacionales están logrando la aprobación de patentes de productos que no representan innovaciones sustanciales sino simplemente versiones modificadas de moléculas conocidas y previamente patentadas. Por ejemplo, el caso de derivatizar con polietilenglicol proteínas o cambiar algún aminoácido de la secuencia peptídica. Una tendencia similar se ha dado también en medicamentos farmacéuticos no biotecnológicos (14). Esto, aunado a la extensión de patentes por ampliación de vigencia y de nuevos usos puede representar un obstáculo importante para el desarrollo de empresas biotecnológicas mo-

dernas en países en desarrollo (7), particularmente en México. Una discusión más detallada del entorno nacional y sugerencias para fomentar la biotecnología farmacéutica moderna en México se discuten en Ramírez (7) como una vía para propiciar más empresas como Probiomed y apoyar los contados casos de éxito que ya existen.

Probiomed S.A. de C.V.

Probiomed S.A. de C.V. es la primera y hasta el momento la única empresa mexicana que ha incursionado en la producción de proteínas recombinantes para uso terapéutico en humanos, integrando todos sus procesos desde el diseño, aislamiento y modificación del gene y su transformación en células recombinantes, pasando por la elaboración del principio activo o materia prima (farmoquímico) hasta terminar los procesos con los medicamentos o formas farmacéuticas. En sus orígenes, Probiomed nace como filial del grupo farmacéutico Proquifin S.A. de C.V., fundado en 1970 y cuyo propósito era fabricar materias primas a granel para la industria farmacéutica (figura 3). Los primeros productos que Proquifin elaboró, tanto para el mercado nacional como para el extranjero, fueron la heparina, amikacina, vitamina B12 y cloramfenicol (figura 3). Debe notarse que algunos de estos productos son derivados de la biotecnología clásica, por lo que ya desde sus inicios Proquifin establece cimientos en este campo. En 1986 se inicia un programa de integración vertical que llevaría a la empresa a la producción desde farmoquímicos a granel hasta la elaboración final de medicamentos.

En la década de los ochentas la industria farmacéutica mexicana en general quedó sumergida en una severa crisis que resultó en una creciente desintegración del sector farmoquímico nacional y una acelerada desaparición de empresas (7, 16). Tal crisis surge, en buena medida, por dos causas principales. La más importante fue el incremento en la corrupción relacionada con las adquisiciones de medicamentos por el sector público, ya que propició la importación de productos farmoquímicos que simulaban tener contenido nacional. El abuso de la simulación llegó al extremo de que genéricos o farmoquímicos importados obtenían el grado de integración nacional simplemente por la realización de operaciones triviales, tales como el etiquetado, cuando la Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público establece claramente que

Figura 3

LA BIOTECNOLOGÍA EN MÉXICO

Fotografía de las instalaciones de la planta original de Proquifin en Tenancingo, Estado de México. A, vista aérea; B, vista de planta original productora de farmoquímicos.

para que un producto se considere fabricado en México se requiere una transformación sustancial, lo cual no se cumple en los casos en que el farmoquímico se importa. Desafortunadamente vestigios de esta práctica continúan hasta la fecha en detrimento de la integración de cadenas productivas. La segunda razón de la mencionada crisis fueron los decrecientes márgenes de ganancia obtenidos de productos farmoquímicos tradicionales debido principalmente a la competencia desleal de productos del exterior, particularmente chinos y del sudeste asiático, propiciada por la apertura comercial de nuestro país. Para hacer frente a tal situación, Proquifin, ahora Probiomed, orientó hacia finales de los ochenta estrategias para generar productos de mayor valor agregado e integración nacional, por lo que vio en la "nueva biotecnología" la mejor opción para mantenerse en un mercado, nacional y extranjero, cada vez más competido. En 1987 se publicó un decreto presidencial en el que se estableció un plazo de diez años para que empresas ubicadas en México pudieran desarrollar productos o procesos con la seguridad de no tener problemas de propiedad intelectual. En México no eran patentables, entre otros, los medicamentos. A raíz de este decreto y basado en el mismo, Probiomed inició el desarrollo de proteínas basadas en la tecnología del DNA recombinante, entrando de esta manera en el fascinante mundo de la biotecnología moderna (7, 12). Se inició de inmediato el desarrollo de la tecnología para producir los interferones alfa, la eritropoyetina, el molgramostim y el filgrastim. Sin embargo, en 1991 se publicó una nueva la Ley de Propiedad Intelectual, por lo que a partir de esa fecha se permiten las patentes de productos farmacéuticos y sus procesos, en algunos casos dando efectos retroactivos a la patente hasta por 10 años. Así, se borra de un plumazo el decreto anteriormente mencionado. No obstante, Probiomed decidió seguir el desarrollo de estas tecnologías por dos razones principales: la primera porque llevaba tres años de intenso trabajo con promisorias perspectivas y la segunda porque cualquier patente que se otorgara de esos productos sería ilegal y fácilmente anulable. A pesar de estas consideraciones, Probiomed ha tenido que pelear patentes otorgadas indebidamente en los productos antes mencionados.

Entre las estrategias emprendidas por Probiomed desde sus inicios se encuentra el establecimiento de una fuerte vinculación con el sector

científico y académico del país. En particular con el Instituto de Biotecnología de la UNAM y el Centro de Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). Asimismo, se establecieron vínculos con investigadores y compañías especializadas de varios países. Por todo el avance logrado, Probiomed lanza al mercado mexicano cuatro proteínas recombinantes terapéuticas humanas hacia finales de los noventas: interferón alfa 2a, interferón alfa 2b, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y eritropoyetina. A tal lista se han agregado recientemente el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) y la vacuna de hepatitis B, ambos productos recombinantes. Adicionalmente se tiene ya el desarrollo a nivel farmacéutico de la insulina humana recombinante y se encuentra en etapa final la tecnología a nivel piloto para la producción de la materia prima. En la tabla 2 se muestra un resumen de los productos de biotecnología del DNA recombinante que Probiomed tiene actualmente en el mercado (ver también figura 4). Estas proteínas tienen en México un mercado superior a los 20 millones de dólares y se encuentran entre los productos biotecnológicos de mayor mercado mundial. Debe notarse que tales medicamentos, así como otras proteínas recombinantes terapéuticas, se han venido comercializando en México por compañías transnacionales o laboratorios mexicanos, aunque en estos casos los medicamentos se importan totalmente terminados y en algunos de ellos se realizan algunas operaciones triviales de acondicionamiento.

Plataformas tecnológicas

Buena parte del éxito de Probiomed se debe a la estrategia de innovación en los bioprocesos. Como columna vertebral del acervo tecnológico de Probiomed se encuentran las "plataformas tecnológicas" que están constituidas por colecciones de técnicas y etapas productivas aplicables a distintas proteínas afines. En la actualidad se cuenta con tres sistemas principales de expresión: *Escherichia coli, Hansenula polymorpha* y células animales. Con estos tres sistemas se cubre un abanico amplio de hospederos, desde procariontes y eucariontes inferiores hasta células de eucariotes superiores. Estas plataformas otorgan la capacidad de producir

Tab
PRODUCTOS TERAPÉUTICOS Y PR
DE PROBIOMED S. A. DE

Producto	*Nombre comercial*	*Forma farmacéutica y presentación*
Interferón α-2a	PROQUIFERON	3, 4.5 y 9 millones de UI
Interferón α-2b	URIFRON	3, 5 y 10 millones de UI
Molgramostim (rHuGM-CSF)	GRAMAL	150 mg, 300 mg y 400 mg
Filgrastim (RHuG-CSF)	FILATIL	300 µg
Eritropoyetina	BIOYETIN	1000 UI, 2000 UI y 4000 UI
Vacuna Hepatitis B	PROBIVAC	10 µg, 20 µg
Insulina humana	PRODIABIN-N	1000 UI

* Actualmente en desarrollo la forma farmoquímica, forma farmacéutica ya registrada.

Indicación	*Hospedero*
Terapia contra Leucemia de células velludas, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi asociado a SIDA y melanoma maligno. Tratamiento de hepatitis B y C.	*E. coli*
Potencializa favorablemente la acción de fármacos utilizados en la terapia contra cáncer y el SIDA. Indicado como agente único o asociado a quimioterapia en hepatitis crónica activa por virus tipo B y C, condiloma acuminado, leucemia de células velludas, mieloma múltiple, melanoma maligno y Sarcoma de Kaposi asociado con SIDA.	*E. coli*
Promueve y acelera la recuperación de la médula ósea en pacientes en tratamiento con quimioterapia citotóxica, en radioterapia, en transplante de médula ósea, con defectos de la hematopoyesis, con infección y neutropenia.	*E. coli*
En casos donde se administra quimioterapia citotóxica d de enfermedades malignas no mieloides	*E. coli*
Promueve la recuperación de los glóbulos rojos en las anemias asociadas a deficiencias de eritropoyetina en pacientes con insuficiencia renal crónica, infección por VIH y condiciones malignas	Células de mamífero (CHO)
Inmunización contra la infección del virus de la hepatitis B.	*Hansenula polymorpha*
Tratamiento de diabetes insulinodependiente	*

Figura 4

PRODUCTOS DE PROBIOMED EN EL ÁREA BIOTECNOLÓGICA

Presentación al público de algunos de los productos farmacéuticos de Probiomed basados en proteínas recombinantes.

proteínas recombinantes relativamente complejas, como aquellas que se acumulan en cuerpos de inclusión o aquellas que constituyen pseudopartículas virales, hasta proteínas muy sofisticadas como glicoproteínas con modificaciones postraduccionales complejas. Por ejemplo, en el caso de los interferones y los factores estimuladores de crecimiento (tabla 2), se aprovechan en muchos casos estrategias comunes para la construcción y diseño de vectores de expresión en *E. coli* así como estrategias de fermentación y purificación. De tal forma, es posible depurar cada etapa, como por ejemplo la ruptura celular y extracción de cuerpos de

inclusión, y utilizar ese conocimiento y experiencia en varios productos. Este acercamiento modular permite gran flexibilidad además de la integración eficaz y rápida de nuevos procesos necesarios durante el desarrollo, escalamiento y producción de nuevas proteínas con características afines a las mostradas en la tabla 2. La prueba más evidente de la efectividad de esta estrategia se refleja en la velocidad con la que Probiomed ha desarrollado e introducido al mercado un número importante de proteínas recombinantes en un periodo muy corto, inclusive para estándares internacionales.

En la figura 5 se ilustra el proceso de producción de molgramostim (factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos) como muestra de la plataforma tecnológica basada en la expresión por *E. coli* recombinante. Algunos aspectos relevantes que se pueden subrayar sobre esta plataforma son: una inducción de proteína heteróloga a altos niveles sin la necesidad de agregar inductores químicos exógenos; y una etapa de fermentación de alta productividad sin que sea necesaria la adición de antibióticos como agentes de presión selectiva. Estas características no solamente resultan en un proceso más sencillo, de control robusto y alta reproducibilidad, sino que también generan productos sin aditivos indeseables que son difíciles de remover y que pudieran acabar contaminando los efluentes de desecho del bioproceso. A su vez, en la figura 6 se muestra la producción de eritropoyetina recombinante humana por cultivo de células de ovarios de hamster chinos (o CHO por sus siglas en inglés), como ejemplo de la plataforma tecnológica basada en la expresión de células animales. En este caso debe resaltarse que se trata de un modelo de expresión muy sofisticado, delicado y complejo. No obstante, mediante el sistema de cultivo altamente automatizado y computarizado es posible obtener altas concentraciones celulares y una cosecha continua de medio conteniendo la glicoproteína de interés. Mediante la plataforma desarrollada se minimizan los trenes de propagación de inóculo, las manipulaciones del cultivo por el operario y se minimiza la escala de operación. Asimismo, el tren de purificación es elegante y sencillo, resultando un producto con alta actividad específica.

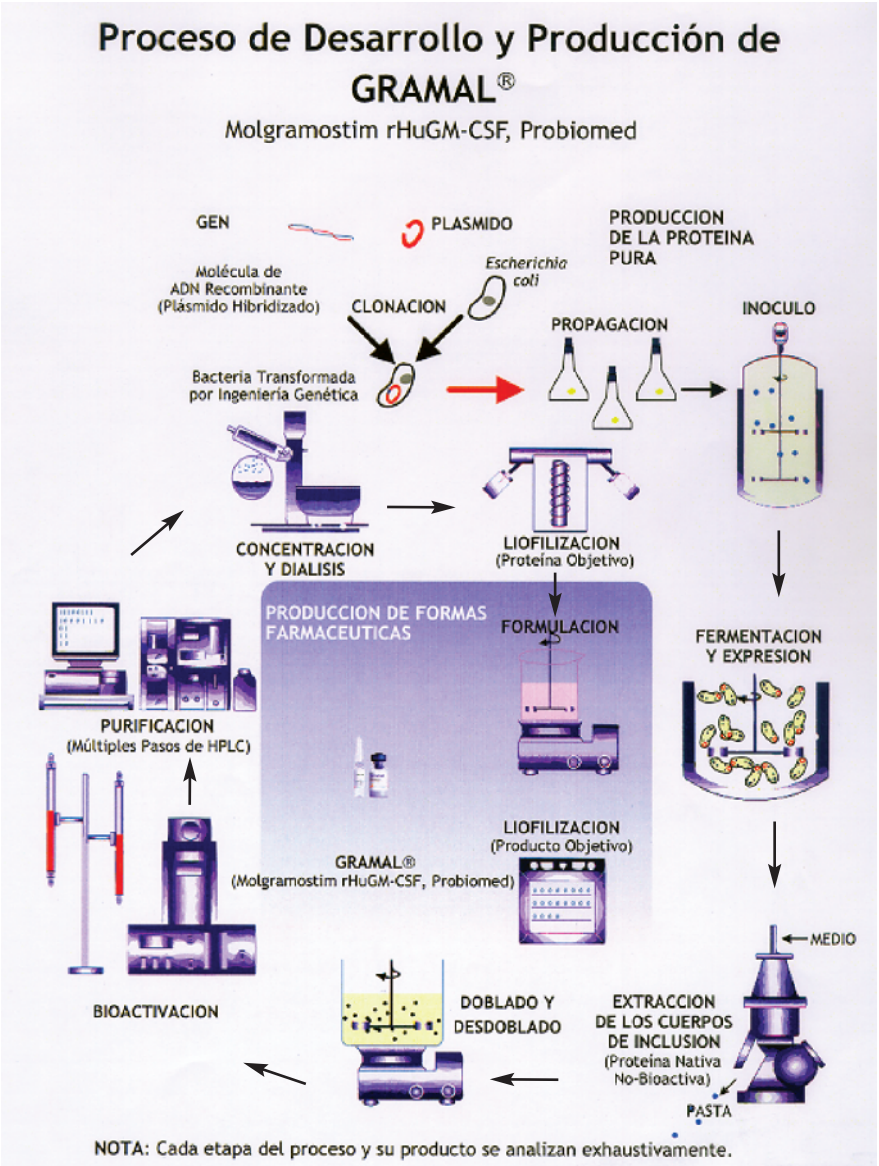


Figura 5

PROCESO DE PRODUCCIÓN DE MOLGRAMOSTIM

Proceso típico de Probiomed para la producción de una proteína recombinante basada en la plataforma tecnológica de expresión en *Escherichia coli*.

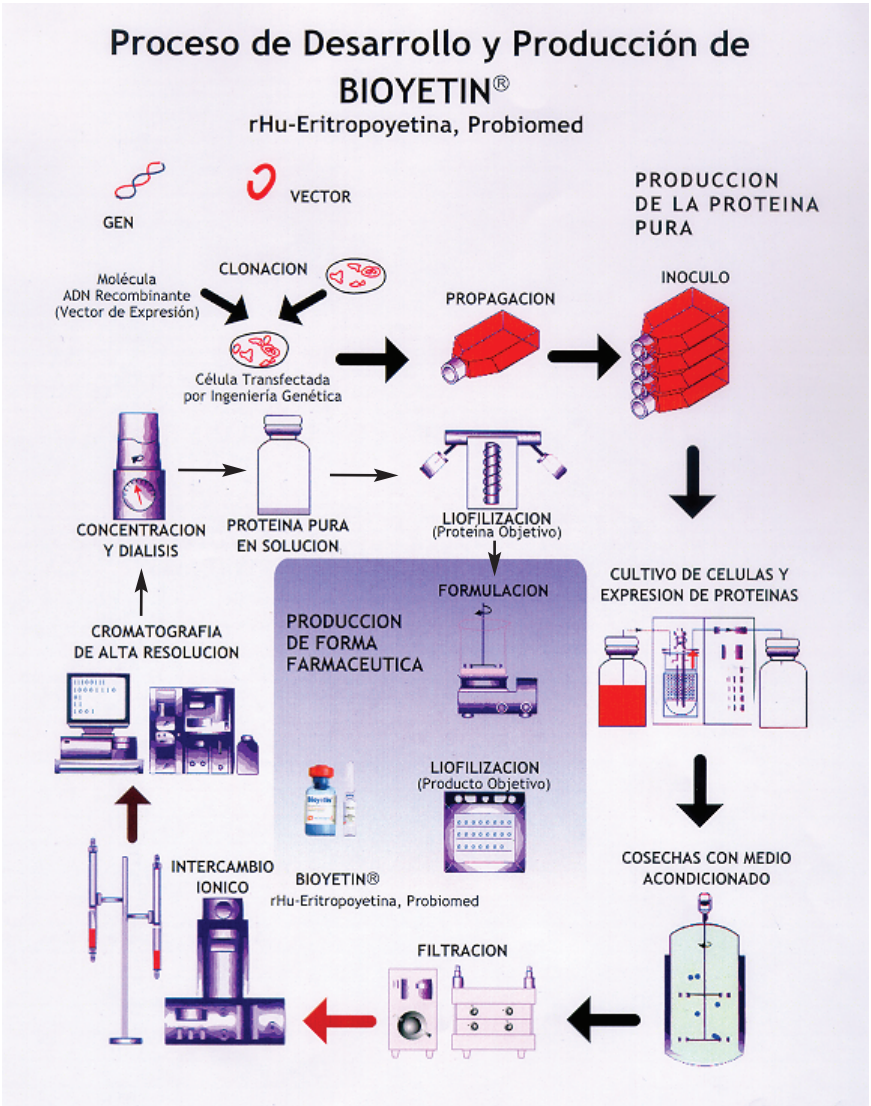


Figura 6

PRODUCCIÓN DE ERITROPOYETINA

Proceso típico de Probiomed para la producción de una proteína recombinante basada en su plataforma tecnológica de expresión en células de mamífero. Se muestra el caso para la producción de glicoproteínas a partir de células CHO (de ovarios de hamster chinos).

Las plataformas tecnológicas de bioprocesos mencionadas no terminan con el producto farmoquímico sino que están completamente integradas desde la clona celular recombinante hasta la formulación farmacéutica final del medicamento. Es por eso que otros dos elementos esenciales de la estrategia y patrimonio tecnológico de Probiomed son la tecnología de producto y la tecnología de operación, en que se integran metodología analítica y buenas prácticas de fabricación (o GMP por sus siglas en inglés) en cada una de las etapas del proceso para asegurar y controlar la calidad de los productos generados. Estos dos elementos surgen del conocimiento específico de las peculiaridades de cada proteína y del apego estricto a normas y disposiciones regulatorias. Al tratarse de productos de biotecnología moderna, muchas técnicas analíticas, como por ejemplo ensayos de potencia *in vivo* e *in vitro,* determinación de pureza, fidelidad de glicoformas, y muchas otras, han sido desarrolladas e incorporadas como parte del patrimonio tecnológico de Probiomed. Debe notarse que el desarrollo y dominio de tales metodologías analíticas, empleadas en las propias instalaciones productivas, constituyen por sí solas un acervo biotecnológico que muy pocas (si no es que ninguna) empresas farmacéuticas en México poseen. En cuanto a la operación de bioprocesos, la característica común es la alta automatización y apego estricto a procedimientos normalizados de operación, lo que garantiza una alta reproducibilidad y robustez de los procesos.

Un cuarto elemento central de la empresa ha sido la gestación de capacidades propias en aspectos de ingeniería de proyectos para el desarrollo de la ingeniería básica y de detalle en diseño, dimensionamiento, construcción, puesta en operación y mantenimiento de equipos e instalaciones. De esta forma, un caso hasta ahora único en México fue el diseño y construcción por la propia empresa de una planta multipropósitos/multiproductos de medicamentos basados en la tecnología del DNA recombinante, la cual es moderna, eficiente, confiable y de un alto nivel de autonomía tecnológica, además de cumplir con las exigencias internacionales en cuanto a GMP's. Algunas características sobresalientes del diseño de la planta de manufactura y los laboratorios asociados de control y aseguramiento de la calidad son: contención biológica de los sistemas de expresión para evitar cualquier liberación hacia el ambiente; salas de producción aisladas del exterior para evitar contaminaciones al proceso; segregación de zonas mediante pasillos limpios; prevención de contaminaciones cruzadas mediante diseño adecuado de flujos de materiales, productos y personas; zonas de servicios, plafones y sótanos técni-

cos segregados de las áreas de producción; manejadoras de aire dedicadas para zonas críticas; especificaciones y materiales de equipos y los diversos acabados que garantizan una limpieza efectiva; elevada automatización; seguridad y protección absoluta a los operarios; y no contaminante, por mencionar sólo algunas. Las figuras 7 a 9 muestran distintos aspectos de los laboratorios de control de calidad y planta de manufactura de proteínas recombinantes de Probiomed. Pensamos que esta planta representa un verdadero hito para el país, ya que es la primera en su tipo y cuya puesta en operación representó abrir nuevos paradigmas nacionales no solamente tecnológicos sino también en otros ámbitos que se discuten más adelante. La capacidad en ingeniería básica y de detalle también ha sido aprovechada para el diseño y construcción de equipos *sui generis,* como por ejemplo cámaras hipobáricas para estudios de potencia *in vivo* o biorreactores especializados para el cultivo de células animales.

Figura 7

INTERIOR DE LA PLANTA DE PROBIOMED

Vista de una de las salas de extracción de cuerpos de inclusión.

Figura 8

PROBIOMED

Vista de una sala de purificación.

Figura 9

CONTROL DE PROCESOS EN PROBIOMED

Vista de un laboratorio de investigación y desarrollo; se muestran prototipos experimentales para el escalamiento de etapas cromatográficas.

Un aspecto medular y estratégico de Probiomed ha sido el establecimiento, desde sus inicios, de grupos de investigación y desarrollo. Actualmente la empresa cuenta con dos nuevos laboratorios de investigación y desarrollo, uno en su planta de Azcapotzalco en el D. F., y otro en la planta de Tenancingo, Estado de México. Asimismo, en la planta de Tenancingo se diseñó y construyó una planta piloto especializada en bioprocesos con capacidad de fermentación y cultivo de distintos organismos así como de purificación de una gama de proteínas recombinantes. Solamente en estos laboratorios y planta piloto laboran actualmente 30 profesionistas, de los cuales 40% cuentan con maestrías o doctorados. Aunado a lo anterior, se cuenta con una dirección médica encargada de coordinar y realizar estudios clínicos de las proteínas terapéuticas en colaboración con hospitales e instituciones mexicanas de salud. La plantilla de investigadores está conformada por científicos jóvenes guiados por científicos mexicanos y extranjeros consolidados y de amplia experiencia en diversas disciplinas de la biotecnología. Además, se cuenta con la asesoría de expertos que laboran en universidades, hospitales y compañías especializadas tanto mexicanas como extranjeras y el apoyo de los laboratorios de control y aseguramiento de la calidad y del bioterio de la propia empresa. De tal forma, se ha establecido una red robusta de intercambio de información y experiencias que le otorgan a la empresa capacidades y competencias tecnológicas claves en las siguientes disciplinas: química, ingeniería, biotecnología, ingeniería genética, bioingeniería, farmacia, biología, microbiología, veterinaria, e investigación clínica y analítica. (figura 10)

El establecimiento del laboratorio de investigación y la planta piloto en Tenancingo, constituye el primer esfuerzo de un ambicioso proyecto para desarrollar un “bioparque” tecnológico en la zona. Este parque está concebido como un espacio en el que científicos del más alto nivel desarrollen investigación aplicada en el campo de la biotecnología moderna en general y teniendo como ancla el laboratorio de investigación y desarrollo de Probiomed y una planta ultramoderna para la fabricación de proteínas recombinantes cuya construcción inició a finales del 2003.

Un ejemplo del esfuerzo en investigación y desarrollo que se está realizando en Probiomed son los diez proyectos de investigación que se están llevando a cabo en el área de vacunas y que se listan a continuación:

Vacuna contra la hepatitis C.
Vacuna contra la hepatitis E.
Desarrollo de una vacuna combinada BCG-VHB.
Desarrollo de vacunas múltiples.
Vacuna contra la hepatitis B (VHB) 100% efectiva (modificación principal del HBsAg).
Actualización y cambio de componentes (excepto el HBsAg) de la vacuna contra la hepatitis B.
Optimización de la tecnología de manufactura de la VHB.
Desarrollo de nuevas vacunas recombinantes.
Terapia de portadores de hepatitis B con VHB.
Desarrollo de rutas alternativas para la administración de VHB.

Todos estos proyectos se están realizando con una fuerte vinculación con grupos expertos del extranjero. En Tenancingo, el grupo de científicos qu participan en estos proyectos es multicultural.

Otras características distintivas del caso Probiomed

Al ser pionero en la producción de proteínas recombinantes terapéuticas en el país, Probiomed se enfrentó a una serie de circunstancias inéditas en México. En primer lugar, se realizó una intensa labor con autoridades sanitarias nacionales, la cual incluyó capacitación de inspectores y participación en la elaboración de normas y reglamentos para la regulación de la producción de biofármacos y biomedicamentos en México. Esto fue necesario ya que hasta antes de Probiomed todos los medicamentos recombinantes se importaban y por ende no existía la necesidad real de regular ni inspeccionar su producción. Igualmente, se trabajó estrechamente con proveedores de insumos especializados y prestadores de servicios nacionales ya que la construcción de las plantas de manufactura y laboratorios de control, así como el arranque de los diversos bioprocesos, demandó en muchas ocasiones servicios y experiencias no disponibles hasta entonces en México. De tal forma, se generó una derrama económica indirecta importante gracias al inicio de operaciones de Probiomed. Se creó además demanda, antes inexistente en la industria, de recursos humanos altamente calificados en diversas especialidades de la biotecnología moderna. Con esto, la relación academia-industria no solamente se dio en los aspectos de desarrollo de capacidades tec-

nológicas, sino también en lo referente a capacitación y formación de personal especializado para la producción industrial. Otra característica relevante de Probiomed radica en haber realizado pruebas clínicas a sus biomedicamentos en hospitales y pacientes mexicanos. Algunos resultados de estos estudios se han presentado en foros internacionales (17-19). Además, la mayoría de las pruebas críticas de control analítico se realiza en las instalaciones de la propia empresa, y solamente algunas pruebas se efectúan en laboratorios externos.

El éxito de probiomed

Las características señaladas, particularmente la integración completa y vertical de los procesos productivos y la colaboración con la academia, han contribuido a que en la actualidad Probiomed pueda competir exitosamente, aunque aún en condiciones de desventaja, con las grandes empresas transnacionales que son mucho más grandes que ella. Los procesos de Probiomed generan los productos mexicanos de mayor valor agregado de todos los sectores productivos. Además, se ha incorporado un número importante de profesionistas con posgrados (maestrías y doctorados) en disciplinas afines a la biotecnología (figura 11 y tabla 3), característica poco usual para cualquier empresa mexicana. El crecimiento vertiginoso de la plantilla laboral refleja el éxito de Probiomed. Como se aprecia en la figura 10, de 1995 a la fecha el número de empleados de Probiomed involucrados directamente en la manufactura de los biofármacos y biomedicamentos, creció de 5 a 170. Si se incluye a los empleados no involucrados en biotecnología, entonces la fuerza laboral de Probiomed asciende a 480. Sus logros han sido reconocidos al haberse hecho acreedora del Premio Nacional de Tecnología 1999. Este premio reconoce varios aspectos, entre ellos, la magnitud, conservación y confiabilidad del patrimonio tecnológico, estrategia tecnológica, orientación a mercados y clientes, desarrollo de recursos humanos, búsqueda y administración de proyectos, buen uso y gestión de recursos tecnológicos y beneficios para la comunidad en la que opera la empresa.

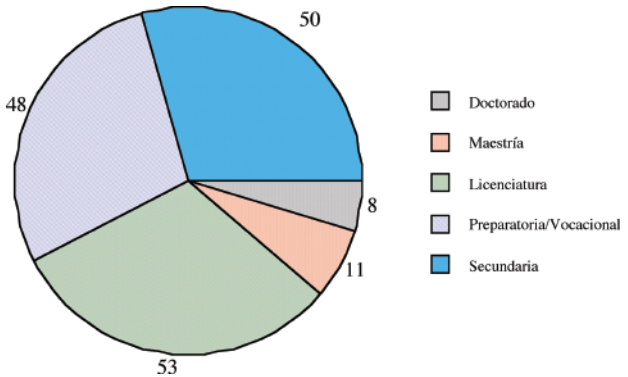


Figura 10

FUERZA DE TRABAJO EN PROBIOMED

Distribución de los empleados de Probiomed laborando en las plantas de biotecnología según su grado de estudios.

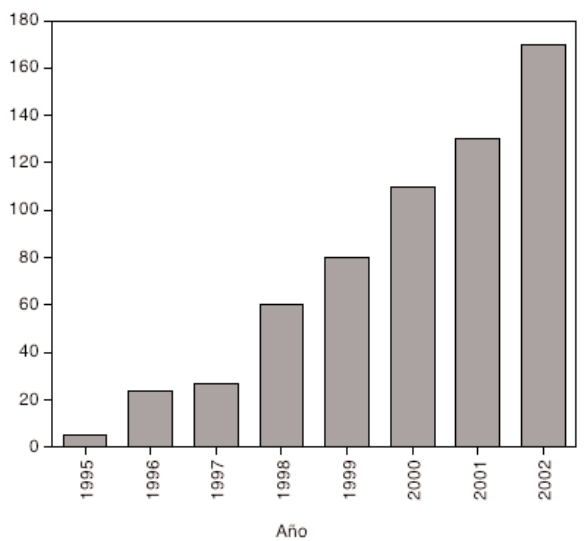


Figura 11

CRECIMIENTO DE PROBIOMED S.A. DE C.V.

Se muestra solamente el número de empleados involucrados en los productos biotecnológicos (plantas de Azcapotzalco y Tenancingo). En enero de 2001 todas las plantas del Grupo Proquifin se fusionaron bajo el nombre de Probiomed. El número total de empleados de todas las plantas Probiomed (incluyendo las que no fabrican productos biotecnológicos) ascendió a 480 en 2002.

Tabla 3

ÁREAS DE ESTUDIO DE LOS EMPLEADOS DE PROBIOMED

Química	5
Ingeniería	4
Biotecnología	19
Farmacia	29
Q.B.P.	6
Biología	1
Veterinaria	1
Administración	7
Preparatoria/Vocacional	48
Secundaria	50

El caso de Probiomed constituye un verdadero hito en la biotecnología farmacéutica moderna mexicana y deberá analizarse cuidadosamente como ejemplo a seguir, ya que se han completado ciclos fundamentales para el desarrollo nacional de alta tecnología. El caso de éxito descrito en este capítulo ha incidido favorable y directamente en la sociedad mexicana con productos de gran valor agregado. Una empresa nacional ha mostrado que es posible vincularse estrechamente con el sector académico para aprovechar conocimientos científicos y recursos humanos generados por la comunidad universitaria mexicana. Ha demostrado también que es posible retomar mercados y competir exitosamente con empresas líderes multinacionales. Como consecuencia, se han generado diversas actividades importantes que antes sólo eran tema de discusión hipotética en nuestro país. Las nuevas actividades emanadas de Probiomed representan un efecto multiplicador de generación de riqueza a través de la elaboración de productos de gran valor agregado originados mediante empleos de alta especialización y altamente remunerados en diversos sectores, lo cual es reflejo fiel de las bondades que la biotecnología moderna puede traer a un país.

1. The Pharmaceutical Industry in Figures - 2002 edition. European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA) (2003). http:// www.efpia.org.
2. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. Pharmaceutical Industry Profile 2002 (2003). http://www.phrma.org.
3. Biotechnology Industry Statistics: Biotechnology - A Consistent Record of Growth. Biotechnology Industry Organization (BIO) (2003). http:// www.bio.org.
4. Biotechnology Industry Statistics: Some Facts About Biotechnology. Biotechnology Industry Organization (BIO) (2003). http://www.bio.org.
5. Biological Licence Application Approvals. Center for Biologics Evaluation and Research, FDA, USA, (2003). http://www.fda.gov/cber.
6. Ramírez O.T, Flores E., Galindo E. Products and bioprocesses based on genetically modified organisms: Review of bioengineering issues and trends in the literature. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology,* 3: 165-197 (1995).
7. Ramírez O.T. Biotecnología y la industria farmacéutica. En: *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: retos y oportunidades;* F. Bolívar (ed.); Conacyt (ISBN 968-823-281-5)/ Fondo de Cultura Económica (ISBN 968-16-6537-6), México D. F., 249-264 (2001/ 2002).
8. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnology* 18: 831-833 (2000).
9. European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA). Annual Report (2003). http://www.efpia.org.
10. Daar S.A., Martin D.K., Nast S., Smith A.C., Singer P.A., Thorsteinsdóttir H. *Top 10 biotechnologies for improving health in developing countries.* University of Toronto Joint Centre for Bioethics (2002).
11. Palomares L.A., Kuri-Breña F., Ramírez O.T. Industrial recombinant protein production. En: The Encyclopedia of Life Support Systems, Topic 6.58.3 Industrial Biotechnology, D. Al Gobaisi (Ed.), EOLSS Publishers Co. LTD., Oxford, UK; Versión electrónica,1-48 (2002).
12. Ramírez O.T., Quintero R. Pharmaceutical biotechnology emerges in Mexico. *Nature Biotechnology* 17: 934 (2000).
13. Dulton G. The waiting game for biogenerics producers. *Genetic and Engineering News* 22: 8-9 (2002).
14. Changing Patterns of Pharmaceutical Innovation: A research report by The National Institute for Health Care Management Research and Educational Foundation; Washington, D.C. (2002). http://www.nihcm.org.
15. Chu L., Robinson D.K. Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 180-187 (2001).

16. Dussel E. *Las industrias farmacéutica y farmoquímica en México y el Distrito Federal.* CEPAL-Gobierno del Distrito Federal, SEDECO (2000).
17. Trueba E., Borbolla J.R., López-Hernández M.A., González-Avante M., Deniego J., Alvarado M.L., Anaya I. Comparison between two formulations of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) used to accelerate neutrophil recovery time in acute leukemia patients. En: *Proceedings of 17th International Cancer Congress.* M. Moraes, R. Brentani y R. Bevilacqua (eds.); Rio de Janeiro, Brasil, 1319-1322 (1998).
18. Muñoz R.A., Treviño B.A., Gordon B.F. *Anemia correction and left ventricular function in patients with end stage renal disease treated with recombinant human erythropoietin.* XVth International Congress of Nephrology and XIth Latinamerican Congress of nephrology, Buenos Aires, Argentina, (1999).
19. López F., Rizo M.T., Ysitia A. Treatment of chronic hepatitis C with recombinant alpha 2b interferon. *Gastroenterology,* 116: 4 L0267 (1999).

CASOS EXITOSOS DE LA TECNOLOGÍA ENZIMÁTICA Y LA BIOCATÁLISIS EN MÉXICO

A. López Munguía Canales

Introducción

Si consideramos los registros de solicitud de patentes como referencia de los inicios de la enzimología industrial, podríamos afirmar que esta actividad se inicia prácticamente con el siglo xx, antes incluso de que se desarrollara la biotecnología industrial. No es sorprendente que los temas que tratan estas patentes estén relacionados con lo que en pleno siglo xx siguen siendo las aplicaciones de enzimas más importantes en el mundo en términos de volumen y de costo. Se trata de las amilasas, cuya producción patentaba en 1894 J. Takamine (1); el tratamiento de pieles con tripsina, patentado por O. Rohm en 1908 (2); la clarificación de cerveza con proteasas vegetales, incluida la papaína usada hasta la fecha, y patentada por L. Wallerstein en 1911 (3), y las aplicaciones de enzimas en lavandería, la más importante aplicación de enzimas proteolíticas hoy en día en el mundo, y cuyo origen puede ubicarse en la patente otorgada a O. Rohm en 1915 (4) sobre el uso de pancreatina en todo tipo de detergentes.

Este inicio de la actividad industrial avanza paralelamente con la bioquímica de enzimas y proteínas, siendo en 1926 que Sumner (5) cristaliza la ureasa, más tarde Northrop la pepsina en 1930 (6) y la tripsina Kunitz y Northrop en 1932 (7). La serendipia había tocado a este sector en 1922 cuando Fleming, adelantándose al descubrimiento de la penicilina, descubrió la lisozima (8) cuando pensó haber descubierto el antibiótico universal que buscaba y que descubriría siete años después. En este caso, aprovechando padecer de un fuerte catarro, logró evitar el crecimiento de *M. lysodeikticus* en cultivo sólido, agregando unas gotas de secreción nasal. Para la segunda mitad del siglo xx estaba clara la naturaleza química de los catalizadores biológicos y existían ya respuestas al problema fundamental de la enzimología consistente en dilucidar el mecanismo de acción de las enzimas, explicando su extremadamente

elevada actividad y su alta especificidad en términos de su estructura. Sin embargo, no es sino hasta los años sesenta en que se desarrolla la producción industrial de enzimas de origen microbiano mediante el cultivo de microorganismos, que la enzimología alcanza verdaderamente el carácter de industrial. Se inicia entonces la producción de proteasas bacterianas, particularmente por la empresa Novo de Dinamarca, enzimas que rápidamente hicieron crecer el sector de los detergentes biológicos al grado de ocupar casi 70% del mercado. Sin embargo fue necesario dar marcha atrás a esta aplicación hasta que pudieron desarrollarse formulados libres de polvo, dado el problema que se suscitó por la reactividad y alergenicidad de las proteasas tanto en trabajadores de las plantas productoras, como en usuarios del detergente. Otras enzimas microbianas alcanzaron rápidamente el nivel industrial dada la alta demanda de los mercados, por lo que las compañías con la infraestructura industrial adecuada y la experiencia en proteasas, rápidamente concentraron la producción. Así sucedió con las enzimas del tipo pectinolítico aplicadas al procesamiento de frutas, los sustitutos microbianos de la quimosina extraída del estómago de las terneras y sobretodo, las alfa-amilasas y glucoamilasas desarrolladas para la producción de jarabes fructosados a partir de almidón de maíz, principalmente. Hace unos 25 años el mercado de las enzimas microbianas generaba ventas anuales por alrededor de 400 millones de dólares, y estaba controlado por dos grandes compañías: Industrias Novo en Dinamarca y Gist Brocades en Holanda, quienes controlaban alrededor de 50 y 20% del mercado, respectivamente. Otras compañías importantes en el sector eran Laboratorios Miles, Pfizer, Rohm y EDC en los Estados Unidos, Amano en Japón, entre otras. Actualmente se estima que la venta anual de enzimas genera utilidades por mas de 1 500 millones de dólares con aplicaciones en muy diversos sectores dentro de los que destacan la industria alimentaria, la química, la farmacéutica y la ambiental. Esto sin tomar en cuenta la producción de enzimas "en casa", es decir, las enzimas que son producidas y empleadas por la misma compañía que comercializa el producto final, para la que no es rentable depender del biocatalizador, ni distribuirlo. Un muy numeroso grupo de medianas y pequeñas compañías ha desaparecido habiendo sido absorbidas por las grandes transnacionales. Incluso el área de enzimas de la empresa Gist Brocades, fue adquirida por la empresa Genencor en los Estados Unidos, creada como consecuencia del desarrollo de la biotecnología moderna aspecto al que nos referiremos más adelante.

Para finales de los setenta, el valor de las importaciones anuales de enzimas en México alcanzaba los 60 millones de pesos, de acuerdo con la fracción arancelaria que existía para el rubro (2940-A-01-999). Para mediados de los ochenta, la importación de enzimas alcanzaba cerca de 12 millones de dólares (1985), destacando la importación de papaína, bromelina, pepsina, tripsina, quimotripsina, pancreatina, hialuronidasa, lisozima, cuajo (quimosina), dentro de las enzimas de origen vegetal y animal, y alfa amilasa, celulasas, invertasa, proteasas de diversos orígenes y pectinasas, fundamentalmente (9). La principal empresa nacional productora era y sigue siendo Enmex, S.A. de C.V., que producía o distribuía la mayor parte de las enzimas de aplicación masiva antes referidas (proteasa bacteriana, alfa-amilasa, glucoamilasa y sustitutos de quimosina). Conforme se sucedieron los avances en los métodos de producción de enzimas y específicamente en la modificación genética para la optimización de la producción, aunado a la adquisición de las empresas por los grandes consorcios (Laboratorios Miles que proveía de tecnología a Enmex fue adquirida por la empresa Bayer y ésta posteriormente por Genencor), la producción de enzimas en México fue disminuyendo hasta convertirse en una actividad menor, respecto al volumen de enzimas consumido. Pfizer, por ejemplo, cerró la producción de enzimas (proteasas y amilasas) en México en 1992. Hoy en día la entrada al mercado de múltiples compañías chinas y la diversidad de estrategias para la producción y mejora de enzimas de la que disponen los grandes consorcios (Novozymes y Genencor), hacen muy poco viable pensar que una compañía en nuestro país pueda subsistir de la producción y venta de enzimas. Con excepción de la producción de Enmex, las enzimas microbianas que se distribuyen en México son de importación. Los datos de importaciones que reporta la Secretaría de Economía con información del Banco de México agrupados en la fracción arancelaria 3507 muestran un mercado de 46.8 millones de dólares en el año 2001, el 60.2% proveniente de los Estados Unidos. Curiosamente, 71.4% de las importaciones provenientes de los EUA corresponde a la fracción 35079008 que es la que agrupa a las amilasas y a las proteasas, el rubro más importante en el sector (55.5% de las importaciones), seguido de lejos por las celulasas (9.8%), las fitasas empleadas en alimentación animal (5,7%), la papaína (1.93%), la pancreatina (0.98%), cuajo concentrado (0.82%) y un rubro muy amplio en la fracción 35079099 que incluye a “las demás”

correspondiente a 22.9%. Es importante recordar que Industrias Novo cuenta con una planta productora en Brasil, instalada en los ochenta, quizás la única en Latinoamérica. Dicha planta no se instaló en México, pues en aquel entonces Novo no tenía el mercado de la proteasa microbiana para detergentes, sin lo cual no se justificaba la inversión. Como puede constatarse, la producción de enzimas en México por la empresa Enmex podría considerarse como exitosa, aunque en parte su permanencia en el mercado se justifica por el hecho de no haber introducido aún enzimas provenientes de microorganismos modificados genéticamente. En el mercado alimentario, parece ser que éste es un factor que aún se aprecia en ciertos ramos, incluido el de los detergentes.

Algunos ejemplos de desarrollos científicos y tecnológicos en la enzimología y la biocatálisis en México en los últimos 25 años

No es el objetivo de esta revisión el analizar los avances científicos y tecnológicos que han impactado la tecnología enzimática y la biocatálisis en las últimas dos décadas. Una revisión reciente (10) publicada en la revista *Nature,* y un texto derivado del módulo: Ingeniería Celular: Biodiversidad e Industria, impartido dentro del ciclo de conferencias: "Fronteras de la Biología en los Inicios del siglo XXI" en El Colegio Nacional (11), dan buena cuenta de ellos. Únicamente señalaremos algunos de los eventos clave en esta evolución:

- El desarrollo de la ingeniería genética (biotecnología moderna) permitió producir enzimas de cualquier origen en huéspedes microbianos, aumentando la disponibilidad y disminuyendo el costo. Un impacto inmediato de este hecho fue la producción microbiana de enzimas de origen animal (quimosina de ternera), así como evitar el uso de microorganismos no reconocidos como seguros (GRAS) en la producción de enzimas para el sector alimentario.
- El avance en el conocimiento de la relación estructura-función, permitió la modificación de enzimas para la mejora de sus propiedades industriales, ya sea cinéticas o de estabilidad a diferentes condiciones de operación (ingeniería de proteínas).
- El desarrollo de la ecología molecular permitió poner en evidencia el escaso conocimiento que se tiene sobre el total de la población micro-

biana en los ecosistemas, abriendo la posibilidad para la búsqueda de nuevas actividades enzimáticas en los microorganismos no cultivables.

- El acceso a microorganismos termo e hipertermofílicos abrió el rango de operación de las enzimas a temperaturas por arriba de los 100ºC, y el estudio de la relación estructura de estas proteínas permitió identificar elementos estructurales característicos de estas enzimas.
- Se desarrollaron métodos de fácil implementación para la elaboración de catalizadores con las enzimas purificadas o incluso con las células completas. De hecho la aplicación racional de las enzimas en forma inmovilizada es un elemento característico de la llamada "biocatálisis". Uno de los primeros textos que abordan estos procesos es el de Ichiro Chibata (*Immobilized enzymes*) publicado en 1978 y la producción de jarabes de fructosa vía la isomerización de glucosa representa el primer ejemplo de un proceso industrial en el que el catalizador enzimático es diseñado para aplicarse conforme a los principios de la ingeniería química de reactores. Los catalizadores más eficientes que se han desarrollado son los llamados CLECS, que son cristales entrecruzados de la proteína que conserva una alta actividad catalítica. Las enzimas se han modificado estructuralmente también para purificarlas o inmovilizarlas.
- La demostración de que las enzimas pueden funcionar en medios no acuosos, abrió toda una avenida para la aplicación de enzimas en síntesis orgánica. De hecho, las enzimas de hidrólisis ampliaron su rango de aplicación para emplearse en reacciones de síntesis modificando el equilibrio termodinámico.

Producción de leches deslactosadas

En 1992 la maestra Lidia Casas concluyó estudios de doctorado en el Instituto de Biotecnología (IBt) de la UNAM relacionados con el desarrollo de biocatalizadores para la hidrólisis de lactosa tanto en leche como en suero de leche, el subproducto de la producción de queso (12). Inició entonces una estancia en el Centro de Investigación de la empresa Boreal en Tulancingo con la idea de hacer pruebas a nivel piloto de un desarrollo consistente en un biocatalizador con células completas de levadura atrapadas en gelatina para hidrolizar lactosa de suero de leche. Por diversas razones de índole fundamentalmente económico, el proyecto pasó al grupo *Prolesa*, con la colaboración del doctor Mario Díaz

Castañeda quien fungía como asesor de la empresa, y a la sazón investigador del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y posteriormente dedicado a la producción industrial de formulaciones alimentarias. Tras un sinfín de propuestas que cubrían mercados tanto de la leche deslactosada como de la elaboración de cajeta y yogurt con las mismas, un estudio de mercado elaborado por la doctora Casas mostró que el principal nicho de mercado podría ser la leche. En efecto, existía en México un 25% de adultos intolerantes a la lactosa y en general los niños de entre dos y cuatro años tenían cerca de tres cuadros de problemas gastrointestinales al año que obligaban a suspender la leche de su dieta, para evitar la carga digestiva que implica la digestión de la lactosa. Estimó entonces que el déficit podría ser de 300 000 L diarios de leche, y que un objetivo de producción razonable podría ser de unos 30 000 L/día .

Para desarrollar este proyecto, los investigadores debieron enfrentar una gran diversidad de problemas, entre los que destacan:

- Los problemas de comunicación con los encargados de producción en las plantas, donde se desconocen los cuidados que requiere el manejo de enzimas.
- La idea de que la leche deslactosada es un medicamento al igual que la enzima.
- La dificultad de empatar los requisitos mínimos para el suministro de envases (~ 250 000 envases al día) con el mercado objetivo inicial.
- El difícil manejo higiénico de la leche.

Ante las dificultades para hacer progresar el proyecto con grupos industriales (Boreal, Prolesa, Leche Querétaro, etc.) los investigadores decidieron iniciar una empresa de su propiedad (Neolac, S.A. de C.V.) vía la incubadora de empresas de base tecnológica de la UNAM, incorporando más personal capacitado al proyecto (Pedro Castro, Gladys Hoyos —también con doctorado en Biotecnología—, Guillermo Ortega, entre otros).

Después de analizar las opciones, decidieron iniciar el proyecto a través de una maquila con la empresa "Leche Araceli" de Querétaro. Decidieron también no ilustrar el empaque con vacas, con el fin de poner distancia con los productores de leche, industria poco innovadora. La lista de problemas que debieron resolverse, rebasa los objetivos de este texto, pero destaca el hecho de que encontraron menor número de barreras técnicas que comerciales. Sin embargo, dentro de las primeras destaca el hecho de la escasa o nula tradición de los empleados de las

plantas lácteas en el manejo de enzima, habiendo sido necesario capacitar a un buen número de empleados. Para mediados de 1995, se llevaron a cabo pruebas exitosas de mercado en 10 tiendas de Comercial Mexicana. La producción en leche Araceli pronto alcanzó los 45 000 L al mes y para llegar a los 250 000 L/mes la maquila se cambió a la empresa Leche León, de León, Gto. Para entonces ya era claro que la dificultad para controlar la contaminación, impedía el uso de la enzima inmovilizada, abandonando este importante desarrollo experimental por problemas prácticos de aplicación. Para 1999 la producción de Neolac llegó a 400 000 L/mes pero ya en una relación comercial de mayor independencia, con la empresa "Cuadritos" ubicada en Celaya, ya que Neolac adquiría directamente con productores su propia leche.

Hoy en día Neolac comercializa la leche deslactosada Desly, la primera en aparecer en el mercado nacional (figura 1). Comparte el liderazgo con Parmalat y Alpura las cuales tienen ventajas de todo tipo incluida no sólo la negociación con tiendas por la amplia gama de productos que manejan, sino que además pueden castigar los precios, de tal suerte que el consumidor encuentra el litro de leche deslactosada de otras marcas a un costo de alrededor de 3.00 pesos menos. El proceso puede efectuarse con la enzima β-galactosidasa que comercializa Gist-Brocades (Genencor) o Amano.

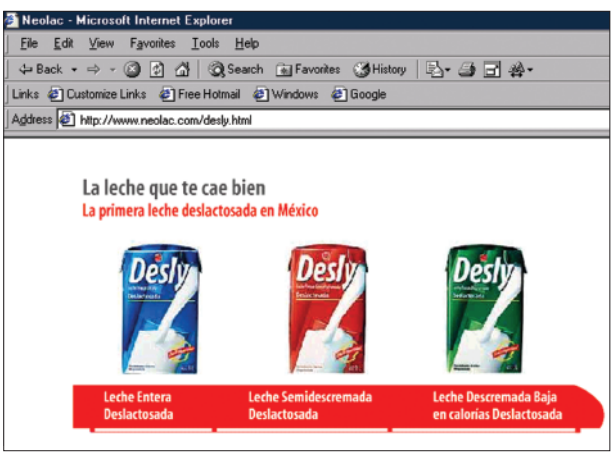


Figura 1

DIVERSAS PRESENTACIONES DE LA LECHE DESLY

Desarrollada por la doctora Lidia Casas, inicialmente en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, este producto es una "leche deslactosada", pues mediante un tratamiento enzimático se ha transformado al azúcar principal de la leche, la lactosa, en sus dos componentes: la glucosa y la galactosa, de mucha más fácil digestión. El número de individuos que padecen la llamada intolerancia a la lactosa es muy elevado en el mundo.

Actualmente la doctora Casas y su grupo buscan nichos en la adición de nutracéuticos, del desarrollo de presentaciones de menor volumen (250 ml), con sabores (chocolate) y desde luego, de alcanzar mercado en todo el país. La formación doctoral de este grupo, opina la doctora Casas, les permite no sólo una mayor visión del campo, sino un mayor rigor en todas las actividades donde el método científico es aplicable, la actualización permanente y las posibilidades de diversificación.

Producción de fructosa a partir de agave

El 8 de diciembre de 1998 se otorgó la patente 5 846 333 de los Estados Unidos de Norteamérica solicitada el 12 de marzo de 1996 titulada "Método para producir jarabes fructosados a partir de plantas de agave" a los inventores Virgilio Zúñiga Partida, Arturo Camacho López y Álvaro de Jesús Martínez Gómez, adscritos al Departamento de Madera, Celulosa y Papel, CUCEI, de la Universidad de Guadalajara. Dicho proceso consiste en la aplicación de una enzima comercial a un extracto de agave libre de sólidos conteniendo principalmente inulina. La enzima aplicada es una inulinasa comercial (Fructozyme TM) elaborada por Novo Nordisk AVS de Dinamarca y aplicada en forma soluble, después de tratar el extracto con carbón activado y resinas de intercambio iónico con el fin de llevar a cabo su desmineralización. La enzima se agrega a razón de 1-1.5 g/L de solución (2 880 INU/L) y la reacción procede por 4-5 horas a 40-50 °C.

La empresa Industrializadora Integral de Agave, S.A. de C.V., productora de tequila Orendain, elabora a partir de este proceso un producto líquido en forma de jarabe denominado "Naturel" o "Sweetrel" que contiene en promedio 68% (w/v) de fructosa y 5% de glucosa. Este producto se promociona dentro de las páginas del "Food Technology" órgano informativo de la Asociación de Tecnólogos en Alimentos de los EUA (13). Ahí se promueve (figura 2) como un "jarabe de agave orgánico", "edulcorante 100% natural preparado de jugo de agave fresco", que "potencia el sabor" y que "contiene el sabor natural de la fructosa". Esto último sin duda como alusión al hecho de que la fructosa comercial proviene de la isomerización también enzimática de la glucosa obtenida del maíz.

Independientemente de la estrategia comercial (el producto se encuentra en México principalmente en tiendas naturistas) sin duda se

trata de un proceso enzimático que constituye un exitoso desarrollo que permite canalizar los excedentes de agave hacia un mercado, que si bien requiere de promoción y bastante mercadotecnia, es parte hoy en día del tipo de productos que están dentro de la preferencia de los consumidores de clase media y alta (orgánico, natural, fresco, etc.). Incluso la caja que contiene el azúcar cristalizado en forma de sobres, indica: "sin azúcar", "endulzante natural" y "ultrafructosa". El mercado varía dependiendo de la disponibilidad de plantas para satisfacer el mercado del tequila. La fructosa es alrededor de 40% más dulce que la sacarosa, el azúcar de caña, aunque el costo varía en función de la fuente.

Figura 2

ANUNCIO PUBLICITARIO DEL EDULCORANTE A BASE DE FRUCTOSA

Desarrollado por investigadores de la Universidad de Guadalajara, en las páginas de la revista *Food Technology*, órgano informativo técnico de la Organización de Tecnólogos en Alimentos de los EUA.

La producción del ácido 6-APA intermediario en la síntesis de penicilinas semisintéticas es probablemente uno de los desarrollos en biocatálisis en el país que mayor impacto ha tenido tanto desde el punto de vista de generación de conocimientos, así como de investigación aplicada, de formación de recursos humanos y de colaboración internacional. El proyecto, en su componente de desarrollo tecnológico tuvo como coordinador general al doctor Rodolfo Quintero, quien promovió entre la comunidad científica y la industrial la idea de generar y financiar a través de la participación con acciones una empresa en biocatálisis. Fue así como en los ochenta fue creada la empresa Genin, S.A. de C.V., cuyo objetivo sería el llevar a la práctica el proceso desarrollado a nivel laboratorio por el grupo del propio doctor Quintero. Después de una intensa búsqueda de recursos para el financiamiento de este proceso, uno de los principales limitantes para el desarrollo de empresas de base tecnológica en el país, el proyecto pudo ser ubicado dentro del programa regional para el desarrollo de la biotecnología perteneciente a UNIDO y UNESCO recibiendo financiamiento para, por una parte, promover la generación de conocimiento y la formación de recursos humanos (UNESCO), mientras que por la otra, desarrollar investigación aplicada a nivel laboratorio que fuese de interés industrial (UNIDO). El proyecto tuvo como base al Instituto de Biotecnología de la UNAM, en donde mediante un esquema novedoso en el país, se instaló la empresa Genin promotora del proyecto mediante la renta de instalaciones. A cargo de Genin, la doctora Rosa Luz González coordinó dicho desarrollo contando con el apoyo de Sergio Sánchez, Ma. Elena Rodríguez, Lorena Pedraza y Fernando González entre otros. En su componente internacional, el proyecto se vinculaba con el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia, siendo la responsable la doctora Dolly Montoya, la empresa VECOL de ese mismo país interesada en el proyecto y finalmente el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba y la Unión Industrial para productos médicos y farmacéuticos de ese mismo país, una compañía productora de ampicilina.

La empresa Genin estableció además nexos académicos con grupos de investigación del propio IBt, quienes participaron en el estudio de la producción de la enzima penicilino acilasa y en la elaboración y aplica-

ción de un catalizador con base en esta enzima, destacando los trabajos del doctor Enrique Merino y Francisco Bolívar en la construcción de una cepa sobreproductora de la enzima y del doctor Agustín López-Munguía en la caracterización y uso del catalizador. Más adelante grupos de investigación hicieron aportaciones adicionales en particular el grupo de ingeniería de bioprocesos del doctor Tonatiuh Ramírez y el grupo de Ingeniería de Proteínas del doctor Xavier Soberón. Una estrategia global del desarrollo tecnológico puede apreciarse en la figura 3.

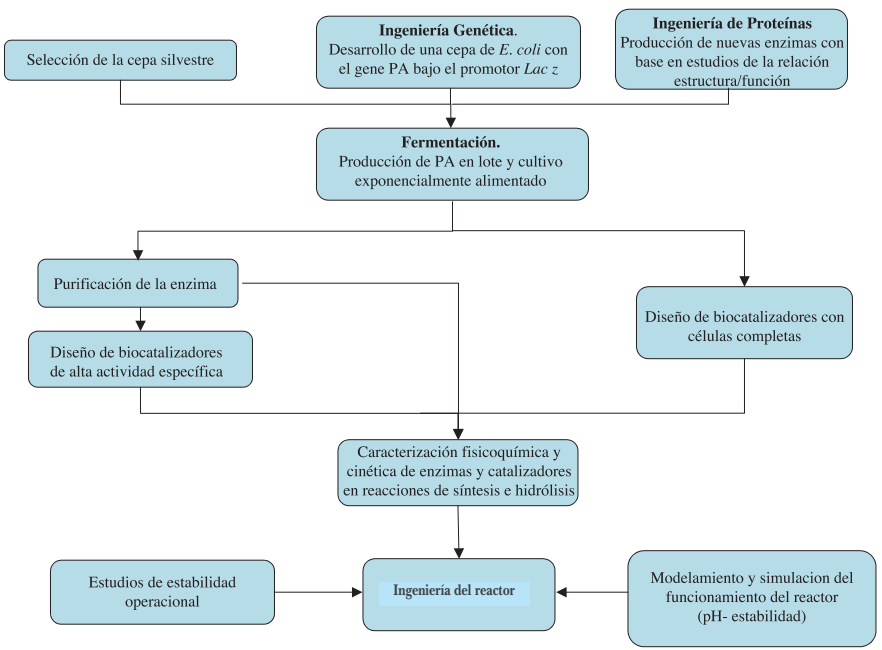


Figura 3

ESTRATEGIA GLOBAL DEL DESARROLLO TECNOLÓGICO

Esquema de la estrategia general seguida entre diversos grupos de investigación de la UNAM para el diseño de un proceso de producción de penicilinas semisintéticas.

Las aportaciones en materia científica y tecnológica se encuentran documentadas en diversos artículos científicos dentro de los cuales destacamos los más importantes en la tabla 1. De esta tabla es posible concluir sobre la capacidad de grupos nacionales para trabajar de manera multidisciplinaria en proyectos de desarrollo tecnológico. Si bien el proyecto fue transferido exitosamente a las dos empresas mencionadas en Cuba y Colombia, la capacidad de las industrias internacionales involucradas en este proyecto, no sólo de avanzar rápidamente en la mejoría de los catalizadores, sino de integrar el proceso con la producción de penicilina, dejó fuera de posibilidad a este desarrollo, pues entre otras limitantes dependía del suministro de la materia prima. Es importante también recuperar de esta experiencia que el tiempo que toma un desarrollo de esta naturaleza en instituciones públicas (1987-1992) es aún demasiado largo para las necesidades de una industria con un proceso de competencia internacional. Para la fecha en que la tecnología estaba disponible, existía ya la oferta de alternativas de catalizadores desarrollados por Novo Industries, Toyo Jozo, Beechman, Boehringer Mannheim, Astra-LabAB, Rohm Pharma, Orsabe (México), Cipan (Portugal), Sclavo (Italia), entre otras. Sin embargo los desarrollos alcanzados por cada uno de los grupos son de gran relevancia en el proceso industrial.

Aditivo enzimático para retrasar el endurecimiento de la tortilla de maíz

En 12 de mayo de 1995 la UNAM solicitó una patente ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial de la invención denominada: "Proceso enzimático para obtener tortillas de maíz que conserven mejor sus propiedades de textura durante su vida de anaquel", solicitud a la que se asignó el número de expediente 952200, y con fecha 20 de marzo de 1997, dio curso a la licencia de explotación de la solicitud de patente, a favor de Proveedor Internacional de Químicos S.A. de C.V., bajo la dirección del ingeniero Wenceslao Ojeda. De esta manera se lograba salvar uno de los principales cuellos de botella en el desarrollo de biocatalizadores en México. Se trata del hecho de que si bien los centros de investigación tienen capacidad para desarrollar procesos de producción de enzimas y biocatalizadores, es frecuente que no puedan asegurar su suministro a un eventual consumidor. Éste es el caso de un aditivo con base en enzimas del tipo amilolítico desarrollado por la Facultad de Quí-

Tabla 1
PRINCIPALES APORTES DE DIVERSOS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN DE LA UNAM INVOLUCRADOS EN EL DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO 6-AMINO-PENICILÁNICO Y DE PENICILINAS SEMISINTÉTICAS

Antecedentes
- El papel de las penicilino amidasas en la industria (13).
- Caracterización de la región regulatoria de la penicilino acilasa de *Escherichia coli* (14).

Producción de la enzima y elaboración de biocatalizadores
- Caracterización y aplicación de un biocatalizador de Penicilino Acilasa (15).
- Simulación de un reactor multicolumna empacado y recirculado para la penicilino acilasa (16).
- Biocatalizador de penicilino acilasa con células de *Escherichia coli* recombinantes: caracterización y aplicación en la síntesis e hidrólisis de antibióticos (17).
- Estrategias en el diseño de un proceso con penicilino acilasa (18).

Proceso de reacción
- Modelamiento y simulación de un proceso dependiente del pH: conversión de penicilina G en 6 APA (19).
- Cultivos alimentados exponencialmente como una alternativa al quemostato: el caso de la producción de penicilino acilasa recombinante (20).
- Efecto del pH en la síntesis de ampicilina con penicilino acilasa (21).

Mejoras estructurales a la enzima
- Construcción de una mutante de la penicilino acilasa de *Escherichia coli* con mayor estabilidad térmica en un medio alcalino (22).
- Diseño de una penicilino acilasa de una sola cadena permutada circularmente, que resulta más funcional que la enzima natural (23).

mica y el Instituto de Biotecnología de la UNAM por Francisca Iturbe, Martha Lucio Aguerrebere y Agustín López Munguía. Por otro lado, la empresa consumidora, en este caso Maseca, no tiene capacidad, ni interés comercial en su producción, sino en su consumo. Fue por lo tanto necesario encontrar una empresa con experiencia y capacidad para producir y suministrar el aditivo a la(s) empresa(s) que fabrican tortillas. En este caso específico, fue necesario suministrar el aditivo durante aproxi-

madamente un año (1995-1996) que duraron las pruebas en planta y con los consumidores por parte de la empresa Desarrollo Industrial y Tecnológico S.A. de C.V. (DITSA), brazo tecnológico de Maseca, en Monterrey Nuevo León. La intervención de esta empresa fue necesaria, pues las pruebas a nivel laboratorio llevadas a cabo por los investigadores se limitaron a no más de un kilo de masa tratada, y a 20 Kg en las pruebas finales elaboradas en tortillerías de la ciudad de México. Las pruebas a cargo de DITSA se iniciaron en lotes de 500 Kg, que pronto pasaron a nivel industrial donde se procesaron lotes de 1 y 2 Ton de harina, con las que se elaboraron tortillas que se usaron para pruebas de mercado en tiendas OXXO, Soriana, Gigante, etc. con resultados altamente satisfactorios para la empresa, al grado de que para el 4 de octubre de 1996 se firmó un convenio tripartita entre Maseca, Proveedor Internacional de Químicos S.A. de C.V. y la UNAM. Esta última, bajo un esquema de pago de regalías cedía el uso de la patente a la segunda, para suministrar el aditivo enzimático a Maseca, quien tenía planes de usar el aditivo en todas sus plantas, incluidas las ubicadas en los EUA.

El interés de la empresa era mayúsculo no sólo porque el tratamiento enzimático de la harina permitía incrementar en varios días la vida de anaquel de la tortilla y mejoraba sensiblemente su calidad y textura, sino porque permitía sustituir la goma (carboximetil celulosa) que la empresa venía usando con el mismo fin. La enzima degrada de manera muy limitada a la amilopectina del almidón, y con esto retrasa el fenómeno conocido como retrogradación, que es el responsable de la dureza de la tortilla almacenada. Lo es también en el caso del pan y de las pastas elaboradas con trigo. Al usar gomas, se forma una película en la tortilla que evita que el agua se evapore fácilmente, lográndose el mismo efecto, es decir que se retrase el endurecimiento. Sin embargo al usar gomas la textura de la tortilla pierde su carácter natural. La disminución en los costos de producción al sustituir la goma por la enzima, representan una ventaja mucho muy atractiva, aunada a la mejor calidad del producto.

La forma óptima para la adición de la enzima es durante la elaboración de la harina de nixtamal, pues la enzima se activa posteriormente, al agregar agua y calentar la masa para hacer la tortilla en planta, aunque un productor de tortillas frescas bien podría adicionarla también durante la elaboración y mezclado de la masa. El estudio del proceso de adición, que correspondió a un trabajo de tesis fue publicado posteriormente en una revista de circulación internacional (24).

La UNAM recibió de parte de Proveedor Internacional de Químicos S.A. de C.V. regalías correspondientes a 3% de las ventas de aditivo, que en 1997 ascendieron a 15 toneladas. Sin embargo durante ese año Maseca se encontró con varias dificultades cuando intentaron introducir el aditivo en las máquinas de alta velocidad, máquinas que permiten producir hasta 600 tortillas por minuto y en las cuales no había sido probado el aditivo. El esfuerzo al que la masa es sometida en estos equipos es tal que se rompe a menos que contenga un aditivo que le aumente la resistencia. Ese papel lo juega también la carboximetil celulosa (además de retrasar el endurecimiento), pero no las enzimas. La empresa Proveedor Industrial S.A., trató entonces de reformular el aditivo enzimático para que incluyese una cantidad suficiente de goma para resistir los esfuerzos de las máquinas de alta velocidad, pero limitada para que la adición de la enzima siguiera siendo económicamente atractiva. Diversos aditivos fueron probados pero con el paso de los meses, a la disminución en las ventajas económicas se agregaron otros inconvenientes, entre otros la supuesta negativa de parte de los gerentes de algunas de las plantas de Maseca para usar el aditivo, a pesar del entusiasmo que siempre manifestó su grupo de investigación. Aparecieron además diversos aditivos alternos para el mismo fin. A pesar del convenio firmado y las proyecciones de Maseca que estimaban consumir en el mediano plazo cerca de 20 toneladas de aditivo al mes, el consumo de aditivo bajó de 15 toneladas en 1997 a 10 ton en 1998 y 10 ton más en el año 2000. Por otro lado, a casi ocho años de la solicitud y casi dos de haber respondido a las preguntas derivadas del análisis a fondo de la solicitud, la patente no ha sido aún otorgada (o rechazada) a la UNAM.

El uso de enzimas en la elaboración de tortillas debería ser ya una aplicación generalizada en México, como lo es en el caso de la elaboración del pan de trigo. Por otro lado, las pérdidas por endurecimiento son difíciles de cuantificar, pero de acuerdo con expertos de la propia industria podrían llegar a ser del orden de 30% de la producción. El director general de Tecnología del Grupo Maseca al tomar la palabra en la ceremonia de firma del convenio comentó: “Es increíble que en este país, no exista una instancia de investigación denominada ‘El Instituto de la Tortilla’ y sin embargo la modernización de la industria debe aun esperar mejores tiempos.

Como se mencionó en la sección tres, uno de los avances más importantes en el desarrollo de la biocatálisis lo constituye el uso de enzimas en medios no convencionales, entendiendo por éstos, cualquier medio que no sea el acuoso, donde convencionalmente funcionan. El número de procesos en desarrollo aprovechando esta ventaja es numeroso, particularmente en síntesis orgánica, pero pocas aplicaciones han alcanzado el nivel industrial. Destaca sin embargo un par de ellas: la que tiene que ver con el uso de lipasas para la modificación de la estructura de las grasas, elaborando de esta manera un sustituto de grasa de chocolate a partir de aceite de palma y de ácido esteárico, y la síntesis del edulcorante aspartame, que consiste en el dipéptido formado por el ácido aspártico y la fenilalanina metilada. En México, la empresa Enzymologa S.A. DE C.V. ubicada en Allende, Nuevo León, elabora el edulcorante, producido a partir de fenilalanina que produjo durante varios años por fermentación e importando el ácido aspártico que se elabora mediante síntesis enzimática a partir del ácido fumárico. Sin duda es un reto acercar a los grupos nacionales de investigación con la industria, en particular en este proceso exitosamente desarrollado por un grupo nacional (el grupo Benavides), en un producto de alta competencia internacional, y para el cual existe una alternativa moderna dentro de la biocatálisis que es la síntesis enzimática del dipéptido empleando enzimas proteolíticas (por ejemplo termolisina) en presencia de solventes orgánicos que favorezcan termodinámicamente la síntesis.

En esta línea de investigación es importante reconocer los trabajos pioneros realizados por el doctor Alejandro Klibanov en el Instituto Tecnológico de Massachusetts, quien demostró que las enzimas podían funcionar en un solvente orgánico. En la misma época el doctor Eduardo Bárzana García, del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química de la UNAM realizó estudios de doctorado en esa misma institución, siendo igualmente uno de los pioneros en demostrar que las enzimas también pueden funcionar con sustratos en fase gaseosa (25, 26). De hecho, una aplicación del mismo grupo que deriva de estas aportaciones, es la posibilidad de determinar etanol en el aliento mediante una prueba en la que la persona que va a ser analizada, sopla sobre un dispositivo que contiene a la enzima alcohol oxidasa (27, 28).

Por otro lado, la UNAM recibió el 26 de mayo de 1993 la titularidad de la patente número 168,482 titulada: “Proceso enzimático para al extrac-

ción de aceite vegetal a partir de semillas o frutos", y años mas tarde, la patente 23642, denominada "Procedimiento para la obtención de pigmentos liposolubles a partir de productos vegetales", cuya autoría corresponde a David Rubio, Eduardo Barzana y Agustín López-Munguía. Esta última se refiere a una aplicación de enzimas en solvente orgánico que permite modificar de manera radical el proceso de extracción de los colorantes de la flor de cempasúchil y constituye un ejemplo de un desarrollo conjunto entre una empresa y una institución académica. En efecto, la empresa Laboratorios Bioquimex, S.A., se acercó a los investigadores responsables a finales de los ochenta, con el fin de explorar la posibilidad de aplicar enzimas al proceso de extracción de los colorantes de la flor de cempasúchil (xantofilas, siendo la luteína la más importante), ampliamente usados en la industria alimentaria en alimentos para pollos y en la coloración de pasta. Durante varios años y en colaboración con investigadores de la empresa (Fernando García, Vicente Ridaura y Oscar García-Correa) se realizaron experimentos y pruebas piloto que culminaron con la propuesta de un proceso que eliminaba la etapa de lixiviación de la flor y de su posterior secado, y aumentaba los rendimientos de extracción al evitar las pérdidas de la luteína por oxidación. El centro del desarrollo consistió en la reacción en solvente con las enzimas empleando la flor fresca, habiéndose estudiado el tipo y concentración de enzimas adecuadas, los tiempos de reacción, el sistema de reacción (agitación), las condiciones de reacción y finalmente la viabilidad del proceso. Una descripción de la tecnología fue publicada recientemente de manera conjunta entre los investigadores y técnicos de la empresa y la academia (29). En la figura 4 se presenta un esquema comparativo de las operaciones empleadas en el proceso de extracción desarrollado y en el convencional.

Con esta información, la empresa construyó un prototipo de 1000 L (el centro del proceso es un reactor donde enzimas en presencia de hexano facilitan y aceleran la extracción) que fue exitosamente probado en la planta. Después de un intenso y largo proceso de negociación con el Grupo Resistol, la empresa compró a la UNAM la tecnología el 4 de diciembre de 1997. Cabe señalar que en este proceso como en otros desarrollados en el Instituto de Biotecnología, la experiencia de un grupo negociador de los contratos y los convenios de transferencia de tecnología, encabezados, por Elena Arriaga y Mario Trejo, facilitaron las negociaciones e incluso permitieron destrabar conflictos en buena medida generados por la poca tradición que existe en ambas instancias en los convenios de desarrollo tecnológico.

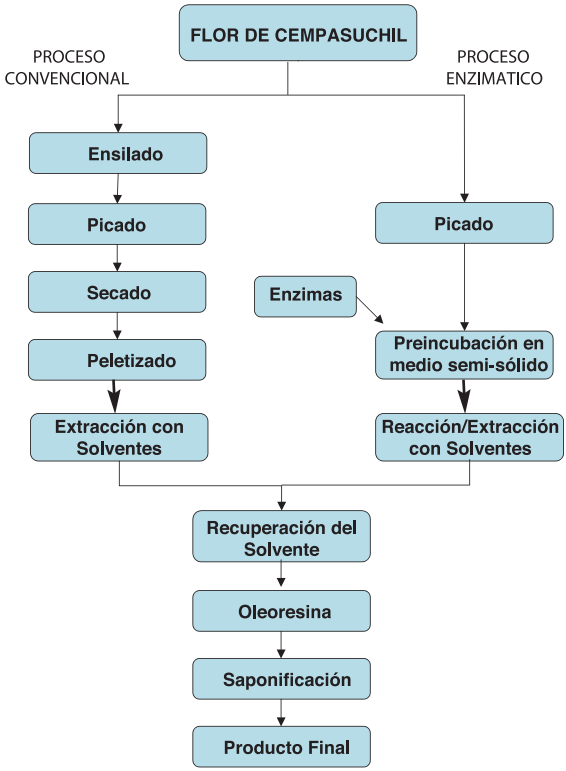


Figura 4

EXPLOTACIÓN DEL CEMPASÚCHIL

Esquema del proceso de extracción enzimática de los colorantes carotenoides de la flor de cempasúchil, comparado con el proceso tradicional.

Las enzimas y los nuevos antivenenos

La picadura de animales ponzoñosos es un grave problema de salud pública en México, particularmente la de alacrán de la cual se presentan más de 200 000 casos anuales. Por esta razón existe en el país amplia experiencia en su tratamiento y disponibilidad de los antivenenos correspondientes. Estos antivenenos son el resultado de metodologías generadas en el siglo XIX consistentes en obtener el suero de animales, generalmente caballos, a los que se había tratado (inmunizado) con el vene-

no correspondiente. Este suero contiene entonces como principio activo a los anticuerpos contra el veneno inyectado al animal y se le conoce como antitoxina (inmunoglobulinas). Sin embargo el suero de caballos contiene múltiples proteínas adicionales a las antitoxinas lo que obligó décadas después a separarlas mediante una precipitación con sales, lo que elimina entre otras proteínas a la albúmina que es altamente alergénica. Finalmente la tercera generación de antivenenos corresponde a una modificación mediante un proceso enzimático de las antitoxinas: en efecto, al ser hidrolizadas con la enzima pepsina, se elimina la fracción de la proteína del anticuerpo que es responsable de los efectos secundarios de la sueroterapia, dejando intacta la fracción que neutraliza a las toxinas y moléculas de los venenos. Esta fracción se denomina F(ab)2 y constituyen lo más avanzado en el tratamiento de mordeduras de animales ponzoñosos, tratamiento que se conoce como "faboterapia". La faboterapia ha eliminado prácticamente las reacciones de hipersensibilidad al suero, según lo demuestran los más de 250 000 pacientes hasta ahora tratados en el IMSS y la Cruz Roja con Alacramyn y Antivipmyn. Los conceptos "faboterapia" y "faboterapéuticos" fueron propuestos por el doctor Alejandro Alagón Cano, investigador del Instituto de Biotecnología de la UNAM (29). Dichos conceptos sirven para distinguir claramente a estos antivenenos eficacez y de altísima seguridad de aquellos basados en anticuerpos sin digestión enzimática o sueros crudos de caballo que si bien neutralizan a los venenos tienen efectos secundarios indeseables. El doctor Alagón, a través de un convenio de colaboración con el mayor productor de antivenenos en México y el mundo, el Instituto Bioclon S.A. de C.V., también estableció y validó los métodos analíticos y de control de calidad que garantizan la seguridad de los "Faboterápicos". Es importante señalar que dichos antivenenos se encuentran actualmente en evaluación por la FDA para ser aprobados en los EUA y que el Instituto Bioclon tiene hecha una solicitud de patente de los "faboterápicos" a nivel mundial.

Conclusiones

Como puede constatarse, la tecnología enzimática y la biocatálisis son actividades de investigación ubicadas dentro de la biotecnología que en México se desarrollan en grupos que cuentan un nivel internacional, aunque ciertamente su número es muy limitado considerando el poten-

cial del área. Algunos de los ejemplos fueron seleccionados con el fin de poner en evidencia la capacidad de estos grupos y su repercusión e impacto a nivel nacional e internacional, pero de ninguna manera abarca a todos los grupos existentes y es probable que existan casos igual o más exitosos que los descritos. Éstos fueron seleccionados por el conocimiento que el autor tiene de los mismos, aunado al hecho de que ilustran dificultades específicas para el desarrollo de esta área. A las dificultades inherentes a la relación academia-industria, debemos agregar en este caso, la escasa experiencia que existe en la industria sobre el uso y manejo de las enzimas, su control por parte de grandes empresas productoras y la complejidad que estaría asociada a la autosuficiencia en biocatalizador en una determinada empresa. Sin embargo, varios de los ejemplos descritos, dan cuenta de la capacidad existente en el país para llevar acabo desarrollos en biocatálisis.

Bibliografía

1. Takamine J. Process of Making Diastatic Enzyme. Patent Number US 525,823. Estados Unidos de Norteamérica (1894).
2. Rohm O. Preparation of Hides for the Manufacture of Leather. Patent Number US 886, 411. Estados Unidos de Norteamérica (1908).
3. Wallerstein L. Method of Treating Beer or Ale. Patent Number US 995,825. Estados Unidos de Norteamérica (1911).
4. Rohm O. Process for Cleaning Laundry of All Types. Patent Number 283,923 Alemania (1915).
5. Sumner J.B. The islation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 69: 435-441 (1926).
6. Northrop J. Crustalline pepsin. I. Isolation and tests of purity. *J. Gen. Physiol.* 13: 739-766 (1930).
7. Kunitz M., Northrop J. Crystalline chymo-trypsin and chymo-trypsinogen. I. Isolation, crystallization and general properties of a new proteolytic enzyme and its precursor. *J. Gen Physiol.* 18: 433-458 (1935).
8. Fleming A. On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. Lond.* Ser. B. Biol. 93: 306-317 (1922).
9. López-Munguía A. Enzimas libres e inmovilizadas de aplicación industrial. En: *Perspectiva de la Biotecnología en México.* Ed. R. Quintero. Fundación Barros Sierra y Conacyt (1985).
10. Schmid A., Dordick J.S., Hauer B., Klener A., Wubbolts M., Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow. *Nature* 409: 258-268 (2001).

11. Bolívar F., López-Munguía A. Coordinadores. En: Módulo 7, Ingeniería celular, biodiversidad e industria, *Fronteras de la biología en los inicios del siglo XXI*. El Colegio Nacional. 2003.
12. Casas L.T. Contribución al desarrollo de un proceso para la obrención de un biocatalizador con actividad de β-galactosidasa para ser aplicado en leche y suero dulce de leche. Tesis de doctorado en biotecnología, UACPyP, UNAM (1992).
13. Valle F., Balbás P., Merino E., Bolívar F. The role of penicillin amidases in nature and in industry *Trends in Biotechnology* 16: 36-41 (1991).
14. Valle F., Gosset G., Tenorio B., Oliver G., Bolívar F. Characterization of the regulatory region of the *Escherichia coli* penicillin acylase structural gene. *Gene* 50: 119-122 (1986).
15. Ospina S., López Munguía A, González R.L., Quintero R. Characterization and Use of a Penicillin Acylase catalyst. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 53: 205-214 (1992).
16. Gómez A., Quintero R., López-Munguía A. Simulation of a multicolumn recirculated packed bed reactor (MRPBR) for penicillin acylase. *Bioprocess Engineering* 9: 147-154 (1993).
17. Ospina S., Merino E., Ramírez T., López-Munguía A. Recombinant whole cell penicillin acylase biocatalyst: production, characterization and use in the synthesis and hydrolysis of antibiotics. *Biotechnology Letters* 17(6): 515-620 (1995).
18. Gómez A., Rodríguez M., Ospina S., Zamora R., Merino E., Bolívar F., Ramirez O.T., Quintero R., López-Munguía A. Strategies in the design of a penicillin acylase process En: Advances in Process Engineering. Ed. Galindo E. y Ramírez O.T. Kluwer Academic Publishers 29-40 (1994).
19. Gómez-Aguirre A., Ospina S., Queré A., Quintero R., López-Munguía A., Modelling and simulation of a pH dependent bioprocess: Enzymatic conversion of Pen G to APA. En: *Bioprocess Computations in Biotechnology*. Vol. 2. Ed. T. Ghose. McGraw Hill, Nueva Dehli, India 164-190 (1994).
20. Ramírez O.T., Zamora R., Quintero R., López-Munguía A. Exponentially fed-batch cultures as an alternative to chemostats: The case of penicillin acylase production by recombinant *E. coli*. *Enzyme and Microbial Technology* 16: 895-903 (1994).
21. Ospina S., Barzana E., Ramírez O.T., López-Munguía A. Effect of pH on the synthesis of ampicillin by penicillin acylase. *Enzyme and Microbial Technology* 19: 462-469 (1996).
22. Del Río G., Rodríguez M., Munguía M., López-Munguía A., Soberon X., Design of a penicillin acylase with enhanced thermal stability at alkaline pH. *Biotechnology and Bioengineering* 48: 141-148 (1995).
23. G. Flores, X. Soberón, J. Osuna. A designed circularly permuted single-chain

penicillin G acylase is functionally better than the natural enzyme. Aceptado Protein Science (2004).
24. Iturbe Ch.F., Lucio A.R. López Munguía A. Shelf-life of tortilla extended with fungal amylases. *Int. J Food Sci. and Technol* 31: 505-509 (1996).
25. Bárzana, E., Klibanov, A.M., Karel, M. Enzyme-Catalyzed Gas Phase Reactions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 15: 25-34 (1987).
26. Bárzana, E., Karel, M., Klibanov, A.M. Enzymatic oxidation of ethanol in the gaseous phase. *Biotechnology and Bioengineering* 34: 1178-1185 (1989).
27. Bárzana, E., Klibanov, A.M., Karel, M. A colorimetric method for the enzymatic analysis of gases: the determination of ethanol and formaldehyde vapors using solid alcohol oxidase. *Analytical Biochemistry* 182: 109-115, (1989).
28. Bárzana E., Rubio D., Santamaría R.I., García- Correa O., García F., Ridaura Sanz V., López- Munguía A. Enzyme-mediated solvent extractuion of carotenoids from Marigold flowers (*Tagetes erecta). Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 4491-4496 (2002).
29. Alagón A. Anticuerpos seguros y eficaces: La revolución de los nuevos antivenenos. Suplemento: Del DNA a la genómica: la revolución biológica contemporánea. Universidad de México. *Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México.* Número 617, noviembre (2002).

MEJORAMIENTO DE CARACTERÍSTICAS Y CALIDAD ALIMENTARIAS Y NUTRACÉUTICAS DE PLANTAS MEDIANTE BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR
ALGUNOS EJEMPLOS

J. A. Osuna-Castro
O. Paredes-López

Introducción

Muchos pueblos del tercer mundo sobreviven gracias a dietas vegetales con poco o nada de productos cárnicos y/o lácteos. Así el consumo monótono de granos, vegetales frescos, tubérculos y raíces, en la ausencia de tejido animal, puede conducir a serias deficiencias de macronutrientes, y de vitaminas y minerales esenciales ya que diecisiete minerales y trece vitaminas son requeridos en niveles mínimos para aliviar desórdenes nutricionales específicos. Lo anterior es perfectamente aplicable en el caso de nuestro país, ya que existe evidencia documentada de desnutrición por deficiencias tanto de macro como de micronutrimentos entre la población de México, especialmente en las regiones rurales y marginales.

Es evidente que para asegurar una nutrición adecuada con todos los componentes esenciales, así como para obtener los beneficios terapéuticos de ellos y de otros nutracéuticos (componentes de los alimentos fisiológicamente activos que además de proveer beneficios en la nutrición básica previenen enfermedades o promueven la buena salud), en todo el mundo incluyendo a las naciones del primer mundo, se debe realizar un esfuerzo especial para mejorar de manera simultánea la calidad nutricional y nutracéutica de las plantas con respecto a la composición, concentración y, algo muy importante, la biodisponibilidad de dichos macro y microcomponentes.

La biotecnología molecular es una disciplina científica revolucionaria que está teniendo tremendas implicaciones en la agricultura del mundo en todos los niveles y en la vida del individuo mismo. Específicamente,

algunos de los beneficios que promete al consumidor son proveerle de alimentos de origen vegetal más nutritivos (proteínas, lípidos y carbohidratos) y con mejores atributos para la salud. Además de productos con una vida de postcosecha y resistencia a la pudrición mayor, así como mejores características de procesamiento alimentario (funcionalidad). También, la biotecnología molecular puede jugar un papel sobresaliente biofortificando los cultivos de interés agroalimentario, incrementando significativamente la cantidad de micronutrientes y propiciando que a su vez sean altamente biodisponibles para humanos e incluso para animales domésticos.

Por otro lado, con la ingeniería genética existe la posibilidad de introducir nuevas proteínas alergénicas en los alimentos, por lo que dichos productos novedosos deben ser evaluados adecuadamente antes de incorporarlos al mercado y a la cadena alimentaria humana.

Biomacromoléculas de interés alimentario

Las semillas y los tubérculos de las plantas no solamente son órganos de propagación y de diseminación, sino que constituyen el principal tejido vegetal cosechado por el hombre, en virtud de su productividad así como de su utilización como alimento para él mismo y para los animales domésticos, y como materia prima para la industria. Su explotación se debe a que dichos tejidos representan un reservorio rico de compuestos de almacenamiento tales como proteínas, carbohidratos y lípidos. De ahí que sea muy clara la importancia nutricional, económica, social y cultural de tales órganos vegetales. En este sentido, el entendimiento, conocimiento y estudio integral de las macromoléculas componentes de los granos y los tubérculos es un prerrequisito indispensable en lo relativo a su explotación racional, al mejoramiento de su calidad nutricional, funcional y nutracéutica, o bien para conferirles características útiles con aplicaciones novedosas mediante la biotecnología molecular o para incrementar su biodisponibilidad (1, 2).

Proteínas

La calidad de las proteínas alimentarias, especialmente la de los granos, siempre ha sido un tópico de suma importancia en la nutrición de

la humanidad y de los animales domésticos. Todos los animales, incluyendo a los seres humanos, carecen de la maquinaria enzimática completa que les permita sintetizar *de novo* algunos de los aminoácidos requeridos para el ensamble de las proteínas necesarias para su crecimiento y funcionamiento; estos aminoácidos se obtienen de la dieta y se denominan esenciales (3). Particularmente, las proteínas de reserva de las semillas son la principal fuente de este macronutriente básico en la alimentación de la humanidad y de los animales domésticos, suministrando más de la mitad de la proteína dietaria a nivel mundial.

El sistema de clasificación de las proteínas de reserva más comúnmente empleado está basado en su solubilidad y extractabilidad en una serie de disolventes, teniéndose cuatro clases de ellas: albúminas (solubles en agua), globulinas (extraíbles con soluciones salinas diluidas y neutras), prolaminas (aisladas con mezclas de alcohol/agua), y las glutelinas (solubilizadas sólo en disolventes acuosos con pH extremo, ácido o alcalino) (4). De manera adicional, las globulinas pueden dividirse en 7S y 11S al separarlas por ultracentrifugación, mientras que las albúminas presentan coeficientes de sedimentación de alrededor de 2S.

Por lo general, en las semillas de ciertas plantas predomina un tipo de proteína de reserva, aunque por supuesto existen excepciones; así tenemos que las globulinas son características de las leguminosas mientras que en cereales abundan las prolaminas. No obstante, dichas proteínas dominantes, y por ende los granos huéspedes que las contienen, son comúnmente deficientes en al menos un aminoácido esencial; por ejemplo, las leguminosas son deficientes en los aminoácidos azufrados cisteína y metionina, mientras que la lisina y el triptofano son limitantes en los cereales. Por esto, las dietas basadas fuertemente en alguna de tales semillas resultan ser nutricionalmente incompletas. Este problema se ve reducido cuando la alimentación consiste de una mezcla de un cereal y una leguminosa, como ejemplo podemos citar el caso de México, donde el frijol común es consumido por todas las clases sociales y junto con el maíz constituyen la base de la alimentación de una gran parte de la población. La mezcla del frijol y el maíz tiene un efecto benéfico sobre la calidad de la proteína. El frijol complementa las proteínas del maíz contribuyendo a elevar los niveles de lisina disponible, mientras que el maíz aporta parte de los aminoácidos azufrados deficientes en el frijol (3, 5, 6).

Por otro lado, la capacidad para producir granos de una manera eficiente está restringida a ciertas regiones del mundo. Aparte del valor nutricional, la atención especial sobre las proteínas vegetales de reserva

radica en que juegan un papel muy importante en las propiedades funcionales y sensoriales de los alimentos, contribuyendo de manera sobresaliente en la aceptación o rechazo de un producto (2, 4, 7). De ahí que uno de los objetivos en el corto y mediano plazo sea el de la generación de proteínas de reserva, que tengan un elevado valor nutricional-funcional e incluso nutracéutico, así como su sobreproducción en cultivos de interés agroalimentario.

Uno de los primeros intentos de mejorar la calidad proteínica de los cereales resultó en el descubrimiento de mutantes naturales de sorgo y cebada ricas en lisina. También, a principios de los sesenta se reportó que una mutación espontánea en el cromosoma 7 del maíz (denominada *opaco-2*) duplicaba los niveles de lisina y triptofano con respecto a los del maíz normal. Este maíz posee en promedio 1.6 g de lisina y 0.5 g de triptofano por cada 100 g de proteína respectivamente, mientras que el llamado *opaco-2* mostró hasta cuatro g de lisina y uno de triptofano en la misma base. En vista de la elevada calidad nutrimental de sus proteínas, se creyó que este tipo de maíz se podría cultivar de manera extensiva. Desafortunadamente, el maíz *opaco-2* exhibió un endospermo blando que lo hacía mucho más susceptible al daño mecánico y a las plagas de almacén; además, su rendimiento era más bajo que el del maíz convencional y el grano precisaba de periodos de secado muy largos. En México, los investigadores del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), empleando estrategias de mejoramiento tradicional y apoyados por el análisis químico de un gran número de muestras, fueron capaces de acumular los genes modificadores que convierten el endospermo suave del *opaco-2* en uno vítreo, tipo de endospermo duro. El logro sobresaliente fue que el nuevo maíz, llamado de alta calidad proteínica (QPM por *Quality Protein Maize*), presentó niveles de lisina y triptofano intermedios entre los del maíz normal y los del *opaco-2,* pero sin las características indeseables del endospermo de este maíz (8). Estudios en ratas alimentadas a partir de maíz QPM mostraron que tuvieron una ganancia en peso del doble en comparación con el grupo control que consumió el maíz normal (9). Vale la pena comentar que el periodo global de gestación del QPM desde que se encontraron las mutantes fue muy largo, más de 20 años, por lo que en este tipo de trabajos la biotecnología molecular podría reducir de manera significativa el tiempo y ser más específica.

Uno de los logros más espectaculares en el mejoramiento de la calidad proteínica de oleaginosas y leguminosas ha sido alcanzado al sobreexpresar en sus semillas la albúmina 2S proveniente de la nuez de Brasil. Esta proteína es extremadamente rica en aminoácidos azufrados, que llegan a representar hasta 26% de su contenido total de aminoácidos; las semillas transgénicas de canola, frijol nabo y soya presentaron un incremento significativo en los niveles de metionina, desde 33% hasta 300% (tabla 1) (10, 11, 12). A pesar de estos éxitos, dichos proyectos nunca pudieron llegar a la etapa de comercialización para su consumo; y el motivo es que esta albúmina es muy alergénica para el hombre tanto en su versión nativa como en la recombinante aislada de aquellos cultivos transgénicos. Esto basado en el hecho de que anticuerpos alergeno-específicos tipo inmunoglobulina E (IgE) de pacientes alérgicos dieron reacción cruzada con ambas proteínas 2S (12). Lo anterior condujo al abandono de dichos proyectos.

Por otro lado, sin duda alguna el amaranto es uno de los cultivos más antiguos, cuya presencia en Puebla, ha sido fechada en alrededor de seis mil años. Indudablemente, aparte de su versatilidad de uso como grano, verdura y/o forraje, sus características más sobresalientes son la cantidad y calidad de la proteína presente en sus semillas. El valor nutricional de las proteínas de la harina de amaranto es comparable a la de la caseína de la leche y de otras proteínas modelo de origen animal, y no se les ha asociado con reacción alergénica alguna (3, 13). Las albúminas y globulinas son las principales proteínas de reserva del amaranto, que en conjunto representan las dos terceras partes de la proteína total; el contenido de proteína puede ser de hasta 19% en base seca, muy superior cuando se compara con los niveles de los cereales tradicionales (10%) (7, 14). Dos son las proteínas más profundamente investigadas, la albúmina 2S y la amarantina (nombre con el que se ha bautizado en nuestro laboratorio a la globulina 11S). Ambas presentan un elevado valor nutricional-funcional con un sobresaliente perfil de aminoácidos esenciales que corresponde muy bien con los requerimientos establecidos por los organismos internacionales de salud (7, 14, 15).

Aunque la papa es una fuente por excelencia de almidón y otras materias primas para la industria de los alimentos, también presenta una muy baja cantidad de proteínas con pobre calidad siendo seriamente deficientes en lisina, tirosina, metionina y cisteína. Muy recientemente Chakraborty y col. (14) mejoraron el valor nutricional de una papa transgénica mediante la expresión del gene de la albúmina 2S de *Amaranthus*

Tabla 1
AVANCES SOBRESALIENTES EN EL MEJORAMIENTO DE LAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES, NUTRICIONALES Y NUTRACÉUTICAS DE CULTIVOS DE INTERÉS AGROALIMENTARIO EMPLEANDO BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR, Y SUS POTENCIALES USOS

Planta	*Estrategia molecular*	*Resultados y aplicaciones potenciales*	*País**	*Referencia*
Canola, Frijol y Soya Nabo	Sobreexpresión de albúmina 2S de la nuez de Brasil, inusualmente rica en aminoácidos azufrados	Sobresaliente incremento en niveles de metionina, muy alergénica para humanos, abandono de proyecto, no comercialización	Estados Unidos, Alemania, Estados Unidos	Altenbach y col. (10); Saalbach y col. (11); Nordlee y col. (12)
Papa	Hiperexpresión de albúmina 2S de amaranto con excelente perfil de aminoácidos esenciales	Espectacular mejoramiento de contenido de proteína y aminoácidos esenciales y no alergénica, nutrición humana	India	Chakraborty y col. (14)
Maíz	Sobreproducción de amarantina rica en aminoácidos esenciales	Mejoramiento de calidad nutricional, nutrición del hombre	México	Rascón-Cruz y Paredes-López (16)
Trigo	Expresión de subunidad GAMP de trigo	Aumento masivo de elasticidad de la masa de trigo, fortificación de harinas pobres, elaboración de pasteles y galletas	Inglaterra	Rooke y col. (19)
Canola	Hiperproducción de lauroil-ACP tioesterasa	Aumento en porcentaje de ácido láurico, aceite parcialmente	Estados Unidos	Voelker y col. (21)

		hidrogenado, confitería, sustituto de crema para café		
Soya	Cosupresión de oleoil desaturasa	Elevados niveles de ácido oleico, decremento significativo de grasas saturadas, mejor estabilidad térmica y oxidativa, beneficios a la salud	Estados Unidos	Kinney y Knowlton (24)
Tabaco	Expresión de una Δ6-ácido graso desaturasa	Elevada acumulación de ácido γ-linolénico y octadecatetraenoico, nutracéutico	Inglaterra	Sayanova y col. (23); Napier y Michaelson (22)
Papa	Inhibición por antisentido de SBEs A y B	Almidón rico en amilosa, agente gelificante, botanas crujientes, productos bajos en grasa y más saludables, almidón resistente (supresión de cáncer de colon)	Inglaterra	Schwall y col. (29)
Papa, Arroz	Supresión de actividad de GBSS	Almidón con altos niveles de amilopectina, agente espesante, mayor estabilidad y claridad de geles, reducida viscosidad	Holanda, Japón	Safford y col., (30); Terada y col. (31)
Arroz	Disminución de proteínas alergénicas por tecnología antisentido	Arroz hipoalergénico con niveles casi nulos de alergenos responsables de la alergia asma panadera	Japón	Nakamura y Matsuda (83)

ABREVIACIONES: ACC; ácido aminociclopropano-1-carboxílico, ACP; proteína acil-acarreadora, SBEs A y B; isoenzimas almidón ramificantes, GBSS; enzima almidón sintasa unida al gránulo, GAPM, gluteninas de alto peso molecular. *Donde aparece más de un país, el primero de ellos corresponde a la primera referencia (columna 5)que a su vez se refiere al primer cultivo transgénico (columna 1), y así sucesivamente.

hypochondriacus; afortunadamente esta proteína no es alergénica. La sobreexpresión de esta albúmina de amaranto en tubérculos ocasionó un impresionante aumento de proteína, alrededor de 40% con relación al nivel en la papa no modificada, y en todos los aminoácidos esenciales. De hecho, las mejores líneas mostraron un espectacular incremento de cuatro a ocho veces en los cuatro aminoácidos limitantes (tabla 1). Los análisis de alergenicidad en ratas indicaron que esta proteína fue incapaz de inducir anticuerpos IgE, lo que apoyó la hipótesis de que esta proteína no es alergénica.

El maíz y sus productos derivados han sido la base de la supervivencia y del desarrollo del pueblo mexicano por más de 3 500 años (6); pero como se ha señalado previamente, este cereal es deficiente en lisina y triptofano. Aparte de la estrategia genética tradicional utilizada en la obtención del QPM, en nuestro laboratorio se ha adoptado un interesante enfoque relativo a la transferencia del cDNA de la amarantina al maíz (16). Estudios previos han demostrado la funcionalidad de dicho cDNA en un sistema bacteriano, donde la amarantina recombinante exhibió propiedades fisicoquímicas y bioquímicas análogas a las de la globulina del grano (17).

Los análisis de las semillas de maíz transformado indican que la amarantina fue almacenada, procesada y ensamblada en el endospermo tal como ocurre en los cuerpos proteínicos del amaranto (16). Por supuesto, lo más importante desde el punto de vista alimentario es que se impactó de manera positiva la calidad nutricional del maíz modificado, que mostró un significativo aumento en lisina y triptofano así como en los restantes aminoácidos esenciales y en el contenido total de proteína (tabla 1). De esta forma, todo indica que este maíz diseñado que produce la amarantina es altamente nutritivo.

El gluten de trigo puede prepararse fácilmente de la harina de este cereal mediante un lavado suave con agua. La masa cohesiva resultante se compone de 70% de proteínas que son esencialmente prolaminas con sólo trazas de constituyentes distintos a estas proteínas de reserva. El gluten, que es una mezcla compleja de prolaminas, gluteninas y gliadinas (con alrededor de 50 componentes individuales), posee propiedades biomecánicas muy peculiares que le brinda a las harinas de trigo la capacidad de ser procesadas en productos como fideos, pastas, galletas, pasteles y pan (18). Así por ejemplo durante el horneado del pan, el gluten forma una estructura continua en la masa que le permite atrapar el dióxido de carbono desprendido en la fermentación. Existen diversas evi-

dencias que sugieren que son las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (GAPM), más que las gliadinas, las responsables de formar polímeros de alto peso molecular, que son estabilizados por puentes disulfuro, y de que son estos agregados proteínicos los que imparten la elasticidad al gluten. De hecho, la variación en esta propiedad funcional se ha correlacionado con el número de genes de subunidades GAPM expresadas, o con diferencias en las estructuras moleculares y propiedades de los polímeros de gluteninas y de sus subunidades constituyentes (18).

Partiendo de estos antecedentes, el grupo de Shewry ha logrado mejorar la elasticidad de la masa en una variedad de trigo pobre en esta propiedad, que de manera natural sólo presenta dos subunidades de GAPM endógenas. Para ello, estos investigadores elevaron de dos a tres o cuatro estas subunidades mediante la introducción de transgenes que codifican para las mismas. El aumento en número de subunidades se tradujo en un aumento en la elasticidad del gluten recombinante y un mejoramiento de la calidad de panificación, al compararla con la mostrada por el trigo control. Sin embargo, cuando las subunidades de GAPM excedieron el 20% de la totalidad de las proteínas, la elasticidad fue demasiada alta y la harina resultante demasiado fuerte para ser empleada directamente en la manufactura de pan; afortunadamente esta harina puede ser mezclada con harinas de trigo de calidad panadera pobre (tabla 1) (4, 18, 19).

Lípidos

Los lípidos, que incluyen ácidos grasos, esteroides, prostaglandinas, triglicéridos y ceras, son nutrientes relevantes en la dieta humana por su aportación calórica y aspectos nutracéuticos. Los ácidos grasos en su mayoría se encuentran unidos con el glicerol integrando una mezcla de triacilglicéridos, que forman los aceites y constituyen hasta el 60% del peso seco de las semillas oleaginosas; entre éstas sobresalen por sus elevados rendimientos la soya, colza, cacahuate, algodón, canola, girasol y maíz (20, 21).

Existe una amplia variedad de estructuras químicas en los lípidos que influye drásticamente en sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales e incluso nutracéuticas, y por lo tanto, en su valor comercial (20). De esta manera, los 210 tipos de ácidos grasos conocidos a la fecha indican un amplio reservorio genético; sin embargo, la gran mayoría de éstos ocu-

rre en plantas de pobres características agronómicas, mientras que el ácido palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico ($C18:1^{\Delta 5}$), linoleico ($C18:2^{\Delta 5,12}$) y linolénico ($C18:3^{\Delta 6,9,12}$) son los ácidos grasos más comunes en los aceites de plantas oleaginosas convencionales (21).

Empleando la biotecnología molecular ha sido factible diseñar aceites vegetales con aplicaciones novedosas en los alimentos o como agentes nutracéuticos y farmacéuticos. Aunque los aceites de coco y de palma contienen altas concentraciones de ácido laúrico (C12:0), un ácido graso saturado, estos cultivos presentan una limitada importancia agrícola a escala mundial ya que sólo se siembran en ciertas regiones del planeta. Abordando este problema, la empresa Calgene de EUA introdujo en cultivos de canola un gene que codifica para una enzima llamada lauril-ACP tioesterasa proveniente del árbol de laurel californiano, y que tiene la capacidad de hidrolizar el complejo lauril-ACP , causando la terminación prematura del proceso de alargamiento de la cadena conducente a la síntesis del ácido esteárico (C18:0) (figura 1). En consecuencia la línea transgénica produce un aceite rico en laurato, que de manera natural se encuentra en niveles bajos en esta oleaginosa. El aceite de canola transgénica acumula de 40 a 50% de ácido laúrico y es comercializado como un aceite parcialmente hidrogenado bajo el nombre de Laurical. Sus aplicaciones incluyen productos de confitería, sustituto de crema para café, cremas batidas, betunes, jabones e incluso en el área de cosméticos (tabla 1) (21).

Investigaciones clínicas diversas indican que el consumo de ácidos grasos saturados como el palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) está implicado en enfermedades cardiacas, apoplejía e incluso cáncer (20), por lo que una dieta con una alta relación de ácidos polinsaturados a saturados, reduce el riesgo de estos padecimientos. Los ácidos grasos polinsaturados son ácidos de cadena larga con dos o más insaturaciones; como ejemplos tenemos a los ácidos linoleico y α-linolénico, los cuales por reacciones de desaturación y alargamiento producen los correspondientes ácidos eicosapentaenoico y araquidónico (figura 1). Por otra parte, recientes estudios médicos han indicado que los ácidos eicosapentaenoico, araquidónico (componente vital de la leche materna), y el docosahexaenoico, son importantes para la salud de los neonatos, para el desarrollo normal del cerebro y los ojos, así como en la prevención de enfermedades cardiovasculares y renales. Esto se debe a que todos ellos son precursores de eicosanoides como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos, los que a su vez tienen funciones indispensables en la coordinación

del sistema nervioso, contracción muscular, agregación plaquetaria, sistema cardiaco y papeles regulatorios en la reproducción, además de que actúan como agentes reductores del colesterol sanguíneo (20, 22).

Sin embargo, estos compuestos se encuentran distribuidos en cantidades limitadas mayoritariamente en algunos hongos, aceite de pescado, ciertas especies de plantas inferiores, y en algunos cultivos de importancia agroalimentaria, por lo que está claro que la producción de dichos ácidos poliinsaturados a gran escala es necesaria para cubrir las necesidades de los mercados en constante expansión. En este sentido, de manera interesante al expresar de forma constitutiva en tabaco el gene que codifica para la enzima desaturasa de un ácido graso proveniente de borraja (*Borago officinalis* L.), no sólo se observó un aumento significativo en la acumulación del ácido γ-linolénico en tabaco, sino que además se produjo el ácido octadecatetraenoico, a partir de la desaturación del ácido γ-linolénico [figura 1, (n-3), tabla 1] (23). En función de estos resultados, la producción del ácido γ-linolénico podría ser facilitada en semillas oleaginosas ricas en precursores del ácido linoleico pero que carecen de niveles significativos de ácido γ-linolénico, tales como el girasol. En contraste, cultivos tales como el lino, con un alto contenido de ácido γ-linolénico, podrían permitir preferentemente la acumulación del ácido octadecatetraenoico (22).

A pesar de las bondades terapéuticas de los ácidos grasos polinsaturados, éstos son muy inestables; de hecho cuando no están protegidos por antioxidantes, forman productos tóxicos al ser expuestos a la luz, al oxígeno y particularmente a las altas temperaturas que se utilizan para freír los alimentos; esto se ve reflejado en una disminución de su estabilidad y vida de anaquel. Un acontecimiento exitoso a este respecto involucra la supresión de la actividad de la enzima oleoil desaturasa en soya; como resultado, los niveles de ácido oleico se incrementaron a más de 85% del total de ácidos grasos (comparado con el 25% en la soya testigo), y de manera interesante, el contenido de ácidos grasos saturados disminuyó de más de 15% a un valor inferior al 5% (figura 1, tabla 1) (24). Las expectativas de esta soya rica en ácido oleico son de mejores beneficios a la salud así como una mejor estabilidad térmica y oxidativa, y un aumento en la vida de anaquel de hasta siete veces comparado con el producto convencional.

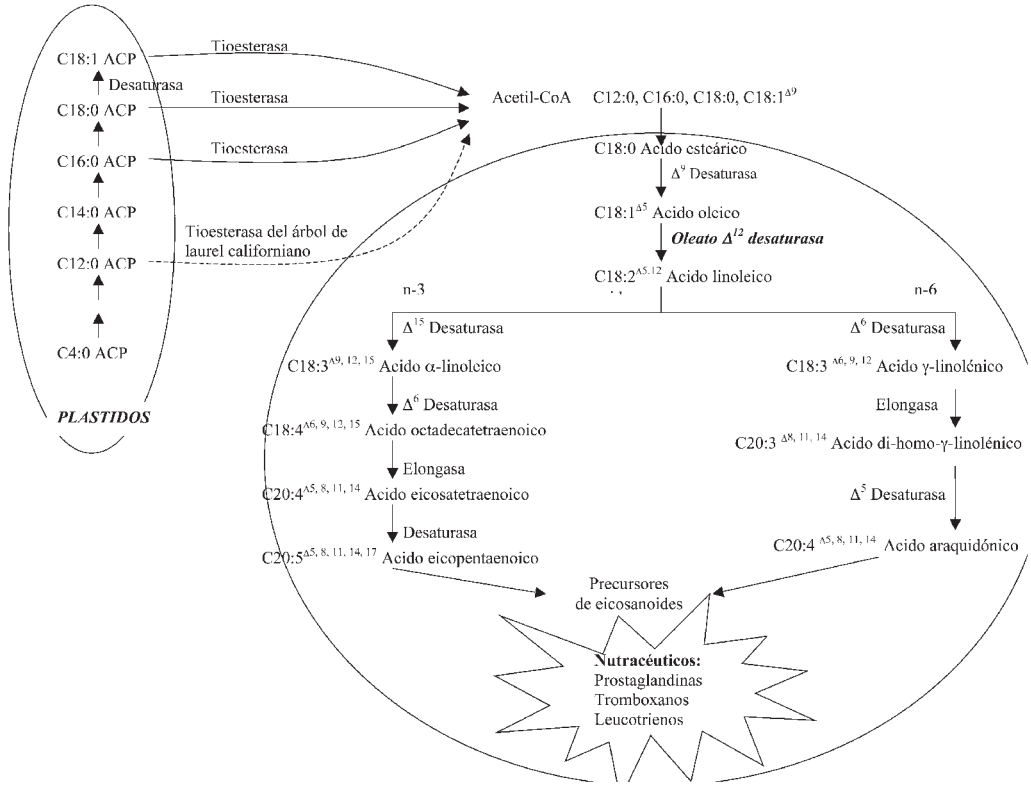

C18:1 ACP
Desaturasa
C18:0 ACP
C16:0 ACP
C14:0 ACP
C12:0 ACP
C4:0 ACP
PLASTIDOS
Tioesterasa
Tioesterasa
Tioesterasa
Tioesterasa del árbol de laurel californiano
Acetil-CoA
C12:0, C16:0, C18:0, C18:1Δ9
C18:0 Acido esteárico
Δ9 Desaturasa
C18:1Δ5 Acido oleico
Oleato Δ12 desaturasa
C18:2Δ5,12 Acido linoleico
n-3
n-6
Δ15 Desaturasa
Δ6 Desaturasa
C18:3Δ9, 12, 15 Acido α-linoleico
C18:3 Δ6, 9, 12 Acido γ-linolénico
Δ6 Desaturasa
Elongasa
C18:4Δ6, 9, 12, 15 Acido octadecatetraenoico
C20:3 Δ8, 11, 14 Acido di-homo-γ-linolénico
Elongasa
Δ5 Desaturasa
C20:4Δ5, 8, 11, 14 Acido eicosatetraenoico
Desaturasa
C20:5Δ5, 8, 11, 14, 17 Acido eicopentaenoico
C20:4 Δ5, 8, 11, 14 Acido araquidónico
Precursores de eicosanoides
Nutracéuticos:
Prostaglandinas
Tromboxanos
Leucotrienos

Figura 1

REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS
Y SU METABOLISMO EN PLANTAS Y ANIMALES

En los plástidos el malonil-CoA es utilizado por el complejo enzimático ácido graso sintasa (FAS, fatty acid synthase), que a través de ciclos de condensación adhiere dos unidades de carbono a la cadena acilo creciente, la cual se encuentra unida a un cofactor, la proteína acil-acarreadora (ACP, acyl-carrier protein) dando lugar a C8-C18 saturados. En la mayoría de las plantas las acil-ACP tioesterasas hidrolizan los complejos acil-ACP liberando los ácidos grasos, y usualmente tienen preferencia por C16 y C18 dando lugar al ácido palmítico (C16:0), que a su vez puede elongarse para producir ácido esteárico (C18:0). Según la especie, los ácidos pueden ser insaturados por una variedad de acil-ACP desaturasas solubles, aunque generalmente la estearoil-ACP desaturasa introduce la primera insaturación en el estearoil-ACP (C18:0-ACP) produciendo oleoil-ACP (C18:1D9-ACP); éste es un metabolito central y que puede estar sujeto a modificaciones diversas por desaturasas, aciltransferasas y elongasas.

Los humanos carecen de la enzima oleato D12 desaturasa, de tal suerte que tanto el ácido linoleico como el α-linolénico deben ser suministrados por la dieta. Dichos ácidos grasos esenciales sirven como sustratos para las rutas n-3 y n-6, las cuales conducen a la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Enseguida estos compuestos son metabolizados para dar lugar a importantes nutracéuticos. Adaptada de Somerville y col. (20); Napier y Michaelson (22).

Anualmente se generan de veinte a treinta millones de toneladas de almidón principalmente de maíz, aunque la mandioca, papa, trigo y arroz son también una fuente importante de este polisacárido (25). En general, el almidón está conformado por dos unidades poliméricas: la amilosa, un polímero esencialmente lineal en el cual la glucosa presenta enlaces glicosídicos α-1,4 y con puntos de ramificación α-1,6 en un 0.1%; la amilopectina es el otro constituyente con un peso molecular mayor al de la amilosa y con una mayor frecuencia de puntos de ramificación (26, 27).

A pesar de que el almidón está constituido por unidades de glucosa, la gran diversidad estructural establece que el almidón derivado de una planta es específico de ésta (26, 27). La longitud de la cadena, el grado de ramificación y la proporción relativa de unidades de amilosa y amilopectina influyen en algunas propiedades físicas y químicas del almidón, y por lo tanto en sus potenciales aplicaciones industriales y biotecnológicas (28).

En la industria alimentaria, el almidón con elevados niveles de amilosa presenta una gran demanda debido a sus propiedades funcionales únicas como agente gelificante, y en la obtención de alimentos bajos en grasa ya que este tipo de carbohidrato impide la penetración de aceites en alimentos cocinados (28). Desafortunadamente, sólo muy pocos cultivos ricos en amilosa son explotados comercialmente, y como ejemplo podemos citar a algunas mutantes de maíz (*ae, amylose extender*), de arroz y la mutante rugosa del chícharo (*r*) que exhiben una reducción en la actividad de algunas isoformas de la enzima almidón ramificante (SBE, *starch branching enzyme*). Tales mutantes permiten una acumulación de altas cantidades de amilosa así como de moléculas de amilopectina más largas; sin embargo, todas ellas presentan niveles reducidos de almidón (3, 28).

Schwall y col. (29) lograron la obtención de papas transgénicas con alto contenido de amilosa inhibiendo por antisentido hasta en un 99% la actividad de dos isoenzimas (SBE A y B) (figura 2). El almidón de las papas normales contiene 20% de amilosa en contraste con las papas transformadas que acumularon hasta 90% de este polímero, nivel comparado a los de los almidones de maíz los cuales tienen gran demanda

en el mercado y son ampliamente utilizados en la industria de los alimentos (tabla 1). En cuanto a los beneficios directos al consumidor, hay un particular interés en el uso de almidones con altos niveles de amilosa como fuentes de almidón resistente el cual puede actuar como fibra dietaria. En particular, se ha observado que la supervivencia de gránulos de almidón de maíz rico en amilosa, durante su paso por el sistema digestivo monogástrico hacia el intestino grueso, promueve la generación de ácidos grasos de cadena corta, los cuales están asociados con la formación de un bolo saludable y la supresión de cáncer en el colon (18, 26).

Por otra parte, los almidones con un contenido normal de amilosa (20 a 30%) forman una pasta que carece de claridad y con tendencia a retrogradarse (recristalizarse). La almidón sintasa unida al gránulo (GBSS, *granule-bound starch synthase*) es la enzima responsable del alargamiento de la cadena α-1,4 presente en la amilosa (figura 2). Desde hace tiempo se sabe que algunas especies de maíz, arroz, cebada, papa y amaranto, con una mutación en el gene que codifica para esta enzima, sintetizan un almidón que carece de la fracción de amilosa (mutante cerosa o *waxy* en inglés) (3, 25, 27). El maíz *ceroso* ha sido cultivado comercialmente; sin embargo, muchas de las mutantes naturales presentan rendimientos reducidos para ser industrialmente viables (28); por lo tanto, la producción de un cultivo que produzca almidón constituido primariamente por amilopectina es considerado de alto valor.

Mediante la biotecnología molecular o por técnicas de mutación, se desarrollaron papas libres de amilosa reduciendo drásticamente la actividad de GBSS (figura 2, tabla 2). En 1997 se cultivaron en los Países Bajos 2000 Ha de estas plantas transgénicas cerosas, reportándose un cambio significativo en la claridad de la pasta almidonosa después de ser almacenada a bajas temperaturas. Estos resultados sugieren que el almidón de estas papas *cerosas* puede servir como agente espesante en alimentos donde la turbiedad es indeseable (30). De igual manera, se han obtenido líneas transgénicas de arroz *ceroso* usando técnicas antisentido para reducir la expresión del gene *ceroso*, que codifica para la enzima GBSS, produciendo una reducción de amilosa en un 90% con respecto a las plantas de arroz originales o aun la ausencia completa de este componente (figura 2, tabla 2). Las semillas de este tipo de arroz presentaron un color blanco opaco (31).

Tab
MANIPULACIÓN POR BIOTECNOLOGÍA MOL
Y NUTRACÉUTICOS SELECTOS EN
REQUERIMIENTOS DIARIOS E

Micronutriente/ nutracéutico	*Máxima RDA adultoΩ (relativa a RDA)#*	*Ingesta máxima segura*	*Planta transgénica*
Vitamina A	1 mg REß 100× (b-	5× (Retinol) caroteno)	Tomate, Arroz*, Canola,
Vitamina E	10 mg TE∂	100×	*Arabidopsis*
Vitamina C	60 mg	16×	Tabaco, Lechuga
Minerales			
Hierro	15 mg	5×	Arroz
Zinc	15 mg	———	———
Calcio	1200 mg	2×	
Fósforo	1000 mg	———	Tabaco Canola, Soya, Arroz, Trigo
Flavonoides Bioactivos Antocianinas	———	———	Maíz

Resultados y comentarios	*País*	*Referencia*
Elevados niveles provitamina A y otros carotenoides terapéuticos, combatir deficiencias de vitamina A, prevenir o reducir incidencia de cáncer de esófago, enfermedades crónicas degenerativas visuales y del corazón y otras	Inglaterra, Suiza, Estados Unidos	Romer y col. (60); Ye y col. (66); Shewmaker y col.(65)
Incremento en cantidades de a-tocoferol, mejoramiento de actividad de vitamina E, nutracéutico	Estados Unidos	Shintani y DellaPenna (52)
Mejor poder antioxidante y biodisponibilidad de hierro, disminuir o eliminar requerimientos de bisulfitos para prevenir obscurecimiento en lechuga	Estados Unidos	Jain y Nessler (54)
Cantidad elevada de Fe y biodisponible para ratas anémicas al reducir cantidad de ácido fítico y almacenarse en ferritina, combatir anemia y otras enfermedades, nutracéutico. Mejoramiento absorción de zinc y calcio.	Suiza, Japón	Lucca y col. (46); Goto y col. (45); Murray-Kolb y col. (47)
Reducción significativa de ácido fítico, mayor biodisponibilidad de minerales, menor contaminación del ambiente	Suiza	Frossard y col. (39)
Incremento en acumulación de antocianinas,	Estados	Bruce y col.

Flavonol	———	———	Tomate
Isoflavonas (genisteína y daidzeína)	———	———	Maíz

Ω Requerimiento mínimo diario o RDA (US Recomended Dietary Allowance) por día. Los valores re o en lactancia. #El límite de ingesta máxima segura, excluye también a mujeres embarazadas o en lac variaciones individuales en los requerimientos y tolerancia a elevados niveles. ßLa actividad de vitami retinol, 6 mg de todo-trans-b-caroteno o 12 mg de otros carotenoides precursores de la provitamina A. de vitamina E es definida en términos de Equivalentes de a-Tocoferol (a-TE) donde un equivalente de Guzmán-Maldonado y Paredes-López (3); Osuna-Castro y Paredes-López (1); Fenech, (38).

revenir o reducir incidencia de diversos tipos de cáncer y enfermedades del corazón	Unidos	(72)
Aumento de 780% en concentración de quercetina en fruto y su pasta presentó 21 veces el nivel de este flavonol que la de un tomate ordinario. Mejoramiento de actividad antioxidante, aminorar o prevenir problemas cardiovasculares	Inglaterra	Muir y col. (75)
Fitoestrógenos, disminuir niveles de colesterol y riesgos de cáncer de pecho y próstata, enfermedades del corazón y osteoporosis, al mejorar biodisponibilidad de calcio	Estados Unidos	Yu y col.(74)

presentan los más altos niveles RDA para hombres o mujeres adultos, excepto para mujeres embarazadas
tancia, está relacionado con una baja probabilidad de efectos secundarios adversos y toma en cuenta
na A es expresada en Equivalentes de Retinol (RE). Una unidad de RE es igual a 1 mg de todo-trans-
*Este tipo de arroz rico en b-carotenos es llamado Golden Rice (arroz dorado). La actividad biológica
a-tocoferol (TE) es igual a 1 mg de (R,R,R)-a-tocoferol. Adaptado y modificado de DellaPenna (33);

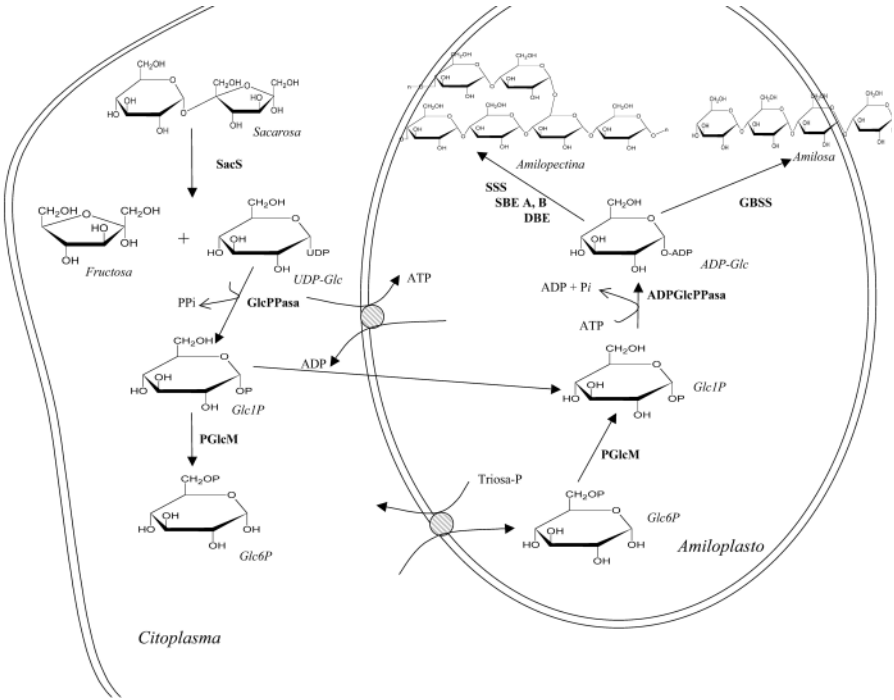


Figura 2

PRINCIPALES REACCIONES BIOQUÍMICAS EN LA SÍNTESIS DEL ALMIDÓN EN PLANTAS

La sacarosa, primer producto fotosintético, es hidrolizada por la enzima sacarosa sintasa (SacS), produciendo fructosa y UDP-glucosa. Esta última es convertida a glucosa-1-fosfato (Glc1P) por acción de la glucosa pirofosforilasa (GlcPPasa) y puede dirigirse al amiloplasto o es transformada a Glc6P por una fosfoglucomutasa (PGlcM). La Glc6P se transporta al amiloplasto por una proteína que intercambia Glc6P por fosfato o triosa fosfato. Una vez en el amiloplasto, la Glc6P se convierte a Glc1P por la enzima PGlcM plastídica, y posteriormente la ADP glucosa fosforilasa (ADPGlcPPasa) la transforma a ADP-glucosa (ADP-Glc) en una reacción dependiente de ATP. Posteriormente la ADP-Glc es sustrato de la almidón sintasa unida al gránulo (GBSS, granule-bound starch synthase), responsable de la síntesis de amilosa, catalizando el alargamiento de la cadena transfiriendo unidades de glucosa de ADP-Glc a la cadena de α-1,4-glucano. Por otra parte, en la formación de la amilopectina están involucradas las enzimas almidón ramificante (SBE, starch branching enzyme) y almidón sintasa soluble (SSS, *soluble starch synthase*); estas enzimas llevan a cabo la ruptura de parte de la cadena α-1,4-glucano con la subsecuente religación a través de un enlace α-1,6. La estructura de la amilopectina no es únicamente debida a SBE y SSS, sino que además necesita de una actividad desramificante (DBE, *debranching enzyme*). Así cada enzima juega un papel único en la produción de amilosa y amilopectina. Adaptada y modificada de Slattery y col. (28); Denyer y col. (27).

Son evidentes los altos beneficios en el ambiente y en la industria, si cultivos como la papa, amaranto y el arroz rico en amilopectina son introducidos al mercado. Debido a que este tipo de carbohidrato muestra una viscosidad reducida, gran parte de la pérdida de la estabilidad se debe a los ciclos de congelamiento-descongelamiento, proceso muy utilizado en la industria alimentaria y que constituye un problema para el almidón convencional. Éste sufre una reasociación de sus cadenas (retrodegradación) resultando en una sinérisis (separación del gel en una fase líquida y otra sólida), que deteriora la calidad del producto; por lo que el uso de cultivos ricos en amilopectinas podría eliminar la necesidad de tratamientos químicos costosos que normalmente son utilizados para alcanzar estas funcionalidades (26, 28).

Micronutrientes

Actualmente, más de dos mil millones de personas, una tercera parte de la población mundial, sufren deficiencias de vitamina A y/o hierro, mientras que alrededor de 1 500 millones presentan deficiencias de yodo o viven en riesgo. A este grupo de micronutrientes debe ser incorporado el zinc, que en opinión de los especialistas en nutrición, su deficiencia es tan importante como la de hierro. Además, se estima que para el año 2020 la población del mundo llegará a los 8 300 millones de seres humanos y la mayoría de este incremento ocurrirá en las ciudades de los países subdesarrollados, donde la deficiencia de tales micronutrientes así como las enfermedades y mortandad asociadas son muy elevadas (32).

El inadecuado consumo de otros micronutrientes tales como selenio, cobre, ácido fólico, vitaminas C, D, y E, tiamina, vitamina B_{12} y niacina, también está deteriorando la salud y productividad de un gran número de habitantes del mundo en vías de desarrollo (e incluso en los de los países desarrollados, donde la abundancia y variedad de alimentos son excelentes, pero los hábitos alimentarios pobres son frecuentes), especialmente en mujeres de bajos recursos, niños e infantes. Sin embargo, para estos micronutrientes no existen datos disponibles para cuantificar los grados de deficiencia a nivel mundial (32, 33).

Mientras los cuatro principales micronutrientes (hierro, yodo, vitamina A y zinc) no sólo son trascendentes e indispensables en virtud de la cantidad de personas del mundo cuya dieta es inadecuada o deficiente en ellos, sino que son denominados como tal debido a que sus deficien-

cias comprometen el sistema inmune y pueden además retardar de manera irreversible, dependiendo de la severidad de la deficiencia, el desarrollo del cerebro del feto en el útero e incluso dos años después del parto (34, 35). Esto significa que deficiencias en cualquiera de ellos durante el embarazo o la lactancia pueden conducir a daños graves en el niño, lo que impide que desarrolle todo su potencial cognoscitivo (35, 36).

Los alimentos de origen vegetal presentan una diversa y abundante gama de vitaminas, minerales y fitoquímicos o nutracéuticos únicos, que son críticos y/o benéficos para la salud del ser humano, ya que pueden protegerlo contra enfermedades y proporcionarle bienestar. Por esto, en teoría, una dieta basada en plantas alimenticias podría asegurar una adecuada nutrición de los humanos en todas las etapas de su vida, con excepción de las vitaminas B_{12} y D. Sin embargo, en la práctica, la realidad es muy distinta; los niveles de micronutrientes dietarios varían grandemente por lo que su ingesta es dependiente de la fuente vegetal alimentaria (37). Desafortunadamente mucha gente no tiene acceso a una dieta suficientemente diversa; de hecho en los países en desarrollo numerosas familias de escasos recursos económicos subsisten con una dieta muy simple compuesta primordialmente de granos (arroz, trigo, frijol, soya y maíz) que usualmente son pobres en algunos macronutrientes y muchos micronutrientes (32, 33). Así el consumo monótono de cereales, leguminosas, vegetales frescos, tubérculos y raíces, en la ausencia de tejido animal, puede conducir a serias deficiencias de vitaminas y minerales esenciales ya que diecisiete minerales y trece vitaminas son requeridos en niveles mínimos para aliviar desórdenes nutricionales específicos (2, 33).

Por otra parte, un cuerpo creciente de evidencias médico-científicas indica que la ingesta elevada de vitaminas y minerales específicos como vitaminas E y C, carotenoides y selenio, por encima de los requerimientos mínimos diarios (RDA, del inglés *Recommended Daily Allowance*), puede reducir en forma significativa el riesgo de muchas enfermedades (tabla 2) (38).

Es evidente que para asegurar una nutrición adecuada con todos los micronutrientes esenciales así como para obtener los beneficios terapéuticos de ellos y de otros nutracéuticos (por ejemplo carotenoides diferentes de la provitamina A y flavonoides), en todo el mundo, incluyendo a las naciones del primer mundo, se debe realizar un esfuerzo especial para mejorar de manera simultánea la calidad nutricional y nutracéutica de las plantas con respecto a la composición, concentración y, algo muy importante, la biodisponibilidad de dichos microcomponentes (tabla 2). La biotecnología moderna puede jugar un papel sobresa-

liente, fortaleciendo directamente los cultivos agroalimentarios, incrementando la cantidad y/o la biodisponibilidad de micronutrientes para humanos e incluso para animales domésticos. Sin embargo, antes de intentar llevar a cabo el fortalecimiento a nivel molecular en dichos cultivos, es de suma importancia preguntarse sobre los compuestos susceptibles de modificar así como la factibilidad de aumentar sus niveles en las partes comestibles sin que se vea comprometida la fisiología, vigor y vida de la planta o semilla, la eficacia de los compuestos, y tener en mente si un exceso de ellos, de acuerdo con los requerimientos, pudiese afectar de manera adversa la salud del hombre (32, 34, 35). Afortunadamente, los niveles máximos tolerables por humanos para esos minerales fluctúan entre 1 y 13 veces los valores RDA, mientras que en el caso de las vitaminas son más altos (tabla 2). Un punto clave en el área de investigación de micronutrientes es que, a diferencia de los macronutrientes que pueden representar hasta el 30-40% del peso seco de un tejido, estos compuestos usualmente constituyen de manera individual menos del 0.1%, lo que en principio permitiría tener un mayor rango de manipulación (33, 37).

Minerales

El contenido de vitaminas y minerales de los alimentos debería ser considerado al mismo tiempo que su biodisponibilidad (3, 39), ya que la cantidad total, o concentración absoluta, de un determinado nutriente en un alimento dado no siempre es un indicador útil y confiable de su calidad nutricional, debido a que no todos los nutrientes del alimento son absorbidos en su totalidad. Los nutriólogos emplean el término biodisponibilidad o disponibilidad biológica para referirse a la fracción de nutrientes ingeridos que es digerida, absorbida y finalmente utilizada por el cuerpo para las funciones fisiológicas normales, o bien, en su defecto, almacenada. Uno de los principales determinantes de la disponibilidad biológica es la proporción que es absorbida en el tracto gastrointestinal. Dicha disponibilidad es una función de si el micronutriente está en la forma química apropiada (es decir con o sin carga, o constituyendo complejos), de si los sistemas de transporte relacionados con la absorción están en su lugar en el intestino y de si funcionan adecuadamente (todo esto depende a su vez, en parte, del estatus nutricional del individuo en cuestión), y de si en la matriz del alimento existen o no com-

puestos promotores o inhibidores de tal disponibilidad (32, 40). De esta manera, la biodisponibilidad de los micronutrientes varía grandemente, y debe ser seriamente tomada en cuenta para evaluar si una determinada dieta posee bajos, suficientes, o elevados niveles de microcomponentes dietarios (3).

Los minerales de fuentes vegetales, particularmente aquellos de semillas comestibles, son menos bioaccesibles que los provenientes de animales, debido en parte a la presencia de compuestos llamados "antinutricionales" tales como ácidos fítico y oxálico, taninos, otros polifenoles, y fibras presentes en las plantas. Dichos factores antinutricionales secuestran en el tracto gastrointestinal de los animales, mediante el fenómeno de quelación, a los minerales dietarios (Fe, Ca, Zn), reduciendo sensiblemente su biodisponibilidad (32, 35, 40).

Por otro lado, las tres estrategias más ampliamente reconocidas y empleadas para combatir eficiencias de micronutrientes en el mundo son: suplementación con preparaciones farmacéuticas; fortificación de alimentos, que se refiere a la incorporación de nutrientes a niveles superiores a aquellos existentes en el alimento original o uno comparable; y finalmente la diversificación de la dieta (39). Las dos primeras han tratado los síntomas de este tipo de malnutrición pero no han atacado el problema desde la raíz, es decir, las causas.

Aunque muchas de esas intervenciones han sido exitosas en el corto plazo, al lograr un rápido mejoramiento del estatus nutricional de los micronutrientes en individuos deficientes que tienen accesos a ellos, son insostenibles por lo caro que resultan e incapaces de llegar a toda la gente afectada. Además es muy probable que los grupos humanos deficientes o con mayores riesgos vivan en regiones pobres y remotas donde no se tiene fácil acceso a una clínica o a alimentos procesados y/o fortificados (32, 39).

A pesar de los programas de suplementación y fortificación, el problema se sigue incrementando día con día y México no es la excepción. Existe evidencia documentada de desnutrición por deficiencias de micronutrimentos entre la población de México, especialmente en las regiones rurales y marginales; este padecimiento afecta principalmente a niños menores de cinco años y, mujeres gestantes y en periodos de lactancia. De hecho, datos proporcionados por la UNICEF (ONU) son alarmantes e indican que alrededor de 43% de los mexicanos sufre algún tipo de malnutrición sobresaliendo la de proteínas, hierro, vitamina A y algunas de vitaminas del complejo B. Además, de acuerdo con la Secretaría de Salud

de México, 2.4 millones de niños de nuestro país presentan graves retardos en su crecimiento y desarrollo, y de ese número el 85% viven en los estados del sureste y centro del país, que son de los más pobres (41). Un estudio llevado a cabo en el territorio nacional en 1999, reveló que la ingesta de hierro, zinc, y vitaminas A y C de los infantes menores de cinco años de las áreas rurales y marginales era baja con respecto a los requerimientos diarios, reportándose que existe una prevalencia de anemia de hasta 50% en infantes de 12 a 23 meses de edad (42). También es conocido que existe un bajo consumo de vitamina B_6 y riboflavina, y que en las comunidades no urbanas se han encontrado evidencias bioquímicas de deficiencia de hierro, zinc y las vitaminas A, C y B_{12} (42).

Recientemente, la biotecnología molecular ha emergido como una cuarta estrategia que ha cobrado mucha importancia como solución potencial proponiéndose a su vez tres enfoques: 1) elevar la concentración de minerales en tejidos comestibles (por ejemplo, endospermos de cereales), 2) incrementar los niveles de compuestos que mejoran el uso de los minerales, y 3) disminuir factores antinutricionales tales como el ácido fítico (40). Todo ello se trata enseguida.

Hierro. El hierro es requerido en el hombre para sintetizar proteínas de transporte de oxígeno (hemoglobina y mioglobina), y otras proteínas y enzimas hemo que son particularmente importantes en la producción de energía y en la función del sistema inmune. De manera general, una inadecuada absorción de hierro conducirá primero a una movilización del mineral almacenado y luego se producirá una disminución en los niveles de hemoglobina con la subsecuente manifestación de la anemia (39).

El hierro dietario está constituido de hierro hemo (de origen animal) y no hemo (sales inorgánicas de hierro principalmente de fuente vegetal); el primero es absorbido por una ruta distinta y de una manera más eficiente que el no hemo. Además, generalmente la biodisponibilidad de este último es muy baja (1-10%) debido a su pobre solubilidad e interacción con otros componentes de la dieta (36, 39).

Por otro lado, existen varios enfoques atractivos que podrían ser utilizados para incrementar el contenido de hierro y su biodisponibilidad, de forma simultánea, en las partes comestibles de granos agroalimentarios usando para ello biotecnología molecular, y uno de ellos es elevar los niveles de ferritina. La ferritina es una proteína multimérica compuesta de 24 subunidades y su estructura molecular es altamente conservada entre animales, plantas y bacterias (43). Es capaz de almacenar hasta 4 500 átomos de hierro en una forma no tóxica y biológicamente disponible;

de hecho, estudios recientes han mostrado que el hierro de las ferritinas de plantas y animales puede ser exitosamente usado por ratas y seres humanos anémicos, logrando recuperarse adecuadamente de dicha enfermedad (44).

Con la finalidad de incrementar el contenido de este mineral en arroz, dos grupos distintos de investigación lograron expresar de manera específica en el endospermo de este cereal un gene de la ferritina de frijol o de soya. En ambos casos la ferritina vegetal recombinante fue producida en niveles elevados, correctamente procesada y acumulada en el endospermo. Cabe destacar que, la cantidad de hierro del arroz con ferritina de frijol fue de 22.1 μg/g de peso seco mientras que el transformado con la proteína de soya almacenó hasta 31.8 μg/g en la misma base, representando lo anterior un aumento de hasta dos y tres veces sobre los niveles de este mineral presentes en las semillas convencionales no transgénicas (10-11μg/g de peso seco) (45, 46). Estos mejoramientos son de alto significado nutricional, ya que un consumo de 300 g de los arroces mejorados por parte de un adulto sería suficiente para suministrarle 50-75% de sus requerimientos diarios de este micronutriente, que son de alrededor de 13-15 mg (tabla 2).

Cuando el arroz transformado con la ferritina de soya fue consumido por ratas anémicas, éstas fueron capaces de emplearlo como fuente de hierro altamente biodisponible tanto como el $FeSO_4$, compuesto usado de manera efectiva en suplementos farmacéuticos en seres humanos con anemia, curándose de esta enfermedad (tabla 2) (47). Estos avances muestran la factibilidad de producir ferritina en este importante cultivo agroalimentario, como una fuente barata de hierro bioaccesible. A pesar de que aún faltan investigaciones tendientes a demostrar su utilidad nutricional en la dieta del hombre, estos conocimientos se pueden expandir y aplicar a otros cultivos.

Zinc. El zinc puede actuar como un estabilizador de estructuras de membranas y componentes celulares. Bioquímicamente funciona como un elemento esencial de un gran número de enzimas dependientes de zinc que participan en la síntesis y degradación de macromoléculas, así como en la cicatrización de heridas. Mecanísticamente el zinc está involucrado en los procesos de estabilidad genética y expresión de genes en una variedad de formas incluyendo la estructura de la cromatina, la replicación y transcripción del DNA a través de la actividad de factores de transcripción, RNA y DNA polimerasas, así como también jugando un papel sobresaliente en la reparación del DNA dañado y en la muerte celu-

lar programada (48). Todas estas características proveen al zinc una función esencial y única para el crecimiento y desarrollo saludable de los seres humanos. De hecho en el hombre están muy bien establecidos los requerimientos de este metal para el adecuado crecimiento y división celular; y varios estudios sugieren que la síntesis de DNA y división celular son muy susceptibles a la deficiencia de zinc (tabla 2). Por otro lado, la deficiencia de zinc en humanos reduce el apetito, madurez sexual, defensas del sistema inmune y la capacidad de aprendizaje, además puede conducir a alteraciones en el crecimiento y desarrollo del cerebro y es una de las principales causas del cáncer de esófago (39). A pesar de lo comentado con anterioridad, su deficiencia ha sido reconocida sólo recientemente y ha emergido como un serio problema de salud pública con dimensiones mundiales (48).

Calcio. El calcio es necesario para el crecimiento y desarrollo normal del esqueleto humano; se acumula a una velocidad de 150 mg por día durante el desarrollo del esqueleto hasta alrededor de los veinte a veinticinco años de edad, cuando se alcanza el pico máximo de la masa del hueso. La masa del hueso es estable hasta los 50 años en los hombres o antes de la menopausia en el caso de las mujeres (39). Pasando esos tiempos, el balance de este mineral se vuelve negativo, ya que se empieza a perder de los diversos sitios de la estructura esquelética, lo cual está relacionado con un marcado incremento en la tasa de fractura en ambos sexos, pero particularmente en el femenino. La osteoporosis se caracteriza por un deterioro de la microarquitectura del tejido del hueso, lo que aumenta su fragilidad y por lo tanto el riesgo de fracturas. La deficiencia de calcio no sólo está vinculada con la osteoporosis, sino también con el cáncer de colon y la hipertensión. De esta manera, el consumo adecuado de calcio durante la adolescencia es crítico y de suma relevancia para la edad adulta. Las más importantes fuentes de calcio son la leche y productos lácteos, pero una vez más esos tipos de alimentos son escasos en el régimen alimentario de la gente que vive en los países menos desarrollados; en México la tortilla es la fuente por excelencia.

Ácido fítico y fósforo. Normalmente, las semillas acumulan fósforo en exceso con relación al requerido para llevar a cabo sus funciones celulares básicas. En las semillas dicho sobrante es incorporado en una pequeña molécula unitaria conocida como ácido fítico [ácido mio-inositol hexafosfórico o mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihidrógeno fosfato)]. Típicamente, los granos poseen alrededor de 10 mg ácido fítico/g, llegando a representar 60-85% del fósforo total presente en la semilla (49).

Una vez sintetizado, la mayor parte de este ácido es depositada como una mezcla de fitatos o fitina (una sal de potasio, magnesio, hierro y zinc) en las partes comestibles de los granos agroalimentarios. Durante la germinación, las sales de fitatos son hidrolizadas por la acción de enzimas específicas, las fitasas, liberando fósforo y mio-inositol para su uso en el periodo de crecimiento de la nueva plántula. Desafortunadamente, el ácido fítico es un efectivo y fuerte agente quelante de minerales catiónicos nutricionalmente importantes tales como el Ca^{2+}, Zn^{2+} y Fe^{3+}. De tal suerte que una vez que los alimentos que lo contienen son ingeridos por los humanos y animales domésticos monogástricos, el ácido fítico se une a aquellos minerales en el tracto intestinal formando mezclas de sales insolubles o de limitada solubilidad y biológicamente indisponibles que son eliminadas en el excremento. Es interesante notar que la elevada excreción de complejos de sales de fitatos proveniente de los granos es una de las principales causas de los problemas de salud asociados con las deficiencias de hierro, zinc e incluso de calcio en los países del tercer mundo (32, 40, 49).

Por otro lado, el ácido fítico presente en alimentos derivados de cereales y leguminosas puede ser fácil y rápidamente degradado mediante la adición de fitasas exógenas (que a su vez pueden ser extraídas de hongos o recombinantes producidas en bacterias) durante el procesamiento o digestión de los mismos, mejorando drásticamente la absorción de minerales (32, 35, 40). Una alternativa e inteligente estrategia que se ha propuesto es la de reducir *in vivo* de manera sustancial el porcentaje de dicho antinutriente, aumentando la actividad enzimática de la enzima fitasa en la semilla mediante técnicas de ingeniería genética. De acuerdo con esto, varios cultivos importantes tales como canola, soya, arroz, trigo e incluso tabaco han sido exitosamente transformados con genes de fitasas de origen fúngico, cuya expresión fue dirigida por promotores específicos de semilla o constitutivos. Estos materiales sintetizaron y acumularon las fitasas recombinantes de manera funcional (tabla 2) (39).

En el trabajo de Lucca y col. (46) relativo a la expresión de una ferritina vegetal en arroz antes discutido, simultáneamente también se sobreexpresó una fitasa termoestable del hongo *Aspergillus fumigatus* observándose un aumento significativo en la actividad enzimática de 130 veces; ésta se mantuvo constante después de simular *in vitro* las condiciones gástricas del estómago y el ácido fítico fue degradado en su totalidad. A pesar de que la fitasa nativa del hongo al ser cocinada junto con harina de arroz retuvo 50% de su actividad inicial, lo que es sumamente pro-

misorio en el procesamiento térmico de los alimentos así como en la nutrición humana referente a la absorción de hierro y zinc, resultados preliminares indicaron que únicamente el 8% de la actividad original fue retenida después de haber hervido en agua las semillas de arroz transgénico durante 20 min. Estos distintos comportamientos térmicos de las dos fitasas, nativa y recombinante, podrían ser atribuidos a que las modificaciones postraduccionales en el cereal fueron diferentes con respecto a las que ocurren en el microorganismo.

Vitaminas

Las vitaminas son importantes moléculas bioquímicas que las plantas y microorganismos son capaces de sintetizar, pero que el cuerpo humano es incapaz de hacerlo. Por lo tanto, las vitaminas deben ser obtenidas de los alimentos y son adquiridas por el cuerpo ya sea disueltas en agua (vitaminas B y C) o en grasas (vitaminas A, D, E, K). Aunque todos los organismos pueden contener casi todas las vitaminas, algunos son particularmente ricos en ciertos tipos, por lo que son considerados como alimentos valiosos y usados como importantes fuentes de vitaminas (3, 50). La vitamina C es abundante en cítricos y encontrada también en vegetales frescos. Las vitaminas del complejo B son abundantes en carnes, germen de trigo y levaduras comestibles. Mientras que el aceite de hígado de pescado es una fuente rica de las vitaminas liposolubles A y D. Otras fuentes importantes de vitamina A son las hortalizas, calabaza y zanahoria, así como los camotes. Algunas enfermedades debidas a deficiencias de vitaminas específicas son: ceguera nocturna e incremento de la mortalidad en la niñez (vitamina A); beriberi caracterizada por músculos débiles y parálisis (vitamina B_1); y raquitismo que se manifiesta con el debilitamiento y deformación grave de los huesos (vitamina D) (38).

Vitamina E. La intensa investigación alrededor de la vitamina E, un antioxidante liposoluble y esencial en la nutrición del ser humano, apoya la hipótesis de que previene a los tejidos de daños mediados por radicales libres mediante la protección de tres componentes celulares fundamentales: lípidos, proteínas y el propio material genético. De hecho diferentes estudios epidemiológicos han indicado que el suplemento frecuente de vitamina E (tabla 2), resulta en una disminución de riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer, ayuda al buen funcionamiento del sistema inmune, y previene o reduce un número importante de enfermedades degenerativas asociadas con la edad (51).

La vitamina E está representada por una familia de compuestos denominados vitámeros, cuatro de los cuales se encuentran de manera natural en los alimentos y son el α-, β-, γ-, y δ-tocoferol, que difieren únicamente en el número y posición de los grupos metilos sustituyentes en el anillo aromático. La actividad biológica de la vitamina E es definida en términos de equivalentes de α-tocoferol, donde α-tocoferol posee una actividad de un equivalente de α-tocoferol (α-TE) por mg de compuesto, mientras que las actividades de β-, γ-, y α-tocoferol son de 0.5, 0.1 y 0.03 α-TE por miligramo de compuesto, respectivamente. Esta información se basa en que a pesar de que todos los tocoferoles presentan una absorción similar durante la digestión, solamente una especie, el α-tocoferol es preferencialmente almacenado y distribuido en todo el cuerpo humano, mientras que los vitámeros restantes lo hacen con menor eficiencia (37). De esta forma el α-tocoferol resulta ser el más importante para la nutrición humana.

Por otro lado, las principales fuentes baratas de tocoferoles son los aceites derivados de semillas, especialmente de soya, maíz, canola, algodón y de palma, donde desafortunadamente el α-tocoferol es el componente minoritario, siendo el γ-tocoferol, su precursor inmediato el predominante. Por ejemplo, en aceite de soya, el α- y γ-tocoferol representan 7 y 70% del total de tocoferoles, respectivamente, y una relación similar de α-tocoferol/γ-tocoferol se conserva en las otras oleaginosas. Es interesante notar, que el vitámero γ-tocoferol puede ser metilado a α-tocoferol a través de una reacción catalizada por la enzima α-tocoferol metiltransferasa (γ-TMT) (figura 3A) (37, 51).

Todas estas observaciones sugieren que la actividad de γ-TMT es probablemente limitante en las semillas de los principales granos agroalimentarios, pudiendo ser la responsable de la baja cantidad de α-tocoferol sintetizado y acumulado. Por lo tanto, γ-TMT se convierte en un blanco perfecto para manipular el contenido de vitamina E en algunos cultivos vegetales. Un inteligente y exquisito trabajo de ingeniería metabólica en esta dirección fue reportado por Shintani y DellaPenna (52) quienes sobreexpresaron el cDNA que codifica para una γ-TMT en *Arabidopsis* dirigido por un promotor específico de semilla. En las semillas transgénicas, 85-95% de la totalidad de los tocoferoles está en la forma α, en contraste con 1.1% y 97% para α- y γ-tocoferol, respectivamente, encontrados en las de *Arabidopsis* no transformadas. Cabe señalar que la cantidad de tocoferoles totales no fue alterada en las semillas transformadas siendo similar a la de las silvestres. Sin embargo, este cambio cualitativo

en la composición de los vitámeros se vio reflejado en un aumento de nueve veces en la actividad de vitamina E con relación a la mostrada por el aceite de las negativas. De esta manera, 50 g de aceite extraído de la semilla rica en α-tocoferol poseen 84 UI de vitamina E, mientras que la misma cantidad de aceite pero obtenido de semillas de *Arabidopsis* sin transformar sólo proveen 9 UI (tabla 2). Esta investigación sienta las bases para intentar cambiar el perfil de tocoferoles, con el objetivo de aumentar los niveles de vitamina E en los aceites de cultivos de importancia agronómica, lo que mejoraría de manera simultánea su valor nutricional y nutracéutico.

Vitamina C. La vitamina C (ácido L-ascórbico) hidrosoluble tiene una considerable actividad antioxidante *in vitro*, en parte debido a su fácil oxidación y porque el radical semidehidroascorbato derivada de ella es de baja reactividad. *In vivo* esta vitamina es un cofactor esencial de un número importante de enzimas involucradas en diversas rutas metabólicas y recientemente se ha prestado especial atención a su efecto antioxidante. De esta manera, el consumo de alimentos ricos en vitamina C (frutas especialmente cítricos y algunos vegetales) se ha relacionado con una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y de varios tipos de cáncer (50). La importancia del ácido ascórbico en humanos está ilustrada por la existencia de eficientes proteínas acarreadoras de este compuesto y por lo letal que puede resultar privarse de su consumo por largos periodos, lo que conduce a la enfermedad denominada escorbuto. Muchos de los síntomas de esta terrible enfermedad están asociados directamente a la inadecuada formación de colágeno, que a su vez es el resultado de un mal funcionamiento de las enzimas prolina y lisina hidroxilasa que requieren al ácido ascórbico como un cofactor para poder funcionar adecuadamente (50). Por otro lado, el ascorbato secretado en los jugos gástricos puede ayudar en la reducción del hierro inorgánico proveniente de la dieta pasando de la forma insoluble Fe^{3+} a la soluble Fe^{2+}, que es más fácilmente absorbida por el intestino delgado. La vitamina C también puede evitar la formación de nitrosaminas intragástricas (39, 50).

Las plantas y la mayoría de los animales son capaces de producir su propia vitamina C, pero no los primates, incluyendo al hombre, que presentan en su genoma una mutación del gene que codifica para la enzima L-gulono-γ-lactona oxidasa. Esto hace que el humano tenga que adquirir este microcomponente vital a partir de su dieta. En animales que biosintetizan esta vitamina, la enzima faltante en el ser humano lleva a cabo la última reacción en la producción de ascorbato.

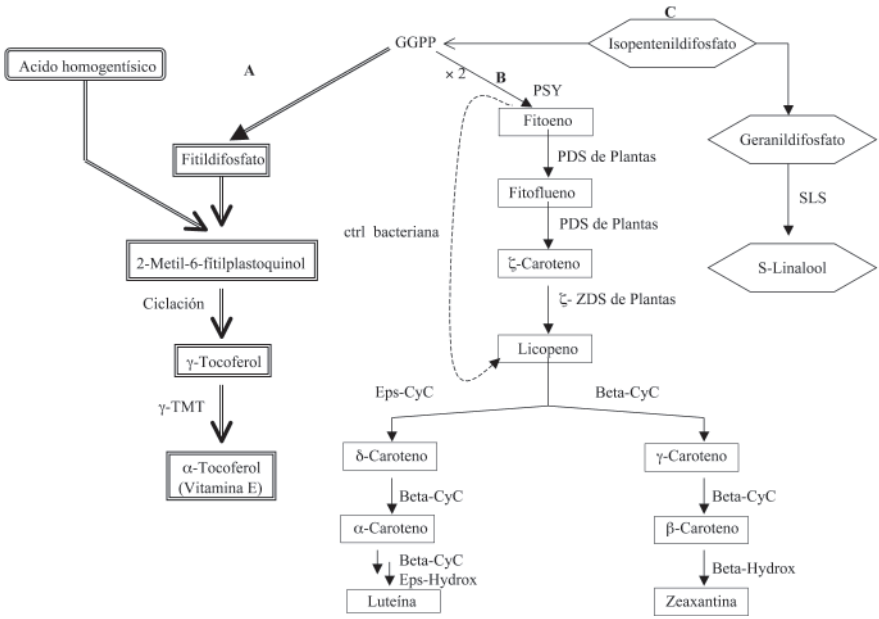


Figura 3

LA RUTA DE SÍNTESIS DE LA VITAMINA E

Diagrama esquemático de la ruta de síntesis de la vitamina E en plantas (A), así como de las respectivas de carotenoides en plantas y microorganismos (B), y la de S-linalool en plantas (C).

La introducción de cuatro dobles enlaces convierten al fitoeno en licopeno (rojo). Las plantas utilizan dos desaturasas para llevar a cabo dichas transformaciones. La fitoeno desaturasa (PDS) cataliza las dos primeras desaturaciones (de fitoeno a fitoflueno a ζ-caroteno) mientras que la conversión de ζ-caroteno a licopeno vía neurosporeno es realizada por la ζ-caroteno desaturasa (ZDS). En bacterias una sola enzima, la fitoeno desaturasa, es capaz de originar licopeno a partir de fitoeno mediante la introducción de cuatro dobles enlaces. En seguida la ciclación en ambas partes terminales de la cadena del licopeno lineal da como resultado α- o β-caroteno; estas reacciones son catalizadas por dos enzimas distintas denominadas licopeno ε- y β-ciclasas, respectivamente. Subsecuentes reacciones de hidroxilación producen las xantofilas, luteína y zeaxantina. La formación de licopeno mediante una fitoeno desaturasa bacteriana es indicada con una línea punteada (ctr1).

Abreviaciones: Beta-CyC; β-anillo ciclasa, Beta-Hydrox; β-anillo hidroxilasa; ctrl y PDS; fitoeno desaturasa, Eps-Cyc; ε-anillo ciclasa, Eps-Hydrox; ε-anillo hidroxilasa; γ-TMT; γ-tocoferol metiltransferasa, GGPP, de geranilgeranil pirofosfato, SLS; S-linalool sintasa, ZDS; z-caroteno desaturasa.

Adaptada y modificada de: Grusak y DellaPenna (37); Bramley y col. (51); Van den Berg y col. (58); Lewinsohn y col. (78); Sandmann (59).

Mientras que en plantas la enzima L-galactono-γ-lactona deshidrogenasa es la responsable de catalizar el paso final en la generación de vitamina C empleando como sustrato L-galactono-γ-lactona (53). A pesar de que plantas y animales tengan distintas rutas, plantas transgénicas de tabaco y lechuga expresando de manera constitutiva un cDNA que codifica para la L-gulono-γ-lactona oxidasa aislado de hígado de rata, acumularon hasta siete veces más ácido ascórbico en sus tejidos, que las respectivas plantas no modificadas (54). Estos resultados demuestran que pueden incrementarse de manera significativa los niveles de vitamina C en plantas mediante la introducción de un solo gene de la correspondiente ruta de animales.

Pigmentos

Carotenoides. Este termino resume una clase de pigmentos naturales estructuralmente relacionados, y ampliamente distribuidos en plantas, algas y varios microorganismos como bacterias y hongos. El amplio espectro de color mostrado por los carotenoides, que fluctúa de amarillo a rojo incluyendo el anarajando, así como su muy buena estabilidad al pH y agentes reductores como la vitamina C, sus propiedades benéficas como micronutriente de provitamina A, como antioxidantes tanto en humanos como en alimentos y otras cualidades nutracéuticas, han permitido su amplia explotación por las industrias alimentaria y farmacéutica (55, 56, 57). Además en frutas y hortalizas juegan un papel preponderante definiendo paramétros de calidad. Por otro lado, diversas investigaciones epidemiológicas tanto en humanos como animales así como *in vitro* sugieren que el elevado y frecuente consumo de alimentos ricos en carotenoides puede tener funciones muy sobresalientes en la prevención y disminución de la incidencia de ciertas enfermedades. Así se ha visto que el licopeno puede prevenir la indicencia de cáncer de próstata, mientras que la luteína y zeaxantina ofrecen protección contra la ocurrencia de degeneración macular relacionada con la edad. Además del α-caroteno, el más potente carotenoide con actividad de provitamina A, el β-caroteno, y la β-criptoxantina también presentan esta propiedad aunque en menor grado que el β-caroteno; sus deficiencias pueden conducir a la ceguera y muerte prematura (57, 58).

El primer paso en la ruta de síntesis de carotenoides lo constituye la condensación de dos moléculas de geranilgeranil pirofosfato (GGPP) por

parte de la enzima fitoeno sintasa (PSY) para formar fitoeno, carente de color; las etapas subsecuentes conducen a la producción de los carotenoides con color (figura 3B) (58, 59).

La investigación en biotecnología molecular de carotenoides en plantas se ha enfocado principalmente en mejorar su calidad nutricional y nutracéutica. En el 2000, Romer y colaboradores lograron un incremento significativo de hasta tres veces en el contenido de β-caroteno en tomates transgénicos, llegando a representar más de 45% de los carotenoides totales, manipulando su actividad de desaturación mediante la sobreexpresión constitutiva de la enzima fitoeno desaturasa de origen bacteriano (figura 3B) (60). De tal manera que un fruto con calidad mejorada de provitamina A posee alrededor de 5 mg de toco-trans-β-caroteno (800 equivalentes de retinol), los cuales podrían satisfacer el 42% de los requirimientos mínimos de vitamina A, en contraste a un tomate sin transformar que cubriría sólo 23% (tabla 2).

Las variedades de cempasúchil (*Tagetes erecta*), material nativo de México presentan colores que van del blanco al anaranjado oscuro. La pigmentación de sus flores es debida a la síntesis y acumulación masiva de carotenoides durante el desarrollo del pétalo. Las variedades naranja obscuro poseen concentraciones de carotenoides que son 20 veces mayores que las encontradas en el tomate rojo maduro. Por esta razón, las plantas de este cultivo son sembradas de manera comercial en diversas zonas del país. Además, en México los extractos de su flor son usados como complemento en la alimentación avícola con el objetivo de pigmentar piel y agregar color a los huevos. Esto se hace para satisfacer las coloraciones demandadas por los consumidores, quienes están dispuestos a pagar el sobreprecio que conlleva la incorporación de pigmentos a estos productos (55). Además, algunos de los usos medicinales asignados al cempasúchil en la farmacopea mexicana son: antiespasmódico, afecciones del bazo, enfermedades del estómago y del hígado. Por todo lo anterior, este material vegetal adquiere una considerable importancia económica.

Estudios efectuados en nuestro laboratorio han probado que la flor de cempasúchil contiene como pigmento mayoritario a la luteína, y que cuando la harina obtenida de la flor es iluminada con luz solar el equilibrio se desplaza hacia los isómeros de toda-trans-luteína (61). Además, estos isómeros de la luteína mostraron valores de color más rojos, y cuando dichas harinas iluminadas fueron empleadas en la alimentación de galli-

nas ponedoras, las yemas de los huevos fueron pigmentadas más eficientemente cuando eran comparadas con los controles, en los que la harina fue mantenida en la oscuridad.

Con relación a las características nutracéuticas del cempasúchil, recientemente se ha evaluado la actividad antimutagénica de sus carotenoides concluyéndose que de entre sus pigmentos, la luteína fue el compuesto que mostró la más alta actividad; sin embargo, mezclas de carotenoides en el extracto de esta flor, que incluían a la luteína, presentaron un efecto sinergístico con una propiedad como antimutágeno mejor y superior a la de la luteína sola. Se ha propuesto que la luteína forma un complejo extracelular con el mutágeno 1-nitropireno, disminuyendo la absorción del 1-nitropireno y en consecuencia su mutagenicidad (62).

Finalmente, algunas investigaciones que están en progreso son las relativas al aislamiento y caracterización de genes de enzimas claves en la regulación de la carotenogénesis del cempasúchil, así como su transformación genética para el mejoramiento de la producción de pigmentos existentes o nuevos con aplicaciones alimentarias y/o nutracéuticas (63, 64).

Otro éxito en la manipulación de la biosíntesis de carotenoides ha sido alcanzado en canola, la cual fue transformada con el gene que codifica para la enzima fitoeno sintasa proveniente de la bacteria *Erwinia uredovora,* y dirigida su expresión y acumulación por un promotor específico de semilla (figura 3B). Los embriones transgénicos fueron visiblemente anarajandos brillantes, en comparación a los controles negativos que conservaron su color verde característico (65). Las semillas de canola transformadas acumularon carotenoides (primordialmente α- y β-caroteno) hasta 50 veces más que las normales no modificadas. Dichos granos ricos en tales pigmentos produjeron hasta 1.6 mg de carotenoides/g peso fresco y 2 mg/g de aceite (tabla 2).

El endospermo de arroz maduro acumula uno de los primeros intermediarios importantes en la ruta biosintética de provitamina A, el GGPP (figura 3B), por lo que para producir β-caroteno de manera funcional se precisa de reacciones enzimáticas adicionales. Para ello, Ye y col. (66) instalaron en aquel tejido dichas actividades enzimáticas mediante la incorporación simultánea de tres genes que codifican para las siguientes enzimas: la fitoeno sintasa de la planta de narciso, la fitoeno desaturasa bacteriana y finalmente la licopeno β-ciclasa también de narciso. Las dos enzimas recombinantes de origen vegetal fueron expresadas de manera específica en el endospermo usando el promotor de la glutelina de arroz,

una proteína de reserva, mientras que el gene de la desaturasa estuvo bajo el control de un promotor constitutivo. De forma sobresaliente, los granos de arroz transformados exhibieron un color dorado indicando la formación de pigmentos tipo carotenoides. Y en efecto, los resultados demostraron que el endospermo fue capaz de almacenar altos niveles de β-caroteno de hasta 1.6 mg por gramo de tejido seco. Así en una dieta oriental típica, que incluye diariamente casi 300 g de este cereal, el "Golden Rice", como ha sido bautizado este arroz rico en provitamina A producto de la biotecnología molecular, podría cubrir la RDA para esta vitamina (tabla 2). De hecho, se ha especulado que debido a la naturaleza fisicoquímica de la matriz del endospermo, el β-caroteno del "Golden Rice" podría ser más fácil y eficientemente convertido a retinol que el encontrado en vegetales frescos (34). Además de la provitamina A, algunas líneas de arroz transgénico también acumularon en su endospermo niveles significativos de luteína y zeaxantina, pigmentos con interesantes propiedades nutracéuticas. Estos resultados sugieren que tanto las enzimas licopeno ε-ciclasa, β-ciclasas así como las hidroxilasas son expresadas de manera constitutiva en dicho tejido o bien su expresión es inducida por la formación de licopeno (67). Un proyecto que se tiene contemplado es el de unificar las líneas transgénicas de arroz ricas en hierro que expresan la ferritina y las del "Golden Rice", ya que se sabe que la provitamina A mejora sensiblemente la biodisponibilidad de aquel mineral (32, 46, 66, 67).

Es conveniente comentar que, también en nuestro laboratorio, Paredes-López y col. (68) han desarrollado el sistema de transformación genética del nopal usando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, logrando obtener células vegetales transformadas y la subsecuente regeneración de los nopales transgénicos. De esta forma se ha propuesto usar al nopal como un biorreactor a fin de mejorar la calidad nutricional de los nopalitos mediante la introducción de genes de la biosíntesis de provitamina A (β-caroteno), lo que podría convertirlo en una fuente alternativa de obtención de dicha vitamina e inclusive de licopeno, agregando así un mayor valor medicinal, nutricional y comercial a este cultivo (69). Finalmente, se pretende obtener un producto de consumo nacional y accesible para amplios sectores de la población mexicana que ayude a disminuir el riesgo de enfermedades por deficiencia de vitamina A.

Antocianinas y otros flavonoides. Las antocianinas pertenecen a la familia de los flavonoides y son responsables del color de muchos frutos como

fresa, cereza y uvas; y de vegetales como el rábano, tubérculos, granos y un gran número de flores. Por el amplio espectro de colores las antocianinas usadas como colorantes tienen una larga historia de uso seguro en la dieta del hombre; además de esta propiedad funcional, recientemente ha surgido un renovado interés en ellas así como en otros flavonoides debido a los atributos positivos que tienen para la salud (55, 57).

Por otro lado, estos pigmentos hidrosolubles son sumamente inestables y su color es afectado por el pH, temperatura, luz, oxígeno, metales, sulfitos y ácido ascórbico, entre otros. De manera sobresaliente, el fenómeno de la "copigmentación intermolecular" se debe a copigmentos (también flavonoides como flavonas y flavonoles) que co-ocurren con las antocianinas y forman complejos con ellas; de esta manera contribuyen a la coloración típica de las antocianinas, al protegerlas de factores físicos y químicos como los arriba citados (70). La inestabilidad de aquellos pigmentos se pone de manifiesto cuando son removidos de su ambiente nativo y de la protección brindada por la copigmentación, de manera que durante el procesamiento industrial o cocinado doméstico de los alimentos que los contienen pueden presentarse diversas transformaciones, dando origen a coloraciones amarillentas o parduscas (57).

Existe evidencia de que las antocianinas no son tóxicas, sino al contrario, exhiben importantes propiedades terapéuticas por lo que son empleadas en el tratamiento de varios desórdenes circulatorios y enfermedades inflamatorias. Una más reciente apreciación de las características antioxidantes de aquellos compuestos y flavonoides relacionados es que se han asociado con beneficios como anticancerígenos, antimutagénicos y tienen un significativo papel en la disminución de problemas cardiovasculares. Especial atención se le ha dado a los flavonoides del vino tinto que son antocianinas, y no el porcentaje de alcohol, los responsables de prevenir o reducir algunas enfermedades crónicas (56, 71). Sin embargo, la ingesta de antocianinas es variable de un país a otro y es determinada en función de las dietas individuales y preferencias. Ciertamente, la cantidad consumida sería alta en los países bebedores de vino y naciones industrializadas, donde las frutas ricas en dichos nutracéuticos abundan y son una parte esencial de su alimentación diaria. Desafortunadamente, muchos alimentos básicos de una gran parte del mundo, especialmente los menos avanzados económicamente, presentan muy bajos niveles en sus partes comestibles o producen flavonoides con subóptimas características antioxidantes, o bien en su defecto no los contie-

nen (55, 56, 57). Sobre las bases de esas observaciones se han tomado varias iniciativas tendientes a enriquecer los alimentos de origen vegetal con flavonoides bioactivos.

Una alternativa para modificar la expresión de los genes de una ruta biosintética es a través del uso de factores de transcripción que controlan genes de rutas múltiples. En el grano del maíz, la biosíntesis de antocianinas está regulada por una combinación de dos especies de factores de transcripción, R y C1. La proteína R tiene homología con una proteína básica codificada por el proto-oncogen *c-MYC* de vertebrados, mientras que la proteína C1 comparte homología con el producto del proto-oncogen *c-MYB*. La sobreproducción en maíz de esos dos factores de transcripción R y C1 activó en su totalidad la ruta de las antocianinas, permitiendo su acumulación, las cuales pudieron ser visualmente detectadas por su color rojizo en contraste a las células no pigmentadas del maíz no transgénico. Entre los genes de dicha ruta se incluyen al de la fenilalanina amonio liasa (PAL), chalcona sintasa (*c2*), chalcona isomerasa (*chi*), flavonona 3-hidroxilasa (*f3h*), proantocianidina sintasa (*a2*), UDP-glucosa:flavonoide-3-*o*-glucosiltransferasa (*bz1*) y glutatión S-transferasa (*bz2*) (figura 4) (72). Cuando se transformaron tomates también con aquellos factores de transcripción provenientes de maíz, se incrementó la acumulación de aquellos colorantes específicamente en las regiones pigmentadas que normalmente los producen (tabla 2).

Los granos de soya contienen altas concentraciones de isoflavonas, particularmente genisteína y daidzeína. Se ha visto que estas isoflavonas, provenientes de soya u otras leguminosas, al poseer una afinidad débil por el receptor del estrógeno, por lo que son llamadas fitoestrógenos, pueden aminorar los molestos síntomas de la menopausia en mujeres, además de que su consumo, mediante los productos de soya, se ha relacionado con una disminución considerable de los riesgos de cáncer de pecho y próstata y de enfermedades del corazón en Asia oriental (71,73). Otros beneficios de los fitoestrógenos son reducción de los niveles de colesterol en sangre y de los riesgos de osteoporosis al mejorar la biodisponibilidad del calcio.

Así, por medio de biotecnología molecular se podrían producir tales fitoestrógenos en cultivos de origen no leguminoso como los cereales especialmente maíz, trigo y arroz que normalmente carecen de la habilidad de sintetizarlos, y con ello se mejoraría su valor nutracéutico.

La sobreexpresión simultánea y de manera constitutiva de un cDNA que codifica para la enzima isoflavona sintasa (IFS) de soya y los genes de los factores de transcripción R y C1 en células de maíz, provocó de manera notable que sólo las líneas recombinantes de color rojo (y no las líneas blancas que también eran transgénicas) fueran capaces de acumular genisteína, según los análisis por HPLC (tabla 2) (74). Con la finalidad de producir daidzeína en el mismo cereal, además de la IFS y factores R y C1, se introdujo el gene que codifica para la enzima chalcona reductasa cuyo origen es la soya; de esta manera el material transgénico resultante debería ser capaz de biosintetizar y almacenar las dos isoflavonas, genisteína y daidzeína (figura 4). De nueva cuenta, de acuerdo con los análisis cromatográficos por HPLC, sólo los cultivos de color y no los blancos dieron lugar a la formación de dichas isoflavonas (tabla 2).

Otro flavonoide con propiedades terapéuticas importantes es el flavonol llamado quercetina, sobresaliendo por su potente poder antioxidante y porque diversos estudios epidemiológicos sugieren que elevadas cantidades de este flavonol en la dieta hacen disminuir el riesgo de problemas cardiovasculares. El tomate posee en su cáscara muy bajas cantidades de flavonoides (5-10 mg/kg de peso fresco), estando constituido mayoritariamente de naringinina y quercetina. En ese sentido Muir y col. (75) mediante la sobreproducción de la enzima chalcona isomerasa de la flor de la petunia, una enzima participante en una de las etapas de velocidad limitante en la biosíntesis del flavonol, generaron frutos transformados de tomate que se caracterizaron por presentar un aumento de 780% en los niveles de quercetina en su pulpa, comparados con el tomate no modificado (figura 4, tabla 2). Después de su procesamiento en pasta, este producto elaborado con tomates ricos en flavonol conservó el 65% de la cantidad original presente en los frutos de tomates transgénicos; esto se tradujo en un aumento de 21 veces en la cantidad de quercetina con relación a la mostrada usualmente por el producto obtenido de tomates normales (tabla 2). Estos avances son relevantes y alentadores en cuanto al potencial para el procesamiento de materia primas ricas en nutracéuticos y su conservación en el alimento final.

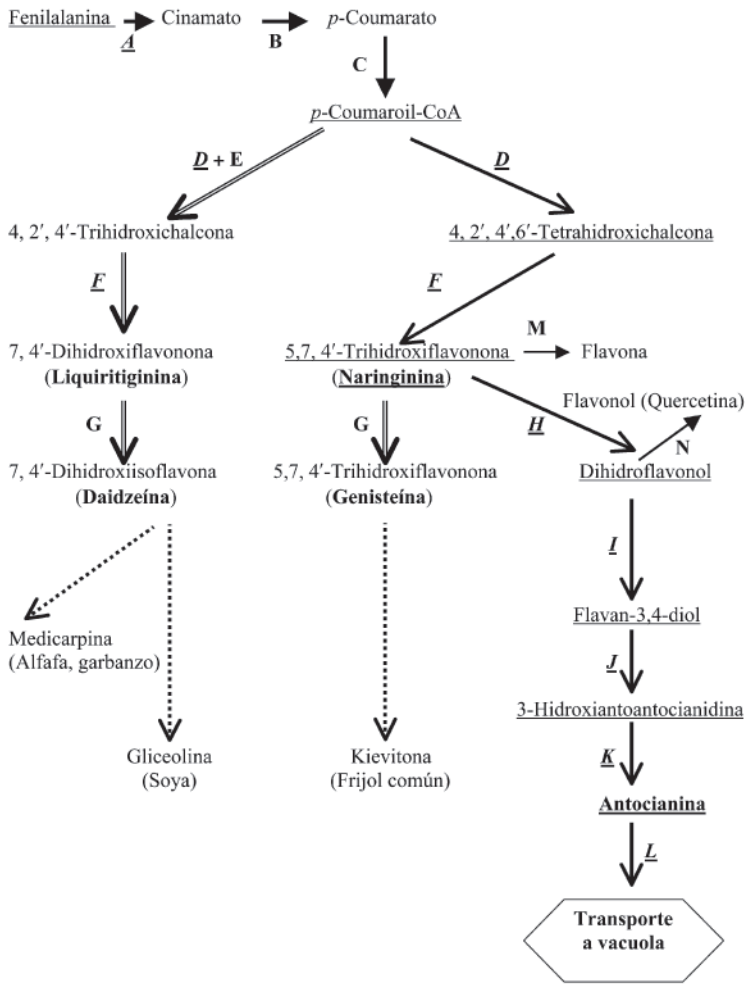


Figura 4

LA RUTA DE LOS FENILPROPANOIDES

Representación esquemática de la ruta de los fenilpropanoides en plantas mostrando los intermediarios y enzimas involucradas en la biosíntesis de flavonoides.

Enzimas *A;* Fenilalanina amonio liasa (PAL), *B;* cinamato 4-hidroxilasa, *C;* 4-coumarato: coenzima *A* ligasa, *D;* chalcona sintasa (c2), *E;* chalcona reductasa, *F;* chalcona isomerasa (chi), *G;* isoflavona sintasa (IFS), *H;* flavonona 3-hidroxilasa (f3h), I, dihidroflavonol reductasa (a1), *J;* proantocianidina sintasa (a2), *K;* UDP-glucosa:flavonoide-3-o-glucosiltransferasa (bz1), *L;* glutatión S-transferasa (bz2), *M;* flavona sintasa, *N;* flavonol sintasa. Adaptada y modificada de Bruce y col., 2000; Yu y col., 2000; Muir y col., 2001.

El sabor y aroma son parámetros de calidad sensorial determinantes en la aceptación y/o rechazo de un alimento por parte del consumidor. Esto significa que además de los cuatro sabores básicos [dulce (clase y cantidad de azúcares), ácido (clase y cantidad de ácidos), salado, y amargo o astringente (compuestos fenólicos)], el aroma u olor (compuestos volátiles) de un alimento también juega un papel importante en su selección. La importancia relativa de cada uno de aquellos elementos y sus interacciones, donde conservan un balance adecuado, dependen del tipo de producto. Uno de los grandes retos es generar alimentos específicos con mejor sabor y aroma, es decir ricos en azúcares (o una mayor proporción de fructosa y/o sacarosa) y moderados a altos en ácidos (con un buen balance entre ellos), bajos niveles de sustancias fenólicas, y suficientes compuestos volátiles sensorialmente importantes para un buen aroma.

Evidentemente, el mejoramiento del sabor y aroma es uno de los criterios de calidad más difíciles de manipular, ya que involucra la percepción por receptores específicos de muchos compuestos y algunos se encuentran en pequeñísimas concentraciones; además en el desarrollo del sabor y aroma de productos agrícolas participa un número elevado de genes que son afectados significativamente por la etapa de crecimiento y factores ambientales (76).

La gran aceptación del tomate y sus productos derivados no solamente se debe a su valor nutricional, versatilidad y atractivo color, sino también a su particular aroma y sabor. De tal manera que tomates deficientes en su aroma característico distintivo, a menudo provocan disgusto e insatisfacción sobre la calidad del producto, lo cual puede conducir a evitar su compra (77). En el sabor y aroma del tomate bien como fruto o después de su procesamiento no únicamente participan los azúcares reductores (fructosa y glucosa), y ácidos orgánicos libres (principalmente cítrico), sino que sus más de 400 compuestos volátiles distintos son de suma trascendencia. Estos compuestos volátiles incluyen entre otros a hidrocarburos lineales, cíclicos y heterocíclicos, alcoholes, fenoles, éteres, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres y lactonas (77). Todo esto hace difícil la tarea de intentar relacionar la presencia o ausencia de un solo factor con el aroma y sabor del tomate, ya que algunos de ellos que son claves están en ínfimos niveles casi indetectables.

El linalool, alcohol monoterpénico no cíclico, es uno de los diez compuestos más importantes volátiles que inciden en el aroma del tomate, y en el material fresco su nivel fluctúa entre 1-20 mg/g. Tanto al tomate como a sus productos, el linalool les imparte una nota alcohólica, floral, dulce; además se encuentra presente en frutos comestibles importantes como la guayaba, durazno, ciruela y piña. Este compuesto volátil presenta dos enantiómeros y se sabe que el S-linalool tiene como precursor inmediato al geranildifosfato, el cual también es intermediario de la ruta de los carotenoides y tocoferoles (figura 3). Recientemente, Lewinsohn y asociados (78) mejoraron el aroma del tomate mediante la introducción del gene que codifica para la S-linalool sintasa proveniente de la flor de *Clarkia breweri* (figura 3C) que cataliza la formación de S-linalool y cuya expresión estuvo controlada por el promotor E8 de tomate, específico de maduración. El fruto recombinante maduro acumuló exclusivamente el enantiómero puro S-linalool y no una mezcla racémica con el tipo R, aunque también se almacenó el 8-hidroxilinalool; esta clase de reacciones de hidroxilación es muy común en el metabolismo de los monoterpenos. No obstante que no se realizaron pruebas sensoriales serias, los autores comentan que algunas personas con simplemente oler fueron capaces de detectar cambios en el aroma del tomate maduro transformado (78).

Alergenicidad en cultivos modificados genéticamente

La alergenicidad alimenticia se manifiesta como una cascada de reacciones anormales y adversas del sistema inmune a los alimentos (convencionales o genéticamente modificados), o a ciertos constituyentes de ellos. Típicamente las proteínas presentes de manera natural en los sistemas alimenticios son las responsables de inducir respuestas inmunopatológicas en humanos y son consideradas como alergenos, aunque es pertinente aclarar que éstos también pueden ser de naturaleza no proteínica (79). Las alergias relacionadas a los alimentos son individualistas porque sólo afectan a muy poca gente en la población; sin embargo, para algunas personas alérgicas consumir ciertos tipos de alimentos o ingredientes alimenticios puede ser una experiencia de vida o muerte, por lo que tienen que eliminarlos de su dieta.

En función de la naturaleza de la respuesta inmune, la alergenicidad alimenticia puede ser catalogada como reacciones de hipersensibilidad

inmediata o retardada. La clase más común es la de acción inmediata, que es mediada por la inducción de anticuerpos alergeno-específico de inmunoglobulina E (IgE) y se caracteriza por que los síntomas comienzan a desarrollarse dentro de minutos a pocas horas después de haber ingerido el alimento o ingrediente alergénico ofensor, en contraste a las 24 h o periodos mayores requeridos en la de reacción retardada. Con excepción de la enfermedad celiaca (cuya fase activa consiste en un proceso inflamatorio del intestino delgado conducente a la mala absorción y que se manifiesta con pérdidas de fluidos corporales, diarrea, anemia y dolores articulares), que involucra una respuesta inmunológica anormal contra las prolaminas de cereales, especialmente de trigo, centeno y cebada, el mecanismo y papel de la reacción de hipersensibilidad lenta son pobremente entendidos.

De la población del tercer mundo sólo 10-25% sufre de algún tipo de alergia mediada por IgE y de ellas las ocasionadas por los alimentos representan menos de 2.5%. No obstante su baja incidencia, las alergias tipo IgE debidas a alimentos son un problema muy serio y pueden presentar una gran variedad de síntomas (80). Así, algunos alimentos (o ingredientes) pueden provocar reacciones tan desagradables como congestionamiento en el sistema respiratorio, diarrea y problemas en la piel como urticaria, prurito y vómitos; otros pueden generar problemas de salud más severos como dolores abdominales, espasmos bronquiales, cólicos, náuseas, hipo e hipertensión e incluso la pérdida de la vida.

Para muchos alimentos elaborados a partir de plantas modificadas genéticamente (o consumidos sin procesar, por ejemplo frutas y hortalizas) el humano será el consumidor final. En muchas de ellas, los genes heterólogos codifican para proteínas que directa e indirectamente impactan la calidad de los alimentos, llámese nutracéutica, nutricional, sensorial, de procesamiento o de vida de anaquel; o bien confieren mejores características agronómicas y de protección al cultivo como resistencia a insectos, enfermedades virales o fúngicas, así como a agobios medioambientales (salinidad, suelos ácidos o alcalinos) (1, 2). De ahí la preocupación del consumidor, de compañías biotecnológicas y de autoridades reguladoras de que algunas de aquellas proteínas recombinantes pudieran eventualmente originar cuadros alérgicos. Esto no es totalmente infundado si se tiene en mente que muchos alergenos son proteínas de origen vegetal que exhiben actividades biológicas con enorme potencial para proveer a una planta transformada propiedades como las previamente comentadas. Algunos ejemplos de proteínas potencialmente aler-

génicas y biotecnológicas son: 1) albúminas 2S, 2) proteínas relacionadas a patogénesis, y 3) inhibidores tipo tripsina y/o α-amilasa presentes naturalmente en cereales como trigo, arroz, centeno y cebada (79, 81). Estos últimos son responsables de la alergia respiratoria conocida como asma panadera, común entre los trabajadores de las industrias harineras y productoras de pan.

De esta forma no debe causar extrañeza la existencia de un consenso internacional en cuanto a la necesidad de evaluar la inocuidad alimentaria de cultivos genéticamente modificados, ya que la ingeniería genética pudiera introducir ocasionalmente, de manera no intencional, nuevas proteínas alergénicas en la cadena alimentaria (79, 81). Un componente importante de la inocuidad es el análisis de la alergenicidad, por lo que se ha propuesto un árbol de decisión para determinar el potencial alergénico de plantas modificadas genéticamente, e incluso de proteínas de interés antes de producir los nuevos cultivares. A continuación se describe brevemente el proceso secuencial para evaluar la capacidad alergénica de un producto modificado genéticamente y en particular los transgénicos (77, 81, 82) (figura 5). Si la fuente del gen transferido es conocida como alergénica, la alergenicidad de la nueva proteína expresada puede comenzarse a evaluar mediante pruebas inmunológicas *in vitro*, usando anticuerpos IgE de individuos con un historial alérgico bien documentado contra el material fuente (figura 5 lado izquierdo). Si no existe una respuesta diferencial, se procede a aplicar la proteína nativa y/o recombinante en una cortadura en la piel, que se realiza intencionalmente para tal fin; asimismo se usan animales modelos (ratas o conejos) a los que se les administra la proteína o el alimento modificado en bajas y altas concentraciones. Un resultado positivo sugiere realizar una prueba final consistente en suministrar, bajo condiciones clínicas controladas, el producto modificado genéticamente a personas voluntarias que se presume que son sensibles y no alérgicas a éste. Finalmente, en caso de una reacción positiva en pacientes alérgicos y, dependiendo de la severidad, se puede decidir introducir el producto al mercado etiquetándolo como alergénico, aunque esto sería muy raro, por lo que normalmente se abandona el proyecto. Por otro lado, si la proteína es codificada por un gene que no posee antecedentes alergénicos, se debe determinar su homología a nivel de estructura primaria con la de alergenos proteínicos conocidos, así como su estabilidad contra digestión multienzimática (simulando fluidos gástricos) y procesamiento industrial (figura 5, lado derecho). La capacidad de la proteína para soportar distintos tratamientos

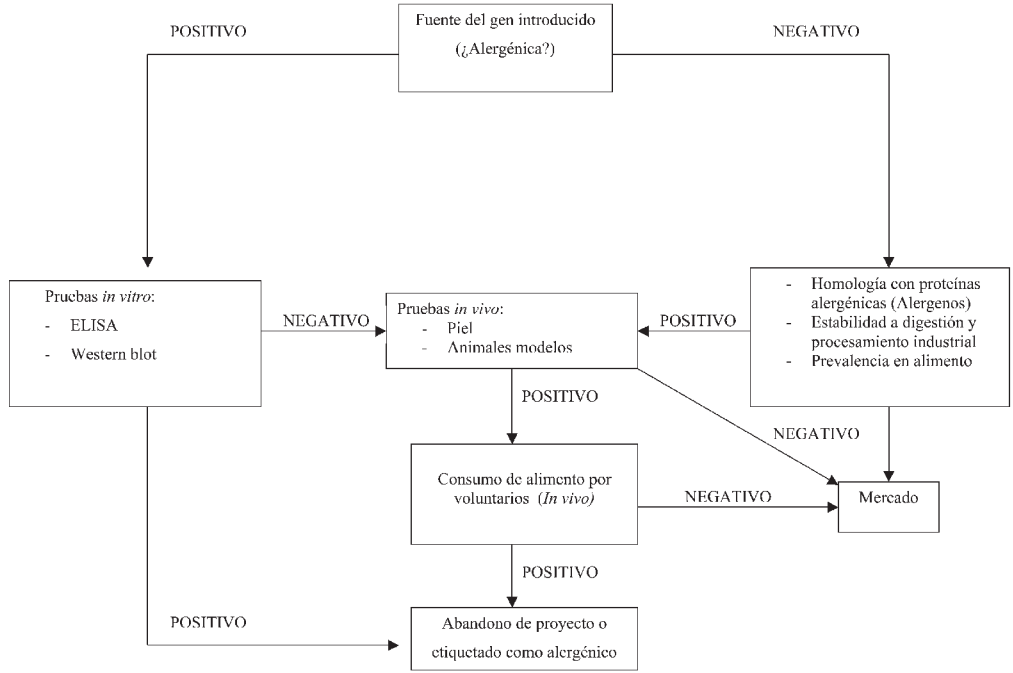


Figura 5

DETERMINACIÓN DEL POTENCIAL ALERGÉNICO

Árbol de decisión para determinar de manera secuencial el potencial alergénico de plantas modificadas genéticamente, incluyendo las transgénicas e incluso de proteínas de interés biotecnológico antes de producir los materiales recombinantes. Adaptada de Metcalfe y col., 1996; Kuiper y col., 2001; Taylor y Hefle, 2001.

industriales y para atravesar por el tracto digestivo y mucosa intestinal, así como su prevalencia en el alimento, son algunos de los requisitos para originar reacciones alérgicas. Por supuesto que si el alimento no es alergénico se podría liberar seguiendo los mecanismos regulatorios pertinentes.

Esta estrategia para evaluar el potencial alergénico de plantas modificadas genéticamente ha demostrado ser efectivo en el tan publicitado y desafortunado caso de la albúmina 2S de la nuez de Brasil. Otro ilustrativo ejemplo es el del maíz "StarLink", un cultivo transformado con una proteína de *Bacillus thuringiensis* denominada Cry9C, permitiéndole producir su propio bioinsecticida y otorgándole resistencia contra insectos. Este cereal "StarLink" nunca fue aprobado para el consumo humano en Estados Unidos, pero sí para la alimentación animal (79, 81). A pesar de que el gene introducido al grano "StarLink" fue obtenido de una fuente sin historial alergénico y de que el producto proteínico expresado no mostró homología estructural con la secuencia de aminoácidos de ningún alergeno de origen alimenticio o ambiental, dicha proteína recombinante fue capaz de soportar la degradación proteolítica gástrica, tratamientos térmicos y ácidos, y también indujo la producción de anticuerpos IgE en ratas (figura 5, lado derecho). Por estas razones, este material transgénico nunca fue aprobado como alimento para humanos; por ello la controversia se desató cuando se encontraron residuos de maíz "StarLink" en productos elaborados a partir de maíz, supuestamente no modificado, para consumo humano.

No debe olvidarse tampoco que también existe un riesgo de alergenicidad cuando se introducen al mercado alimentos novedosos (obtenidos o no por biotecnología moderna), o que son complementados con proteínas de otras fuentes. Así, cuando se entrecruzan dos plantas por medio de las técnicas del mejoramiento tradicional, se mezclan miles de genes con el objetivo de transferir genes que codifican para proteínas que pudieran mejorar una o más características. De tal manera que cuando se genera una nueva variedad modificada genéticamente por técnicas tradicionales, también se deben considerar por lo menos dos aspectos relacionados con los problemas de alergias: en primer término, si se ha aumentado el nivel de proteína, muy probablemente haya incrementado la cantidad de algún alergeno que pudiera estar presente en forma natural en alguna de las plantas progenitoras que se cruzaron; y segundo, existe la posibilidad de haber producido una nueva sustancia alergé-

nica en la planta resultante, aunque se sepa que los progenitores son inocuos (6).

A menudo, en medio del debate sobre el riesgo potencial de alergenicidad en los cultivos genéticamente modificados, se olvida que la biotecnología molecular también tiene el potencial de disminuir o eliminar alergenos nativos y conocidos de plantas comestibles para el hombre y animales domésticos (1). Aunque en la actualidad es un campo de investigación muy activo, sólo se ha reportado un trabajo que ha sido exitoso. Los principales alergenos dietarios del arroz normal poseen pesos moleculares muy bajos, son solubles en soluciones salinas y llegan a estar hasta en 300mg/semilla, pesando ésta alrededor de 20 mg. Las secuencias deducidas de sus cDNAs (más de diez) muestran considerable similitud con inhibidores de las enzimas tripsina y/o α-amilasa encontrados en trigo y cebada. En 1996, Nakamura y Matsuda (83), generaron un arroz hipoalergénico en el cual, por tecnología "antisentido", se disminuyó drásticamente la acumulación de las proteínas alergénicas (60-70mg/semilla de 20 mg) causantes de la alergia conocida como asma panadera (tabla 1). Se emplearon las técnicas de inmunodetección tipo Western y ELISA para evaluar la reducción de los niveles de los alergenos, concluyéndose que ésta fue estable en tres generaciones. No obstante, todavía falta demostrar si este arroz hipoalergénico será tolerado por pacientes que son alérgicos al arroz.

Consideraciones finales

En años recientes se han obtenido progresos espectaculares con la aplicación de biotecnología molecular en la agricultura, dando lugar a los productos transgénicos de la segunda generación, de los cuales se espera que el consumidor sea el beneficiario directo. Esto es debido a que dichos alimentos presentan mejores características alimentarias (funcionales y nutricionales) así como mensaje nutracéutico, y que sin lugar a dudas su producción seguirá aumentando en el futuro. Sin embargo, en el momento actual existe resistencia y hasta cierta fobia hacia lo transgénico, debido a la falta de información y a la desinformación de varios sectores de la sociedad y en el afán de lucro desmedido de algunas empresas. Por lo anterior los biotecnólogos debemos participar en campañas educativas tendientes a presentar al público en general, y a grupos de visiones plurales, los beneficios potenciales de esta novedosa tecnolo-

gía en una forma real, objetiva y entendible; por supuesto sin dejar de reconocer que existen posibles riesgos y que deben tenerse siempre en mente. El desarrollo, pruebas y liberación de los productos agrícolas generados a través de procesos derivados de la biotecnología moderna deberían ser objeto de mejoras continuas, tomando en consideración las más recientes experiencias, sean éstas positivas o negativas. Para alcanzar este objetivo, se requerirá de una estructura regulatoria muy dinámica y abierta, pero sobre todo altamente sensible al bienestar del hombre y del medio ambiente. Indudablemente el futuro será nuestro mejor aliado.

Bibliografía

1. Osuna-Castro, J.A., Paredes-López, O. Aplicaciones de la biotecnología molecular para la producción de alimentos. *Biotecnología, Nueva Era* 6(1): 14-37 (2001).
2. Osuna-Castro, J.A., Paredes-López, O. Introduction to molecular food biotechnology. En: *Food Science and Food Biotechnology,* ed., G.F. Gutiérrez, CRC Press, Boca Raton FL, USA (en prensa) (2003).
3. Guzmán-Maldonado, S.H., Paredes-López, O. Biotechnology for the improvement of nutritional quality of food crop plants. En: *Molecular Biotechnology for Plant Food Production,* ed., O. Paredes-López, Lancaster, PA, USA: Technomic Publishing Company, Inc., pp. 553-620 (1999).
4. Shewry, P.R., Casey, R. Seed Proteins. En: *Seed Proteins,* eds., P.R. Shewry y R. Casey, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 1-10, (1999).
5. Reyes-Moreno, C., Paredes-López, O. Hard-to-cook phenomenon in common beans. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 33: 227-286 (1993).
6. Guzmán-Maldonado, S.H., Serna-Saldívar, S.O., Paredes-López, O. Los alimentos mágicos de la culturas indígenas de México. El caso de la tortilla. Culiacán, Sinaloa: El Colegio de Sinaloa. 107 pp. (2000).
7. Segura-Nieto, M., Shewry, P.R., Paredes-López, O. Globulins of the pseudocereals: Amaranth, quinoa and buckwheat. En: *Seed Proteins,* eds., P.R. Shewry, R. Casey, Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 453-475 (1999).
8. Villegas, E., Vasal, S.K., Bjarnason, M. Quality protein maize-what is it and how it developed? En: *Quality Protein Maize,* ed., E.T. Mertz, St. Paul, MN, American Association of Cereal Chemistry, pp. 27-48 (1992).
9. Spuole, A.M., Saldivar, S.O., Bockholt, A.J., Rooney, L., Knabe, D.A. Nutritional evaluation of tortillas and tortilla chips from quality protein maize. *Cereal Foods World* 33: 233-236 (1986).

10 Altenbach, S.B., Kuo, C.C., Staraci, L.C., Pearson, K.W., Wainwright, C., Georgescu, A. Accumulation of a Brazil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein methionine. *Plant Mol. Biol.* 18: 235-245 (1992).
11. Saalbach, I., Waddell, D.R., Pickardt, T., Schieder O., Muntz, K. Stable expression of the sulphur-rich 2S albumin gene in transgenic vicia-narbonensis increases the methionine content of seeds. *J. Plant Physiol.* 85: 181-192 (1995).
12. Nordlee, J.A., Taylor, S.L., Townsend, J.A., Thomas, L.A., Bush R.K. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N. Eng. J. Med.* 334: 688-692 (1996).
13. Guzmán-Maldonado, S.H., Paredes-López, O. Functional products of indigenous plants to Latin America: Amaranth, quinoa, common beans and botanicals. En: *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects,* ed., G. Mazza, Lancaster, PA, USA: Technomic Publishing Company, Inc., pp. 293-328 (1998).
14. Chakraborty, S., Chakraborty, N., Datta, A. Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 3724-3729 (2000).
15. Barba de la Rosa, A.P., Herrera-Estrella, A., Utsumi, S., Paredes-López, O. Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *J. Plant Physiol.* 149: 527-532 (1996).
16. Rascón-Cruz, Q., Paredes-López, O. Comunicación personal (2003).
17. Osuna-Castro, J.A., Rascón-Cruz, Q., Napier, J., Fido, R., Shewry, P.R., Paredes-López, O. Overexpression, purification, and *in vitro* refolding of the 11S globulin from amaranth seed in *Escherichia coli. J. Agric. Food Chem.* 48: 5249-5255 (2000).
18. Shewry, P.R., Morell, M. Manipulating cereal endosperm structure, development and composition to improve end-use properties. *Adv. Bot. Res.* 34: 165-236 (2001).
19. Rooke, L., Békés, F., R. Fido, R., Barro. F., Gras, P., Tatham, A.S., Barcelo, P., Lazzeri, P., Shewry, P.R. Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in greatly increased dough strength. *J. Cereal Sci.* 30: 115-120 (1999).
20. Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J., Ohlrogge, J.B. Lipids. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants,* eds., B. Buchanan, W. Gruissem y R. Jones, Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, pp. 456-527 (2000).
21. Voelker, T.A., Worrell, A.C., Anderson, L., Bleibaum, J., Fan, C., Hawkins, D.J., Radke, S.E., Davies, H.M. Fatty acid biosynthesis redirected to medium chain in transgenic oilseed plants. *Science* 257: 72-74 (1992).

22. Napier, J. A., Michaelson, L. Towards the production of pharmaceutical fatty acids in transgenic plants. *J. Sci. Food Agric.* 81: 883-888 (2001).
23. Sayanova, O., Smith, M.A., Lapinskas, P., Stobart, A.K., Dobson, G., Christie, W., Shewry, P.R., Napier, J. Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4211-4216 (1997).
24. Kinney, A.J., Knowlton, S. Designer oils: The high oleic acid soybean. En: *Genetic Modification in the Food Industry- A Strategy for Food Quality Improvement,* eds. S. Roller y S. Harlander, London, UK: Blackie Academic & Professional, pp. 193-213 (1998).
25. Heyer, A., Loyd, J.R., Krossman, J. Production of modified polymeric carbohydrates. Curr. Opin. Biotechnol. 10: 169-174 (1999).
26. Bello-Pérez, A., Paredes-López, O. El almidón: Lo comemos pero no lo conocemos. Ciencia. 50(3): 29-33 (1999).
27. Denyer, K., Johnson, P., Zeeman, S., Smith, A. The control of amylose synthesis. J. Plant Physiol. 158: 479-487 (2001).
28. Slattery, C.J., Kavakli, I.H., Okita, T.W. Engineering starch for increased quantity and quality. Trends Plant Sci. 5: 291-298 (2000).
29. Schwall, G.P., Safford, R., Westcott, R.J., Jeffcoat, R., Tayal, A., Shi, Y.G., Gidley, M.J., Jobling, S.A. Production of very-high-amylose potato starch by inhibition of SBE A and B. Nat. Biotechnol. 18: 551-554 (2000).
30. Safford, R., Jobling, S.A., Sidebottom, C.M., Westcott, R.J., Cooke, D., Tober, K.J., Strongitharm, B.H., Russell, A.L., Gidley, M.J. Consequences of RNA inhibition of starch branching enzyme activity on properties of potato starch. Carbohyd. Polym. 35: 155-168 (1998).
31. Terada, R., Nakajima, M., Isshiki, M., Okagaki, R., Wessler, S.R., Shimamoto, K. Antisense waxy genes with highly active promoters effectively suppress waxy gene expression in transgenic rice. Plant Cell Physiol. 41: 881-888 (2000).
32. Graham, R.D., Welch, R.M., Bouis, H.E. Addressing micronutrient malnutrition through enhancing the nutritional quality of staple foods: Principles, perspectives and knowledge gaps. Adv. Agron., 70: 77-142 (2001).
33. DellaPenna, D. Nutritional genomics: Manipulating plant micronutrients to improve human health. Science 285: 375-379 (1999).
34. Bouis, H.E. Plant breeding: A new tool for fighting micronutrient malnutrition. J. Nutr. 132: 491S-494S (2002).
35. Welch, R.M. Breeding strategies for biofortified staple plant foods to reduce micronutrient malnutrition globally. J. Nutr., 132: 495S-499S (2002).
36. Hallberg, L. Perspectives of nutritional iron deficiency. Annu. Rev. Nutr., 21: 1-21, (2001).

37. Grusak, M.A., DellaPenna, D. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 50: 133-161 (1999).
38. Fenech, M. Micronutrients and genomic stability: A new paradigm for recommended dietary allowances (RDAs). Food Chem. Toxicol., 40: 1113-1117 (2002).
39. Frossard, E., Bucher, M., Machler, M., Mozafar, A., Hurrell, R. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. J. Sci. Food Agric., 80: 861-879 (2000).
40. King, J.A. Biotechnology: A solution for improving nutrient bioavailability. Int. J. Vitam. Nutr. Res., 72(1): 7-12 (2002).
41. Stylianopoulos, C., Serna-Saldívar, S.O., Arteaga-MacKinney, G. Effects of fortification and enrichment of maize tortillas on growth and brain development of rats throughout two generations. Cereal Chem. 79(1): 85-91(2002).
42. Rivera, J.A., González-Cossio, T., Flores, M., Romero, M., Rivera, M., Téllez-Rojo, M.M., Rosado, J.L., Brown, K.H. Multiple micronutrient supplementation increases the growth of Mexican infants. Am. J. Clin. Nutr. 74: 657-663 (2001).
43. Masuda, T., Goto F., Yoshihara, T. A novel plant ferritin subunit from soybean that is related to a mechanism in iron release. J. Biol. Chem. 276: 19575-19579 (2001).
44. Skikne, B., Fonz, D., Lynch, S.R., Cook, J.D. Bovine ferritin iron bioavailability in man. Eur. J. Clin. Invest. 27: 228-233 (1997).
45. Goto, F., Yoshihara, T., Shigemoto, N., Toki, S, Takaiwa, F. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. Nat. Biotechnol., 17: 282-286 (1999).
46. Lucca, P., Hurrell, R., Potrykus, I. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. Theor. Appl. Genet. 102: 392-397 (2001).
47. Murray-Kolb, L., Takaiwa, F., Goto, F., Yoshihara, T., Theil, E., Beard, J.L. Transgenic rice is a source of iron for iron-depleted rats. J. Nutr. 132(5): 957-960 (2002).
48. Dreosti, I.E. Zinc and gene. Mut. Res., 475(1-2): 161-167 (2001).
49. Raboy, V. Seeds for a better future: *Low phytate* grains help to overcome malnutrition and reduce pollution. Trends Plant Sci., 6(10): 458-462 (2001).
50. Halliwell, B. Vitamin C and genomic stability. Mut. Res., 475(1-2): 29-35 (2001).
51. Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Manios, Y., Roxborough, H.E., Shuch, W., Sheehy, P.J., Wagner, K.H. Vitamin E. J. Sci. Food Agric., 80: 913-938 (2000).
52. Shintani, D., DellaPenna, D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. Science, 282: 2098-2100 (1998).

53. Wheeler, G.L., Jones, M.A., Smirnoff, N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature, 393: 365-369 (1998).
54. Jain, A.K., Nessler, C.L. Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. Mol. Breeding. 6: 73-78 (2000).
55. Delgado-Vargas, F., Jiménez A.R., Paredes-López, O. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - Characteristics, biosynthesis, processing, and stability. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 40: 173-289 (2000).
56. Ames, J.M. y Hofmann, T. Selected natural colorants in foods and beverages. En: Chemistry and Physiology of Selected Food Colorants, eds., J.M. Ames y T. Hofmann, Washington, D.C., USA: American Chemical Society, pp. 1-20 (2001).
57. Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. Natural Pigments for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press, Boca Raton, FL., (2003)
58. Van den Berg, H., Faulks, R., Granado, H.F., Hirschberg, J., Olmedilla, B., Sandmann, G., Southon, S, Stahl, W. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. J. Sci. Food Agric., 80: 880-912 (2000).
59. Sandmann, G. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: Strategies, problems and achievements. Trends Plant Sci., 6: 14-17 (2001).
60. Romer, S., Fraser, P.D., Kiano, J.W., Shipton, C.A., Misawa, N., Schuch, W., Bramley, P.M. Elevation of the provitamin A content of transgenic tomato plants. Nat. Biotechnol., 18: 666-669 (2000).
61. Delgado-Vargas, F., Paredes-López, Avila-González, E. Effects of sunlight illumination of marigold flower meals on egg yolk pigmentation. J. Agric. Food Chem., 46: 698-706 (1998).
62. González-de-Mejía, E., Loarca-Piña, G., Ramos-Gómez, M. Antimutagenicity of xanthophylls present in Aztec marigold (Tagetes erecta) against 1-nitropyrene. Mut. Res., 389: 219-226 (1997).
63. Vanegas, P., Cruz-Hernández, A., Valverde, M.E., Paredes-López, O. Plant regeneration via organogenesis in marigold. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69: 279-283 (2002).
64. Del Villar-Martínez, A. y Paredes-López, O. Comunicación Personal, (2003).
65. Shewmaker, C.K., Sheehy, J.A., Daley, M., Colburn, S., Ke, D.Y. Seed specific overexpression of phytoene synthase: Increase in carotenoids and other metabolic effects. Plant J., 20: 401-412 (1999).
66. Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I. Engineering provitamin A (b-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. Science, 287: 303-305 (2000).
67. Beyer, P., Al-Babili, S., Ye, X., Lucca, P., Schaub, P., Welch, R., Potrykus, I. Golden rice: Introducing the b-carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. J. Nutr., 132: 506S-510S (2002).

68. Paredes-López, O., Silos, H., Cabrera, J.L., Rascón, Q. Método para la transformación genética y regeneración de plantas transgénicas de nopal. Patente en trámite. México, D.F., Agosto 9, (2000).
69. García-Saucedo, P. y Paredes-López, O. Comunicación Personal, (2003).
70. Clifford, M.N. Anthocyanins - Nature, occurrence and dietary burden. J. Sci. Food Agric., 80: 1063-1072 (2000).
71. Ferguson, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. Mutat. Res., 475(1-2): 89-111 (2001).
72. Bruce, W., Folkerts, O., Garnaat, C., Crasta, O., Roth, B., Bowen, B. Expression profiling of the maize flavonoid pathway genes controlled by estradiol-inducible transcription factors CRC and P. Plant Cell, 12: 65-79 (2000).
73. Smil, V. Magic beans. Nature, 407: 567 (2000).
74. Yu, O., Jung, W., Shi, R., Croes, R.A., Fader, G.M., McGonigle, B., Odell, J.T. Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues. Plant Physiol., 124: 781-793 (2000).
75. Muir, S.R., Collins, G., Robinson, S., Hughes, S., Bovy, A., De Vos, C., van Tunen, A.J., Verhoeyen, M.E. Overexpression of petunia chalcone isomerase in tomato results in fruit containing increased levels of flavonols. Nat. Biotechnol., 19: 470-474 (2001).
76. Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N.J., Zuker, C.S. An amino acid taste receptor. Nature, 416: 199-202 (2002).
77. Linforth, R.S., Savary, I., Pattenden, B., Taylor, A.J. Volatile compounds found in expired air during eating of fresh tomatoes and the headspace above tomatoes. J. Sci. Food Agric., 65: 241-247 (1994).
78. Lewinsohn, E., Schalechet, F., Wilkinson, J., Matsui, K., Tadmor, Y., Nam, K-H., Amar, O., Lastochkin, E., Larkov, O., Ravid, U., Hiatt, W., Gepstein, S., Pichersky, E. Enhanced levels of the aroma and flavor compound S-linalool by metabolic engineering of the terpenoid pathway in tomato fruits. Plant Physiol., 127: 1256-1265 (2001).
79. Taylor, S.L., Hefle, S.L Food allergies and other food sensitivities. Food Technol., 55: 68-83 (2001).
80. Mekori, Y.A. Introduction to allergic disease. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 36(S): S1-S18, (1996).
81. Kuiper, H.A., Kleter, G.A., Noteborn H.P., Kok, E. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. Plant J., 27: 503-528 (2001).
82. Metcalfe, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.A., Taylor, S.L., Fuchs, R. Assessment of the allergenic potential of food derived from genetically engineered crop plants. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 36(S): S165-S186 (1996).
83. Nakamura, R., Matsuda, T. Rice allergenic protein and molecular-genetic approach for hypoallergenic rice. Biosci. Biotechnol. Biochem., 60: 1215-1221 (1996).

BIOCONTROL DE PLAGAS AGRÍCOLAS Y ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS

E. Torres Sánchez
H. M. Cárdenas Cota
Ma. M. de la Torre Martínez

Introducción

El siglo XX terminó con la humanidad volteando la vista hacia su planeta para percatarse cómo había contaminado y destrozado su morada y alterado los ecosistemas, en el afán de utilizar su casa para beneficio de sí misma, con lo que surgió la conciencia y la necesidad de mantener habitable el planeta. Esta necesidad ha propiciado la búsqueda de alternativas tecnológicas para limpiar el planeta, así como de alternativas respetuosas con el medio ambiente para los procesos industriales y para los métodos de producción agropecuaria. La biotecnología ofrece estas alternativas y por eso se considera, en el siglo XXI, como una de las nuevas tecnologías fundamentales para el desarrollo sustentable.

La biotecnología ha tenido y continuará teniendo un impacto fundamental en la agricultura, no sólo por el desarrollo de mejores variedades de plantas cultivables como el maíz, la soya, la papa y el algodón; sino también por el uso de microorganismos para controlar a las plagas agrícolas, a los microbios que causan enfermedades en las plantas y para fertilizar los suelos, transformando el nitrógeno atmosférico en compuestos nitrogenados que pueden asimilar las plantas, o bien disolviendo y trayendo a la raíz de las plantas, fósforo y otros nutrientes. Estos microbios constituyen lo que podríamos llamar los agrobiológicos del siglo XXI, que sustituirán de manera creciente a los agroquímicos, especialmente a los pesticidas sintéticos que no se degradan en el medio ambiente y por lo tanto se acumulan, causando daños al ecosistema, y a la salud humana y animal por su toxicidad.

El uso de los organismos antagonistas, competidores, patógenos, parásitos o depredadores de insectos, para controlar a las poblaciones de insectos plagas, se denomina control biológico o biocontrol, y se basa en el hecho de que los insectos se vuelven plaga cuando su población aumenta más allá del umbral ecológico, debido a la desaparición de sus enemigos naturales, por lo que al restaurar la población de éstos, los insectos plaga serán atacados y su población disminuirá. Al disminuir la población del insecto que se había convertido en una plaga, disminuye también la población de sus enemigos naturales y se establece un equilibrio entre ellos. Los enemigos naturales de una especie de insectos son muy específicos para esa especie, es decir, son enemigos de determinado insecto y no atacan a todos los demás insectos, por lo que su utilización preserva el ecosistema.

Los organismos utilizados en biocontrol se seleccionan de tal manera que no afecten a la raza humana ni a otros animales, incluyendo por ejemplo, al ganado, a los animales domésticos, a los peces, y a los insectos benéficos, tales como las abejas o las catarinas. Lo anterior constituye simultáneamente una ventaja y desventaja para estos productos naturales, dada su especificidad, los agentes de biocontrol no merman la población de insectos distintos al blanco, por lo que son productos amigables para el medio ambiente; sin embargo, se necesita una gama amplia de productos para poder controlar las distintas plagas y no existe un producto único que contenga con todas ellas, como ocurre con los insecticidas químicos (1).

También se utilizan microbios para controlar a los microorganismos patógenos de plantas (fitopatógenos), impidiendo el ataque de los patógenos a las plantas. Por ejemplo, existe un hongo que se llama *Trichoderma,* que ataca y se alimenta de otros hongos y de esta forma cuando se aplica en el suelo combate a los hongos fitopatógenos (2). En la zona de la raíz de las plantas (rizosfera), se encuentran microorganismos que son los habitantes normales y protegen a la planta del ataque de microorganismos patógenos; sin embargo, el abuso del uso de compuestos químicos destruye a esta flora normal y su ausencia permite el establecimiento de otros microbios, incluyendo los fitopatógenos. Otra vez, como en el caso del control de insectos, el biocontrol trata de restaurar los ecosistemas, es decir la flora normal de la rizosfera (2).

Mención aparte merece otro tipo de organismos que se utilizan en este esfuerzo del biocontrol que son los nemátodos entomopatógenos (gusanos), *Steinernema* y *Heterorhabditis*, que son utilizados para controlar distintos insectos cuyas fases larvarias, se desarrollan en el suelo. Estos gusanos son los únicos bioinsecticidas con capacidad para desplazarse hasta llegar a su insecto blanco y además, tienen la particularidad de que pueden llevar a cabo su ciclo biológico completo *in vitro* en reactores como los utilizados para la producción de bacterias y de hongos, es decir se pueden producir en una fábrica (1). Se ha encontrado que cuando los nemátodos insecticidas se aplican al suelo, por ejemplo con el agua de riego, la población de los nemátodos patógenos de plantas disminuye, es decir ellos controlan de manera indirecta a estos gusanos que constituyen un serio problema en la agricultura. Hablando de nemátodos fitopatógenos, es importante recalcar que existen hongos que atacan a estos gusanos y se alimentan de ellos, por lo que son una alternativa como controladores de nemátodos (3).

También se utilizan microorganismos para evitar los daños a las plantas ocasionados por heladas y la pudrición de los frutos ya cosechados. En México se aisló una levadura que evita que las manzanas se pudran debido al ataque de hongos, así en lugar de sumergir a las manzanas después de la colecta en funguicidas, se podría utilizar esta levadura para este propósito, que es además, un organismo aprobado para utilizarse en alimentos e inofensivo para el hombre (4).

Además de utilizar los microorganismos para el control de plagas agrícolas y enfermedades de las plantas, se usan también para el control de la mosca doméstica y de distintos mosquitos transmisores de enfermedades como el dengue y el paludismo, por lo que el biocontrol es una herramienta importante también en el sector salud. En este caso los microorganismos empleados son *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* y *Bacillus sphericus*. Inclusive *B. thuringiensis* se utiliza en ovejas, para controlar parásitos externos y para ello, los animales son sumergidos en el bioinsecticida; también se utilizan hongos para combatir parásitos externos en ganado (5, 6).

Biotecnología y biocontrol

¿Cómo participa la biotecnología en el biocontrol? Fundamentalmente a través del desarrollo de tecnologías de procesos para la produc-

ción masiva de los agentes microbianos, siendo los más populares las bacterias y los hongos, pero se incluyen también la producción de virus y de nemátodos e inclusive de insectos, como *Trichograma,* en dietas artificiales. Además, la biotecnología participa también en el desarrollo de productos, incluyendo formulaciones con mayor vida de anaquel y mayor persistencia en el campo, así como agentes microbianos con mejores características.

El agente de biocontrol más estudiado y utilizado es *Bacillus thuringiensis,* conocido comúnmente como Bt. Este bacilo al esporular produce unas proteínas, llamadas Cry, que cristalizan y son tóxicas para los insectos (figura 1). En la tabla 1 se enlistan algunos productos comerciales formulados con esta bacteria (7). A los genes responsables de la síntesis de estas proteínas se les llama *cry.* La manipulación genética de los genes *cry* es una forma de mejorar la eficacia, ampliar el rango de hospederos y la relación costo beneficio de los bioinsecticidas formulados con Bt, con lo se permitiría la expansión del mercado.

Tabla 1
PRODUCTOS COMERCIALES DE *BACILLUS THURINGIENSIS* (BT)
FORMULADOS CON CEPAS SILVESTRES

Marca comercial	*Subespecie de Bt*	*Compañía*	*Especie blanco*
Bactospeine	*kurstaki* HD-1	Abbot	Lepidóptera
Biobit	*kurstaki* HD-1	Abbot	Lepidóptera
Dipel	*kurstaki* HD-1	Abbot	Lepidóptera
Florbac	*aizawai*	Abbot	Lepidóptera
Costar	*kurstaki* SA-12	Thermo trilogy	Lepidóptera
Delfin	*kurstaki* SA-11	Thermo trilogy	Lepidóptera
Thuricide	*kurstaki* HD-1	Thermo trilogy	Lepidóptera
Tekar	*israelensis*	Thermo trilogy	Díptera
Bactimos	*israelensis*	Abbot	Díptera
Novodor	tenebrionis	Abbot	Coleóptera
Trident	*tenebrionis*	Thermotrilogy	Coleóptera
Beta-Sin	*kurstaki* HD-1 y HD-73	Agrobionsa	Lepidóptera

Modificado de Baum, Johnson y Carlton (7).

Los genes *cry* se localizan generalmente en plásmidos de gran tamaño y pueden ser transferidos de una cepa a otra por conjugación; este mecanismo ocurre en la naturaleza y es la manera en que las bacterias intercambian material genético. En la tabla 2 se enlistan algunos productos comerciales de cepas de Bt obtenidas mediante técnicas de conjugación (7).

Tabla 2
PRODUCTOS DERIVADOS DE CEPAS TRANSCONJUGANTES DE Bt

Producto	*Cepa*	*compañía*	*Insecto blanco*
Agree	*aizawa*	Termo Triology	Lepidóptera
Condor	*kurstaki*	Ecogen	Lepidóptera
Cutlass	*kustaki*	Ecogen	Lepidóptera
Design	*aizawa*	Termo triology	Lepidóptera
Foil	*kurstaki*	Ecogen	Lepidóptera/ Coleóptera

Modificado de Baum, Johnson y Carlton (7).

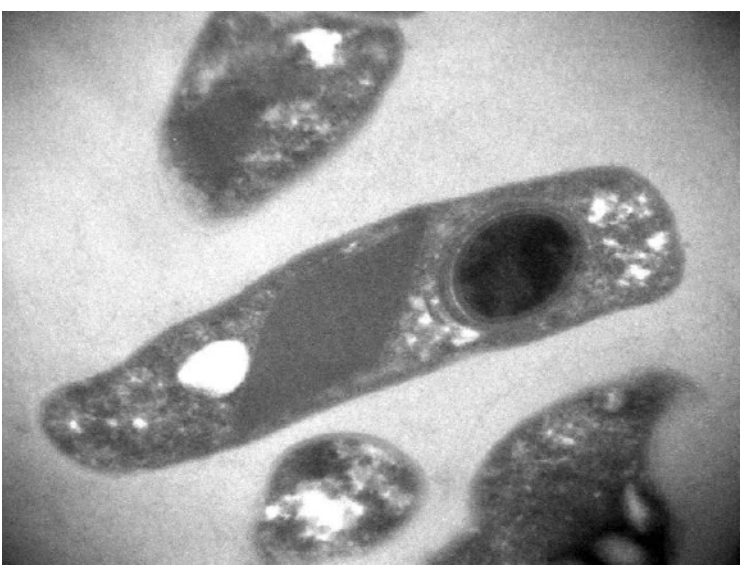


Figura 1
Bacillus thuringiensis var. kurstaki HD-73.

La conjugación tiene limitaciones para el mejoramiento de cepas de Bt y las metodologías del DNA recombinante permiten superarlas. Además es factible construir cepas con proteínas modificadas mediante ingeniería de proteínas para mejorar su toxicidad. Las pruebas de campo con proteínas recombinantes se iniciaron en 1990 y en la tabla 3 se enlistan los productos de Bt recombinantes que han obtenido el registro en los Estados Unidos de Norteamérica.

La manipulación genética de *B. thuringiensis* puede dar como resultado cepas con mayores rendimientos de proteínas Cry y mayor potencia insecticida, así como proteínas Cry con mejores características, tales como mayor toxicidad o estabilidad, (7).

Tabla 3
PRODUCTOS DE CEPAS Bt RECOMBINANTES REGISTRADOS
EN LOS ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA

Producto	*Compañía*	*Insecto blanco*	*Registro*
Raven	Ecogen	Lepidóptera/ Coleóptera	Enero 1995
Crymax	Ecogen	Lepidóptera	Febrero 1996
Lepinox	Ecogen	Lepidóptera	Diciembre 1996

Modificado de Baum, Johnson and Carlton (7).

Algunos de los productos para el control de plagas formulados con hongos entomopatógenos se listan en la tabla 4. Estos productos están elaborados con esporas, las cuales germinan cuando están en contacto con los insectos blanco, lo penetran y en el interior del insecto se reproduce el hongo usándolo como fuente de nutrientes. Posteriormente, si la humedad es adecuada, el hongo emerge del insecto (figura 2). El rango de insectos blanco es limitado para cada hongo ya que existe una alta especificidad. La biología molecular de estos hongos es menos conocida que la de Bt y no existen productos recombinantes todavía.

Figura 2
Picudo de algodón infectado por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*.

Producto	*Hongo*
Naturalis	*Beauveria bassiana*
Mycontrol-GH-OF	*Beauveria bassiana*
BotaniGard	*Beauveria bassiana*
Conidia	*Beauveria bassiana*
Ostrinil	*Beauveria bassiana*
Boverol	*Beauveria bassiana*
Bovesil	*Beauveria bassiana*
BeaSin	*Beauveria bassiana*
BioGreen	*Metarhizium anisopliae*
Bioblast	*Metarhizium anisopliae*
Bio1020	*Metarhizium anisopliae*
Green Muscle	*Metarhizium anisopliae*
MetaSin	*Metarhizium anisopliae*
PFR-97	*Paecilomyces fumosoroseus*
PreFeRal	*Paecilomyces fumosoroseus*
PaeSin	*Paecilomyces fumosoroseus*
Loginex	*Langenedium giganteum*
Mycotal	*Verticillium lecanii*
Vertalec	*Verticillium lecanii*
VertiSin	*Verticillium lecanii*
Betel	*Beauveria brongniartii*
Engerlingspiz	*Beauveria brongniartii*
Schweizer Beauveria	*Beauveria brongniartii*
Melocont	*Beauveria brongniartii*

Datos adaptados de Wraight *et al.* (8) y Butt *et al.* (9).

la 4
S FORMULADOS CON HONGOS
ATÓGENOS

Insecto plaga	*Productor*
Mosquitas blancas y áfidos	Troy Biosciences, EUA
Langostas y chapulines	Mycotech, EUA
Mosquitas blancas y áfidos	Mycotech, EUA
Broca del cafeto	AgrEvo, Alemania.
Barrenador del maíz	NPP (Calliope), Francia.
Escarabajo rojo	República Checa/Eslovaquia
Escarabajo rojo	República Checa/Eslovaquia
Mosquitas blancas, picudos del chile y del algodón	Agrobionsa, México.
Escarabajo cabeza roja	Australia.
Termitas	EcoScience, EUA
Gorgojo del vino	Bayer, Alemania.
Langostas y chapulines	Cabi, Reino Unido.
Picudos del chile y del algodón	Agrobionsa, México
Mosquitas blancas y áfidos	Thermo Trilogy, EUA
Mosquitas blancas	BioBest, Bélgica.
Mosquitas blancas	Agrobionsa, México.
Mosquitos	AgraQuest, EUA
Mosquitas blancas y trips	Koppert, Holanda.
Áfidos	Koppert, Holanda.
Áfidos	Agrobionsa, México.
Mosca pinta	NPP (Calliope), Francia
Escarabajos	Andermatt, Suiza
Escarabajos	Eric Schweizer, Suiza
Escarabajos	Kwizda, Austria

Algunos de los productos comerciales que contienen nemátodos de los géneros *Steinernema* y *Heterorhabditis* se muestran en la tabla 5. Las formas infectivas juveniles (figura 3) de estos nemátodos, que contienen en el intestino a una bacteria simbionte, son aplicadas en el campo con el agua de riego o bien embebidas en esponjas son depositadas en el suelo. Una vez en el suelo, los gusanos se desplazan para buscar a su hospedero. Se utilizan nemátodos silvestres cultivados en el laboratorio *in vivo* o *in vitro*. Actualmente se están empezando a utilizar técnicas de biología molecular para dilucidar que genes están involucrados en la colonización de la bacteria en el intestino del insecto y para estudiar cómo actúan las endotoxinas que produce la bacteria simbionte sobre el insecto blanco (11, 12).

Tabla 5
PRODUCTOS COMERCIALES QUE CONTIENEN NEMATODOS ENTOMOPATÓGENOS

Nemátodo	*Producto*	*Compañía*
S. carpocapsae	Mioplant	Novartis
	Boden-Nuezlinge	Rhone-Poulanc
	Biosafe	SDS Biotech
	Biosafe	Termo-Trilogy
	Biosafe-N	Termo-Trilogy
	Bio Vector	Termo-Trilogy
	Vector TL	Lesco
	Helix	Novartis
S. feltiae	Exhibit	Novartis
	Stealth	Novartis
	Nemasys	Microbio
	Entonem	Koppert
	X-GNAT	E.C. Geiger
	Magnet	Amycel-Spawn Mate
S. riobravis	BioVector	Termo Trilogy
	Vector MC	Lesco
S. scapterisci	Proactant	BioControl
H. megidis	Nemasys-H	Microbio
	LarvaNem	Koppert

Adaptado de P. Grewal y R. Georgis (10).

En cuanto a los bioherbicidas, sólo cuatro productos habían sido registrados hasta 1999 en los Estados Unidos de Norteamérica y Canadá: De Vine (Abbot) formulado con el hongo *Phytophtora palmivora* para el control en cítricos de *Morrenia odorata*, Collego (Pharmacia & Upjohn) formulado con *Colletotrichum gloeosporiodes* f. sp. *Aeschynomene* BioMal (Philom Bios) que contiene esporas de *C. Gloeosporiodes* f. sp. *Malvae* para controlar *Malva pusilla L.* y *Dr. Biosedge (Tifton Innovation Corporation)* formulado con *Puccinia canalicularta* para controlar *Cyperus esculentus*. En general el problema con los bioherbicidas es que sigue siendo aún un mercado reducido (13).

Figura 3
Forma infectiva juvenil del nemátodo entomopatógeno *Steinernema feltiae.*

Biocontrol en México

En México las experiencias para el control biológico datan desde 1942, cuando se empezó a usar un himenóptero para controlar a la mosca prieta de los cítricos. Posteriormente, en 1961 se combatió a la mosca pinta o salivazo de los pastos (*Aeneolamia postica*) y a una plaga del algodón (*Antonina graminis*) usando un insecto depredador (*Zelus mubilais*)

y dos parasitoides (*Anagirus antoninae* y *Dusmetia sanguani*). Desde entonces se producen principalmente insectos parasitoides y depredadores; los productores más importantes eran los Centros Regionales de Estudios y Reproducción de Organismos Benéficos, que hasta 1990 eran organismos dependientes del gobierno federal y a partir de ese año fueron transferidos en uso y administración a organismos y asociaciones de productores agropecuarios. Estos centros producen fundamentalmente *Trichogramma,* una avispa que parasita huevecillos de insectos empleada para controlar lepidóteros (mariposas) como el gusano bellotero. Algunos centros producen además al depredador *Chrysoperla carnea,* que se utiliza para controlar la mosquita blanca, aunque se alimenta también de larvas y huevecillos de otros insectos. Cabe destacar que existen algunas empresas privadas pequeñas que también producen parasitoides y depredadores. En nuestro país se han integrado programas para el biocontrol de plagas en tomate, chile, berenjena, pepino melón, alfalfa, algodón, arroz, caña de azúcar, cítricos, frijol, frutales, manzana, sorgo, soya y trigo (14).

Sin embargo, el uso de agentes microbianos para el control de plagas prácticamente estaba restringido a la aplicación de *Bacillus thuringiensis* y en los últimos años se han introducido principalmente hongos entomopatógenos. Para el control de hongos fitopatógenos se ha extendido la aplicación del hongo *Trichoderma* y de la bacteria *Bacillus subtilis*. No obstante, la mayoría de estos productos son importados y sólo recientemente se ha iniciado la producción en México de *Bacillus thuringiensis*, de forma intermitente, a través de tres empresas, dos con tecnología desarrollada en México en el CINVESTAV-IPN y una con tecnología cubana. También en nuestro país se producen *Trichoderma* y *Bacillus subtilis*; y se tiene conocimiento de dos empresas que producen el hongo y dos mas que producen la bacteria. Una de ellas utiliza tecnologías desarrolladas en CINVESTAV-IPN para la producción de ambos microbios. Lamentablemente, no existe un registro de todas las empresas que producen en México productos para biocontrol, ni una lista actualizada de los productos disponibles en el mercado, entre otras razones porque los parasitoides y depredadores se comercializan por el nombre del insecto y no bajo nombres comerciales.

En las empresas agrícolas que tienen laboratorios para reproducir parasitoides y depredadores, su producción es para autoconsumo y ocasionalmente venden sus excedentes, mientras que algunos laboratorios reproductores que habían estado produciendo en formas subsidiada, al

retirarles los subsidios, han disminuido su producción e inclusive han cerrado. Por otra parte, las empresas de capital privado que han participado en el mercado de agentes de biocontrol son micro o pequeñas empresas, y su destino ha sido el mismo que el de otras empresas de su tamaño en México, donde después de pocos años desaparecen. Así es como en los últimos diez años han surgido algunas empresas de biocontrol en México con vida efímera, por lo que prácticamente la única empresa mexicana madura en esta rama económica es Agrobiológicos de Sinaloa S.A. de C.V. (Agrobionsa).

De acuerdo con el directorio *¿Quién es quién en Control Biológico en México?* en 1999 existían 223 profesionales, 45 grupos de investigación, 16 instituciones de enseñanza e investigación, siete sociedades científicas y 64 empresas e instituciones que comercializaban organismos benéficos. De éstos, 20 producían hongos entomopatógenos, principalmente *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisoplae*, siendo la mayoría de ellos los antiguos Centros Regionales de Estudios y Reproducción de Organismos Benéficos (15). Sin embargo, en el Directorio Fitosanitario de SAGARPA de 2000 (16) sólo se registraron 62 centros reproductores de organismos benéficos, de los cuales más de 50% cerraron o están a punto de cerrar, entre otros factores porque por su tamaño les ha resultado difícil soportar la contracción de la agricultura mexicana y la comercialización más agresiva por parte de las compañías de agroquímicos que han sentido amenazado su mercado.

Hace diez años los agricultores mexicanos eran reacios a utilizar agentes microbianos para el control de plagas, pero la aprobación en los Estados Unidos de Norteamérica de la Ley de Inocuidad Alimentaria obligó a los agricultores que exportan sus productos a ese país a modificar sus prácticas agrícolas, para que sus productos cumplieran con las nuevas normas de residuos de pesticidas, por lo que el uso de agentes microbianos para el control de plagas y de enfermedades aumentó.

En los últimos cinco años el uso en México de productos para biocontrol se ha incrementado, a pesar de que son en su mayoría importados y tienen un costo elevado. La producción de los mismos en México tiene la ventaja de poder utilizar tecnologías desarrolladas en el país, con lo que los costos de producción se reducen, se crean empleos y además se propicia la utilización de organismos nativos, que son más eficaces porque están adaptados a las condiciones ambientales de las regiones de las cuales se aislaron y de esa forma se evita introducir al ecosistema micro-

organismos aislados en otros ecosistemas. Sin embargo, la vinculación entre biotecnólogos, bioingenieros, entomólogos, fitopatólogos y agrónomos ha sido muy pobre en nuestro país y esperamos que esta situación cambie. Vale la pena señalar que en la convocatoria 2002 de fondos sectoriales SAGARPA-CONACYT una de las áreas específicas fue control biológico, para propiciar este esfuerzo.

Regulación de agentes para el control biológico en México

En octubre de 1985 se creó en México la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Substancias Tóxicas (CICLOPLAFEST). Esta Comisión estableció, en abril de 1996, la norma NOM-070-FITO-1995, en la que se establecen los requisitos y especificaciones fitosanitarias para la importación, introducción, movilización y liberación de agentes de control biológico. En esta norma se define a los agentes de control biológico como los parasitoides, depredadores o agentes patogénicos empleados para el control y regulación de poblaciones de plagas. Los requisitos para el registro de estos agentes de control biológico actualmente son los mismos que los establecidos para los pesticidas químicos, pero existe un proyecto de reglas de procedimiento para el registro de plaguicidas y fertilizantes que dice textualmente: "... debido a la baja peligrosidad a la salud humana y el ambiente que representan los productos señalados cuando son utilizados en el control de plagas, se elaboró un listado de requisitos para el registro de estos productos, diferenciándolos de los requisitos establecidos para el registro de plaguicidas de síntesis química...". Cuando estos requisitos sean una realidad se resolverán parte de los problemas que aquejan a los pocos productores mexicanos de estos agentes y podrán registrar sus productos. Por otro lado, el uso de sustancias tóxicas en México se ha multiplicado en los últimos años y el consumo de plaguicidas se incrementa anualmente a razón de 10%, mientras que el de las sustancias tóxicas y peligrosas incrementa en más de 30%; lo que ha permitido que el número de productos que entran en contacto con la población, se incremente en más de seis veces (17). Por lo anterior resulta necesario modificar las prácticas agrícolas para no deteriorar la salud de los mexicanos, preservar el hato ganadero y conservar el medio ambiente.

La creación de empresas para la producción de agentes microbianos de biocontrol es un ejemplo de casos exitosos de la vinculación academia-industria y demuestra que empresas pequeñas tienen acceso a la biotecnología. A continuación analizaremos el caso particular del esfuerzo de vinculación que dio origen a la creación de la empresa Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V. (Agrobionsa), una empresa privada mexicana que es líder en la producción de hongos para el control de plagas de insectos.

El caso de Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V.

El Centro de Ciencias de Sinaloa (CCS) es un organismo público descentralizado del gobierno del estado de Sinaloa creado por decreto en junio de 1992 y en el cual se estableció desde mayo de 1993, la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE). Por acuerdo de la DIDE con el director general del CCS se invitó a colaborar como asesor a uno de los autores (Mayra de la Torre). El grupo de la DIDE y ella empezaron a analizar qué programas de investigación y desarrollo relacionados con la biotecnología era factible llevar a cabo en el estado de Sinaloa, considerando las necesidades e infraestructura regionales a corto y a mediano plazo. Se llegó a la conclusión que entre otros, era pertinente generar proyectos multidisciplinarios de investigación y desarrollo sobre el control biológico de insectos y de enfermedades de las plantas, en particular para controlar las infecciones causadas por hongos fitopatógenos y por ello, se empezó a trabajar en este esfuerzo.

En aquellos tiempos había preocupación por el arribo de la plaga de la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) a Sinaloa. Se discutía si había llegado el biotipo B de *Bemisia tabaci*, como se le conocía a lo que hoy es la especie *Bemisia argentifolii*, conocida comúnmente como mosquita blanca de la hoja plateada, por la coloración que adquieren las hojas de calabazas cuando son atacadas por este insecto. El manejo integrado de plagas (MIP) estaba cobrando importancia y por ende el control biológico como una herramienta primordial. En la primera mitad de los años noventa, se utilizaban en Sinaloa insectos depredadores y parasitoides para el control del barrenador de la caña de azúcar, y Sinalopasta utilizaba *Bacillus thuringiensis* para el control de gusano alfiler en tomate. Sin embargo, la

mayoría de los agricultores todavía no estaban convencidos de que el biocontrol fuera útil, aun cuando tenían problemas para vender sus productos en los Estados Unidos de América mismos que eran regresados de la frontera por su alto contenido de residuos de plaguicidas químicos.

En 1993, ante la amenaza de que la mosquita blanca se convirtiera en un problema grave en Sinaloa, como parte de las acciones del comité multi-institucional formado *exprofeso* para atender el problema, un grupo representativo de distintas organizaciones se reunió en el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico (CNRCB) de SAGARPA en Tecomán, Colima, con el propósito de conocer sobre el uso del control biológico de plagas agrícolas y determinar qué sería aplicable en Sinaloa. Este Centro tenía una colección de cepas de hongos entomopatógenos, que fueron aisladas en distintas partes de la República y habían mostrado patogenicidad contra mosquita blanca. Los hongos podrían utilizarse en un programa para el control biológico de esta plaga en el que se podría incluir al depredador *Chrysoperla sp* (crisopa). Las cepas de hongos fueron enviadas inicialmente a Culiacán a través de una persona, que por ignorancia, no las conservó de manera adecuada y se perdieron. Posteriormente, el depositario fue el Centro de Ciencias de Sinaloa.

Como parte de las actividades del comité, en donde el grupo de la DIDE jugó un papel importante de coordinación técnica, se elaboró el Proyecto Multidisciplinario e Interinstitucional para el Control de la Mosquita Blanca (*Bemisia tabaci*) en Sinaloa. Este proyecto estaba integrado por 15 subproyectos con la participación de 13 instituciones, e incluía manejo integrado, control sanitario y el montaje de técnicas para la identificación de los biotipos A y B de *Bemisia tabaci*. Para el control biológico se propusieron la producción masiva de un depredador (*Chrysoperla sp*) y de hongos entomopatógenos. El proyecto fue aprobado por la SAGAR (hoy SAGARPA) y los recursos que aportó se aplicaron a la construcción de un laboratorio para la producción del depredador a cargo del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Sinaloa.

Como parte de la práctica agrícola hasta 1994 en Sinaloa, la soca de los cultivos de hortalizas no era retirada al final del ciclo agrícola, sino al inicio de la siguiente. Los estudios fenomenológicos mostraron que esto favorecía la infestación con mosquita blanca, al grado de que en 1994 se

afectaron 33 000 hectáreas de soya con más de 5 000 hectáreas con pérdida total. A partir de este conocimiento se estableció un programa de control de socas, obligando a los agricultores a eliminarla al final del ciclo agrícola para abrir una ventana en la que no hubiese cultivos y evitar así la reproducción de la mosquita blanca.

El agricultor Eduardo Torres Pompa aplicaba esporas del hongo *Aschersonia aleyrodes* para controlar a la mosquita blanca de los cítricos (*Dialeurodes citrii*) en su huerta de naranjos "El Tío Chapo". Las esporas le eran proporcionadas por el CNRCB, mientras que Enrique Garza, investigador de ese Centro, daba la asesoría para su manejo. Eduardo Torres Pompa al enterarse del problema con mosquita blanca en las hortalizas, se presentó en una de las reuniones del comité para el control de la mosquita blanca y puso a disposición el laboratorio de producción de hongos entomopatógenos que estaba construyendo para autoconsumo, ya que el CNRCB no podía satisfacer sus necesidades de hongos, porque su función no es la producción masiva de esporas de hongos para fines comerciales.

Fue gracias a estas reuniones que Héctor Cárdenas, Jorge Gastelum y Mayra de la Torre entramos en contacto con Eduardo Torres Pompa y su hijo Eduardo Torres Sánchez, y fuimos a visitar la huerta. Para llegar pasamos por varios campos agrícolas, infestados con mosquita blanca, al mover la hierba caminábamos entre nubes de mosquitas y cuando entramos en la huerta, notamos la ausencia del insecto. Los árboles estaban muy cargados de naranjas hermosísimas y en la huerta había catarinas, crisopas y otros insectos, sin que los árboles estuvieran dañados; el contraste era impactante. Eduardo Torres Pompa nos dijo que desde hacía algunos años habían dejado de usar insecticidas químicos y sólo les faltaba eliminar los fertilizantes para poderle incorporar a las naranjas "Tío Chapo", la denominación de producto orgánico. Después, nos mostró las instalaciones que habían construido en el km 15 de la carretera Culiacán-Nogales para producir hongos entomopatógenos. A partir de ahí nació una relación que se ha fortalecido con el tiempo. Sin embargo, fueron necesarias varias pláticas para convencerlos de que era importante continuar con sus planes de producción comercial y que el mercado de los agentes microbianos para el control de plagas y de enfermedades agrícolas se incrementaría. Le ofrecimos el apoyo técnico para la pro-

ducción, el control de calidad, y para la conservación y el manejo de las cepas.

Con la misión de producir insumos agrícolas amigables con el medio ambiente, el 30 de agosto de 1994 se constituyó legalmente la empresa Agrobiológicos del Noroeste, S.A. de C.V. (Agrobionsa) y la producción empezó un mes después.

El camino para abrirse paso fue muy difícil y se enfrentaron diversos problemas, entre ellos los legales relacionados con el registro de los productos. Esos problemas persisten a la fecha porque como se mencionó existe un proyecto de reglas de procedimiento para el registro de plaguicidas y fertilizantes que tienen como principio activo agentes microbianos, que incluye requisitos diferentes a los solicitados para los plaguicidas de síntesis química, pero a la fecha no ha sido aprobado. Cabe destacar que a pesar de los problemas para el registro de agentes microbianos para biocontrol, la SAGARPA estableció desde 1995 normas para el manejo de algunas plagas que incluyen el uso de agentes biológicos, tales son los casos de los programas para el control de plagas en: mosquita blanca (NOM – 020 – FITO – 1995), de la langosta (NOM – 049 – FITO – 1995) y de las plagas del algodonero (NOM – 026 – FITO – 1995). Es muy común que los avances científicos y tecnológicos vayan por delante las modificaciones en materia de legislación.

La empresa enfrentó también problemas tecnológicos relacionados con la robustez del proceso de producción, por lo que al principio existían problemas de variabilidad de lote a lote, los rendimientos de esporas para las distintas cepas de hongos eran muy diversos, la vida de anaquel de las esporas no era adecuada y había pérdidas de viabilidad importantes en tiempos muy cortos. Sin embargo, estos problemas se fueron resolviendo, ya que la empresa tiene un programa permanente de innovación tecnológica, participa en congresos en México y en el extranjero, mantiene una vinculación permanente con investigadores del Centro de Ciencias de Sinaloa, CINVESTAV-IPN, Universidad Autónoma de Chapingo, CAMBIOTEC-UNAM, SAGARPA, INIFAP, Escuela de Agricultura-UAS, con el gobierno de Sinaloa y con CESAVESIN. Además, Agrobionsa ha aportado fondos para investigación y patrocinado las tesis de diversos alumnos tanto a nivel licenciatura como posgrado, e inclusive acaba de incorporar a su personal dos investigadores.

Asimismo la empresa asesora permanentemente a los agricultores sobre el manejo de sus productos en campo, realiza pruebas de campo con ellos y trabajos en parcelas demostrativas de los mismos agricultores. Así, poco a poco logró abrir mercado, demostrar a los agricultores que el control biológico de plagas utilizando agentes microbianos funciona en el campo y se convirtió en una empresa de base tecnológica líder en su campo en México. Agrobionsa nació como una empresa familiar, actualmente es una empresa pequeña en constante crecimiento que desarrolla nuevos productos comerciales y se consolida con los productos que salieron al mercado hace varios años (tabla 6, figura 4). Recientemente empezaron la producción del hongo *Trichoderma* para el control de hongos entomopatógenos.

Figura 4
Productos para biocontrol de Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V.

Tabla 6
PRODUCTOS DE AGROBIONSA

Producto	*Ingrediente activo*	*Fecha inicio de la producción*	*Insectos controlados*
PAE-SIN	*Paecilomyces fumosoroseus*	Octubre 1994	Mosquita blanca
META-SIN	*Metarhizium*	Octubre 1994	Picudos de chile y algodón
	Anisopliae		Barrenador de la caña Mosca pinta Langosta Chapulín
BEA-SIN	*Beauveria bassiana*	Diciembre 1994	Picudo del chile Mosquita blanca Picudo del algodón Broca del cafeto Langosta Chapulín Palomilla de la manzana Gallina ciega
VERTI-SIN	*Verticillium lecanii*	Enero 1996	Pulgones (*Aphis spp*) Pulgón lanígero Mosquita blanca Trips
BETE-SIN	*Bacillus thuringiensis*	Octubre 1996	Gusanos: bellotero, falso medidor, peludo, cogollero, soldado, terciopelo, del cuerno, del fruto del tomate. Palomilla del dorso de diamante, Barrenador de la caña, Mariposita blanca

El biocontrol en el planeta y también en nuestro país es una realidad, los agentes microbianos ya son aceptados y buscados por el agricultor que exporta sus productos o los comercializa como productos orgánicos en nuestro país. En México han surgido multitud de empresas caseras, porque la palabra fermentación se relaciona con la fabricación casera de tepache y otras bebidas fermentadas, sidra, mezcal, etc., y esto hace pensar que se pueden producir los agentes microbianos en tinas en un patio y sólo se requieren las cepas. Eso es una falacia, ya que los procesos para producción de estos microbios para el control de plagas, requieren de esterililidad y controles de temperatura, de pH, de los niveles de oxígeno disuelto y de otras variables, para que el microorganismo que se desarrolla sea el deseado, sea virulento y mantenga su viabilidad durante el almacenamiento; independientemente de que se trate de esporas de hongos, esporas de bacterias, virus o nemátodos. En el caso de *Bacillus thuringiensis* se requiere que se forme la proteína tóxica que se encuentra en forma de protoxina. Es decir estos procesos son distintos de las fermentaciones alcohólicas tradicionales y sin una tecnología de procesos adecuada y control de calidad, los productos obtenidos no garantizan su funcionamiento en campo y la distribución y uso de los mismos puede destruir la credebilidad del agricultor en el biocontrol. También han surgido recetas caseras y empresas que mezclan distintas plantas, ajo y chiles para producir bioinsecticidas, estas mezclas son más bien repelentes de insectos, pero son aceptadas por los agricultores ya que hay una gran necesidad de productos alternativos a los insecticidas químicos tradicionales para controlar plagas y enfermedades que son resistentes a los agroquímicos tradicionales.

Además las empresas de agroquímicos establecidas, tanto nacionales como extranjeras, están buscando tecnologías para fabricar agrobiológicos porque prevén que en pocos años las ventas de sus productos tradicionales se derrumbarán. En México, dentro de estas empresas se encuentran Internacional Química de Cobre que produce *Bacillus thuringiensis* y Quimia Internacional que fabrica *Bacillus subtilis* y *Trichoderma.*

El agricultor demanda de las empresas productos que le permitan resolver todos los problemas de plagas y enfermedades de sus cultivos durante los distintos estadíos de desarrollo de la planta y la asesoría para el manejo en campo de estos productos. Así que las empresas de agro-

biológicos se ven obligadas a tener una gama de productos para proporcionar al agricultor el servicio requerido. El esquema seguido por estas empresas es tener una planta de fermentaciones flexible, que le permita con pocos cambios en su línea de producción fabricar sus distintos productos, desarrollar formulaciones adecuadas a las necesidades del agricultor de la región en donde se va a aplicar, aislar microorganismos de insectos muertos y de plantas sanas localizadas en zonas en donde coexisten con plantas enfermas y trabajar junto con los investigadores y los agricultores. Se puede prever que este tipo de empresas se va a multiplicar y van a ser una competencia para las grandes trasnacionales.

Por otro lado, se va a seguir diversificando el número de microorganismos usados como agentes para el control biológico de insectos y de fitopatógenos, utilizando distintos géneros y especies aislados de diferentes regiones del país, por lo que la biodiversidad mexicana va a ser una fuente de ingreso para las empresas mexicanas. El biocontrol se va a extender a otros campos y va a cobrar importancia en las tecnologías postcosecha para impedir la pudrición de frutos, en la producción pecuaria para el control de parásitos externos y el sector salud para el combate de vectores transmisores de enfermedades. También es probable que se incremente el uso de microorganismos para el control de malezas.

Dada la presión que existe en contra del uso de los cultivares transgénicos, es probable por ejemplo, que en el caso del maíz, las plantas transgénicas resistentes a insectos sean sustituidas en México por el manejo integrado de plagas y se intensifique el uso no sólo de insectos benéficos, sino también de microorganismos.

Así pues biotecnología para control de plagas y enfermedades de las plantas es una realidad en México, es un área donde la vinculación academia-industria ha dado y seguirá dando frutos y ha demostrado que es factible que la microindustria, industrias pequeñas y medianas tengan acceso a las tecnologías modernas, como la biotecnología.

Bibliografía

1. Asaff-Torres, A., Reyes-Vidal, Y., López, López, V.E., M. de la Torre. Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva* (México), 21: 291-295 (2002).
2. Herrera-Estrella, A. Medio ambiente, control biológico y hongos parásitos. *Avance y Perspectiva* 17:195-204 (1998).

3. Cepeda-Siller, M., Gallegos-Morales, G. Efectividad biológica del nematicida Ditera (*Myrothecium verrucaria*) para el control de *Ditylenchus dipsaci* en ajo (*Allium sativum* L.) en Abasolo, Guanajuato, México. En: *Memorias del XXV Congreso Nacional de Control Biológico. Hermosillo,* Sonora, pp. 59-64 (2002).
4. Trevizo-Enriquez, M.G., Guerrero-Prieto, V.M., Figueroa-Valenzuela, C., Gardea- Bejar A.A., Martínez-Romero, S., Ibarra-Montak, C. Uso de levaduras nativas como agentes de control biológico contra *Penicillium expanzum* en manzana Golden Delicious en poscosecha en Chihuahua, México. En: *Memorias XIX Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología A.C.* Monterrey, Nuevo León. F-70 (2002).
5. Sahún, A., Lezama-Gutiérrez, R. Galindo-Velasco, E.. Susceptibilidad de adultos de *Haematobia irritans* (Diptera Muscidae) a los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisoplae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) en laboratorio. En: *Memorias del XXV Congreso Nacional de Control Biológico*. Hermosillo, Sonora, pp. 196-199 (2002).
6. M.A. Muro, P. Bates, A.J. Brooiks, D. Moore, M. A. Taylor, R. Wall. Studies on the use of entomopathogenic fungi for biological control of sheep scab mite *Psoroptes ovis*. En: Program and Abstracts XXXV Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Foz do Igauassu, Brazil. 94 (2002).
7. Baum, J.A., Johnson, T.B., Carlton, B.C. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant bioinsecticde products. *En Biopesticdes: Use and Delivery*. Franklin R. Hall and Julius J. Menn (editores). Humana Press, Totowa, New Jersey. *Methods in Biotechnology* 5: 189-210 (1999).
8. Wraigt S.P., Carruthers, R. I. Production, delivery and use of mycoinsecticides for control of insect pests on field crops. *En Biopesticides: Use and Delivery*. Franklin R. Hall y Juliuis J. Menn (editores). Humana Press, Totowa, New Jersey. *Methods in Biotechnology* 5: 233-269 (1999).
9. Butt T.M., Harris, J.G., Keith A. Powell. Microbial biopesticides: En *Biopesticides: Use and Delivery*. Franklin R. Hall and Juliuis J. Menn (editores). Humana Press, Totowa, New Jersey. *Methods in Biotechnology* 5: 23-44 (1999).
10. Grewal, P. G., Georgis, R. Entomopathogenic nematodes. En *Biopesticides: Use and Delivery*. Franklin R. Hall and Juliuis J. Menn (Editors). Humana Press, Totowa, New Jersey. *Methods in Biotechnology* 5: 271-299 (1999).
11. Tan, L. Grewal, P. S.. Endotoxin activity of lipopolysaccharide produced by *Moraxella osloensis* against the grey garden slug *Deroceras reticulatum*. En: Program and Abstracts XXXV Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Foz do Igauassu, Brazil p. 36 (2002).
12. Vivas, E.I., Goodrich-Blair, H. *Xenorhabdus nematophilus* as a model for host-bacterium interactions: *rpo*S is necessary for mutualism with nematodes. *J Bact.* 183(16): 4687-4693 (2001).

13. Pligeram, A.L. Mycoherbicides. En: *Biopesticides: Use and Delivery*. Franklin R. Hall and Juliuis J. Menn (editores). Humana Press, Totowa, New Jersey. *Methods in Biotechnology* 5: 359-370 (1999).
14. Barrera F.J. Introducción, filosofía y alcances del control biológico. En: *Memorias del XIII Curso Nacional de Control Biológico*. Loiza Villergasa J.M. y Martínez Diaz G. (coordinadores). Hermosillo, Son. pp. 1-12 (2002).
15. Rodríguez del Bosque, L., Arredondo Bernal, H. Quien es quien en control biológico en México. Directorio de especialistas, instituciones y laboratorios de organismos benéficos. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Río Bravo. Folleto técnico Núm. 23. Tamaulipas, México (1999).
16. SAGARPA. Centros Reproductores de Organismos Benéficos. En: Directorio Fitosanitario. Sección F. F1-F26. (2000).
17. Informe sexenal de CICLOPLAFEST (1994-2000). http://www.stps. gob.mx/312/publicaciones/cicloplafest.htm#1.

LAS HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE LAS PLANTAS Y PARA SU MEJORAMIENTO GENÉTICO

I. Torres-Pacheco
M. M. González Chavira
R. G. Guevara González

Introducción

Se estima que para el año 2025 habrá en la Tierra ocho mil millones de habitantes; aproximadamente dos mil millones más que en la actualidad. Asimismo, se ha afirmado que actualmente existen alrededor de 800 millones de seres humanos que padecen alguna forma de hambre. La agricultura sigue siendo la fuente primaria de alimentos e independientemente de los excedentes de los países desarrollados, la seguridad alimentaria en los países en desarrollo depende esencialmente de ellos mismos. Los economistas señalan que la transferencia neta de alimentos de una región del planeta a otra normalmente no rebasa el 10% (1). No obstante no hay más suelo que incorporar al cultivo; inclusive, por ejemplo en México, se está reduciendo la superficie cultivable por efecto de los fenómenos de erosión y del crecimiento de la mancha urbana. Así que el reto es incrementar la capacidad productiva con un impacto mínimo en el ambiente.

La revolución verde que impulsó un incremento significativo en los rendimientos agrícolas, y que ha permitido también el desarrollo de nuevas variedades de vegetales (figura 1), desafortunadamente trajo consigo también algunos efectos que han contribuido al deterioro ambiental. El uso masivo de pesticidas químicos como estrategia para luchar contra las plagas y enfermedades y así aumentar la producción no siempre ha tenido el efecto esperado, aunque su uso ha crecido hasta diez veces en el periodo de 1945 a 1989. Curiosamente los daños causados por plagas y enfermedades se incrementaron de 7 a 13% en el mismo periodo.

No se puede asumir una posición a ultranza contra los agroquímicos, pero su uso debe darse con fundamento en el conocimiento del parásito (etiología), de los factores ambientales que influyen en el desarrollo del síndrome (epidemiología), y del huésped (la planta y sus mecanismos de resistencia o susceptibilidad). Es en este contexto que se visualiza el diagnóstico de enfermedades en plantas en este documento.

Figura 1

DESARROLLO DE NUEVAS VARIEDADES

Variedades de maíz generadas por el Programa de Mejoramiento del INIFAP.

El diagnóstico

Las aplicaciones de la biotecnología en el campo del diagnóstico sanitario, se han orientado a la detección, etiología, estudios epidemiológicos y determinación de elementos responsables de patogenicidad, tanto en plantas como en animales. Asimismo, las herramientas de la biotecnología orientadas al diagnóstico genético han permitido esclarecer con mayor precisión casos de paternidad y ha ayudado a establecer la identidad para la protección.

En el caso de la agricultura, un diagnóstico adecuado provee la información básica necesaria que a su vez permite establecer las opciones para manejar pequeñas particularidades de cada organismo o condición y así elegir la mejor acción para enfrentar adecuadamente un problema

particular; de lo contrario la estrategia de control elegida podría ser infructuosa o eventualmente agravar el estado sanitario del cultivo.

El diagnóstico aporta en el caso de las enfermedades de plantas los elementos esenciales para la prevención y éste es un componente importante para el diseño de sistemas de manejo integrado. El manejo integrado por su parte, ha sido planteado de manera recurrente como la estrategia más sustentable para el manejo de los problemas de orden sanitario.

Tradicionalmente, en lo que concierne a la etiología, en una primera etapa se recurría al examen de los síntomas y signos. Los síntomas son manifestaciones de la enfermedad que brindan una orientación general sobre la causa del problema, pero normalmente no son definitivos para identificar todas las enfermedades, pues en algunos casos son comunes para varios grupos de fitopatógenos. Los signos son elementos generalmente morfológicos o fisiológicos típicos del agente causal que caracterizan al patógeno. En los casos donde es posible encontrarlos claramente, ayudan de manera importante y permiten un diagnóstico más rápido. Por ejemplo, la detección de hongos fitopatógenos se basaba originalmente en características morfológicas, dada la amplia gama de modificaciones existentes en sus estructuras como septos, forma, tamaño, color y organización de los conidios, esporangióforos, conidióforos, estructuras de reproducción sexual, formación de clamidosporas y otras, pero no todas las enfermedades producen signos. En algunos casos también se usaban algunas técnicas de tinción, rango de hospederos y medios selectivos.

En cuanto a bacterias fitopatógenas, la mayoría eran difíciles de identificar por rasgos visibles a través del microscopio, por lo que se hacía necesario recurrir a ciertas técnicas de tinción, espectro nutricional, inoculaciones, serología, medios selectivos y otras pruebas específicas. En el caso de virus, la sintomatología, el uso del rango de hospederos, la presencia de inclusiones citoplasmáticas, la forma de transmisión y variedades diferenciales eran algunas de las herramientas usadas tradicionalmente para su detección y eventual identificación. Diversos fitopatógenos son difíciles de identificar usando criterios morfológicos, los cuales pueden ser tardados y requerir amplios conocimientos en taxonomía.

Las técnicas de detección con herramientas de la biotecnología pueden en general, generar rápidamente resultados más seguros. El uso de la biotecnología en el campo del diagnóstico fitosanitario se inició desde los años sesenta usando métodos serológicos de laboratorio. Sin embargo, prácticamente con estos métodos, no se hacía nada en lo que concierne

a bacterias y hongos antes del desarrollo de una prueba llamada ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) y el uso de anticuerpos monoclonales.

Precisamente con la ELISA, fundamentada en la detección con anticuerpos, en particular monoclonales y ensayos de inmunoabsorbancia de enzimas conjugadas e inmunoflourescencia (IF) (2, 3), se dispara el potencial del diagnóstico. Estas herramientas fueron de gran importancia en virología, bacteriología y micología porque se podían identificar y detectar rápidamente más y diferentes patógenos (4,5). Posteriormente llegaron tecnologías basadas en el ácido desoxirribonucleico (DNA), y como ejemplo principal tenemos el caso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y su capacidad para amplificar un DNA blanco millones de veces en relativamente corto tiempo (6).

A continuación se presentan brevemente los fundamentos de las técnicas biotecnológicas más relevantes tanto inmunológicas como moleculares, que se emplean en la detección de patógenos en plantas.

Métodos inmunológicos

Existen varios métodos basados en los principios inmunológicos, algunos de ellos con aplicaciones muy específicas.

ELISA (enzyme linked inmmunoabsorbent assay). Este es un análisis ampliamente aceptado como método de inmunodetección para su uso con patógenos de plantas ya que es versátil, confiable, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue alta sensibilidad al cuantificar biomasa del patógeno en tejidos de plantas (2, 7). La técnica más usual es la del "sándwich de doble anticuerpo" (DAS-ELISA), la cual está basada en el uso de un anticuerpo monoclonal que se fija en un soporte sólido; por ejemplo, placas de microtitulación, tubos de ensayo, o membranas de nitrocelulosa. El soporte está recubierto con el anticuerpo específico para el antígeno de interés (4). El soporte recubierto se usa para agregarle el extracto de la muestra de interés (ejemplo: a los pocillos de una microplaca). Si el patógeno (antígeno) se encuentra presente en la muestra, es entonces "capturado" por el anticuerpo que cubre el soporte. Cualquier resto de tejido que no se adhiera al anticuerpo es removido mediante lavados. Un segundo anticuerpo, dirigido contra el

antígeno, es conjugado a una enzima que suele ser peroxidasa o fosfatasa alcalina. Este anticuerpo capturará cualquier partícula de antígeno que quede enlazada al anticuerpo que cubre el soporte. Una vez más, el material no enlazado será removido de la placa por sucesivos ciclos de lavados. La presencia del anticuerpo conjugado es revelada mediante la adición del sustrato de la enzima. La intensidad del cambio de color será proporcional a la cantidad de antígeno capturado por los anticuerpos. El color producido dependerá del reactivo específico que se utilice. En general, si se produce color se considera una reacción positiva que indica la presencia del patógeno, y si no hay cambio de color, la muestra es considerada negativa (2).

Inmunoflorescencia. En la inmunofluorescencia directa (IFA), anticuerpos específicos contra el patógeno son conjugados con moléculas fluorescentes, comúnmente isotiocianato de fluoresceína (FITC) o isotiocianato de rodamina (RITC). La presencia o ausencia del antígeno en la muestra se detecta mediante microscopía de fluorescencia (8). Una variante de esta metodología es la inmunofluorescencia indirecta, en la que la reacción antígeno-anticuerpo se revela con un segundo anticuerpo marcado con una molécula fluorescente. Una propiedad importante de este sistema es la posibilidad de obtener resultados cuantitativos cuando el número de unidades fluorescentes pueden ser contadas (por ejemplo células bacterianas o esporas de hongos); lo anterior tiende a ser muy tedioso y lento lo cual restringe el número de muestras que suelen evaluarse. Para superar esta limitación se han desarrollado sistemas automáticos y programas de computadoras acoplados al microscopio y ahora es posible realizar este tipo de análisis a gran escala (5).

Actualmente existen paquetes de detección comerciales para una gran diversidad de virus, bacterias, hongos y otros patógenos (tablas 1 y 2) (5).

Este tipo de ensayos ha sido particularmente útil en la detección y localización de hongos en material vegetal y suelo (9, 10, 11) y en el diagnóstico de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas (12).

Patógeno	*Cultivo que afecta*
Virus mosaico de la yuca africana (ACMV)	Yuca
Virus mosaico de la alfalfa (AlMV)	Alfalfa
Virus de la mancha clorótica de la manzana (ACLSV)	Manzana
Virus mosaico de la manzana (AMV)	Manzana
Virus 2 del espárrago (AV2)	Espárrago
Virus mosaico de la bractea del plátano (BaBMV)	Plátano
Virus del amacollamiento de la punta del plátano (BaBTV)	Plátano
Virus estriado del plátano (BSV)	Plátano
Virus enanismo Amarillo de la cebada (BYDV)	Cebada
Virus mosaico común del frijol (BCMV)	Frijol
Virus moteado de la vaina del frijol (BPMoV)	Frijol
Virus mosaico Amarillo del frijol (BYMV)	Frijol
Virus de la vena amarilla necrótica de la remolacha (BNYVV)	Frijol
Virus de la Hoja moteada de la cereza (BLMoV)	Cerezas y otras frutillas
Virus del chamuscado del cereza (BSV)	Cerezas y otras frutillas
Virus del shock de la cereza (BShV)	Cerezas y otras frutillas
Virus agujeta de zapato de la cereza (BStV)	Cerezas y otras frutillas
Virus de la marchitez amplia del frijol (BBWV)	Frijol
Virus mosaico de la coliflor (CaMV)	Coles
Virus del enrollamiento de la hoja de la cereza (CLRV)	Cerezas
Virus del crisantemo (ChV)	Crisantemos
Virus de la tristeza de los cítricos (CTV)	Cítricos
Virus mosaico del chícharo de vaca (CwMV)	Chícharo de vaca
Virus moteado verde del pepino (CGMV)s	Pepinos y otras cucurbitáceas
Virus mosaico del pepino (CMV)	Pepinos y otras cucurbitáceas
Virus latente común del ajo GCLV	Ajo
Geminiviruses - 3F7:	Varias dicotiledóneas (Chile, jitomate, etc.,)
Virus del enrollamiento de la hoja de la vid (GLRV)	Vid
Virus A de la Vid (GAV)	Vid
Virus de la mancha clorótica del tomate (TCSV)	Jitomate
Virus mosaico de la lechuga (LMV)	Lechuga
Virus moteado clorotico del maíz (MCMV)	Maíz

Patógeno	*Cultivo que afecta*
Virus del mosaico del pepino (PeMV)	Melón
Virus mosaico del moteado tenue del chile (PeMMV)	Chile
Virus moteado del chile(PeMV)	Chile y cebolla
Virus de la viruela de la ciruela (PPV)	Ciruela
Virus mosaico de la nochebuena (PVM)	Noche buena
Virus mosaico aucuba de la papa) (PoAMV)	Papa
Virus latente de la papa (PLV)	Papa
Virus del enrrollamiento de la hoja de la papa (PLRV)	Papa
Virus M de la Papa (PVM)	Papa
Virus S de la papa (PVS)	Papa
Virus T de la papa (PVT)	Papa
Virus V de la papa (PVV)	Papa
Virus X de la papa (PVX)	Papa
Virus Y de la papa (PVY)	Papa
Virus enanismo de la ciruela (PDV)	Ciruela
Virus de mancha anillada necrótica de la ciruela (PNRV)	Ciruela
Virus del mosaico del suelo del trigo (S-BWMV)	Trigo
Virus del mosaico sureño del frijol (SBMV)	Frijol
Virus mosaico de la soya (SMV)	Soya
Virus mosaico de la calabaza (SqMV)	Calabaza
Virus de la mancha anillada latente de la fresa (SLRV)	Fresa
Virus del amarillamiento suave asociado a la edad de la fresa (SMYE-aV)	Fresa
Virus baciliforme de la caña (SBaV)	Caña de azúcar
Virus mosaico de la caña (SMV)	Caña de azúcar
Virus jaspeado del tabaco (TEV)	Tabaco y otras solanáceas
Virus mosaico del tabaco (TMV)	Tabaco y otras solanáceas
Tobacco Rattle Virus	Tabaco y otras solanáceas
Virus de la mancha anillada del tabaco (TRsV)	Tabaco y otras
Virus estriado del Tabaco (TSV)	Tabaco
Virus moteado de la vena del tabaco (TVMV)	Tabaco y otras solanáceas
Virus de la mancha anillada del tomate (ToRsV)	Jitomate
Virus de la marchitéz manchada del tomate (TSWV)	Jitomate

Virus del enanismo mosaico del maiz (MDMV)	Maíz
Virus mosaico del maíz (MMV)	Maíz
Virus estriado del maíz (MSV)	Maíz
Virus rayado del maíz (MStV)	Maíz
Virus mosaico raya blanca del maíz (MWLMV)	Maíz
Virus de la mancha necrótica del melón (MNSV)	Melón
Virus enanismo Amarillo de la cebolla (OYDV)	Cebolla
Virus mosaico de la papaya (PMV)	Papaya
Virus mancha anillada de la papaya (PRsV))	Papaya
Virus mosaico del suelo de chícharo PS-(BMV)	Chícharo

Virus Aspermy del tomate (ToAV)	Jitomate
Virus del anillamiento negro del tomate (ToBRV)	Jitomate
Virus del apachurramiento peludo del tomate (ToBSV)	Jitomate
Virus mosaico del tomate(ToMV	Jitomate
Virus mosaico del nabo (TuMV)	Nabo
Virus 2 mosaico de la sandía (WMV2)	Sandía
Virus moteado plateado de la sandía (WSMV)	Sandía
Virus enanismo del trigo (WDV)	Trigo
Virus mosaico del huso estriado del trigo (WSSMV)	Trigo
Virus mosaico estriado del trigo	Trigo
Virus mosaico amarillo de la calabacita (ZYMV)	Calabacitas y calabazas

Con el advenimiento de la biología molecular y la posibilidad de comparar secuencias representativas y conservadas de regiones de DNA genómico, se ha incrementado significativamente el número de patógenos y en particular los parásitos que pueden ser analizados sobre todo a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

A continuación se enunciarán las características de las principales técnicas moleculares.

Hibridación de ácidos nucleicos. Éste es un análisis basado en el uso de sondas específicas de DNA del patógeno. Las sondas contienen DNA complementario específico para las regiones conservadas del genoma del patógeno. La sonda se marca con radiactividad o con un reactivo fluorescente, por ejemplo digoxigenina, la cual es incorporada en la sonda para actuar como una etiqueta que permite la identificación.

El DNA en la muestra que va a ser analizada es expuesto y enlazado a una membrana de soporte. Una sonda de DNA marcada es posteriormente agregada a la membrana. Si el DNA blanco (DNA del patógeno de interés) está enlazado a la membrana, la sonda del DNA lo encontrará y se hibridará con ella. La etiqueta incorporada en la sonda permite la detección de las moléculas de DNA hibridadas durante los pasos subsiguientes, ya sea por exposición a una película fotosensible o por la adición de un cromógeno que causará un cambio de color observado en las muestras que contengan el complejo DNA blanco-sonda.

La hibridación *in situ* y la de punto son variantes interesantes del análisis por hibridación molecular. La hibridación *in situ* se realiza normalmente en placas de plástico o de vidrio en las que se localizan los DNAs de las muestras. Las placas son expuestas a la sonda marcada y si el DNA o RNA blanco está presente en la sección de tejido, la sonda lo localizará, se enlazará a ella y posteriormente se detectará por fluorescencia o coloración según la marca. La hibridación de punto se realiza depositando el ácido nucleico sobre una membrana y posteriormente el DNA o RNA blanco es detectado por medio de la sonda marcada.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR es un desarrollo metodológico que potenció de manera espectacular el diagnóstico fitosanita-

rio. Tal y como se ha descrito en los primeros capítulos de este libro, con la PCR las secuencias de DNA específico se pueden amplificar (multiplicar) de manera exponencial, a través de ciclos repetidos de condiciones adecuadas para la síntesis de dicha biomolécula (7). Así, la PCR se realiza ejecutando una serie de ciclos con cambios de temperatura. Elevar la temperatura permite la separación de las cadenas de DNA, el ciclo de temperatura frío permite que se unan las sondas y la enzima polimerasa reproduce una copia exacta del material blanco. La especificidad se le confiere a la reacción mediante el uso de sondas, en este caso oligonucleótidos de 13-27 nucleótidos que en las condiciones de reacción específicas disparan la síntesis. Los productos de la reacción son posteriormente analizados e identificados mediante la electroforesis de gel, en hibridación de gota o bien usados dentro de una estrategia de análisis de marcadores moleculares.

La posibilidad del diagnóstico se ha potenciado aún más con la posibilidad de cuantificar los productos de la PCR a través del sistema de "tiempo real". La PCR en "tiempo real"está revolucionando la manera de llevar a cabo los diagnósticos de las enfermedades en plantas en la medida que incrementa el conocimiento sobre la transcripción de genes específicos en el genoma de los patógenos y aumenta la disponibilidad de más secuencias de genes específicos de estos organismos. Como la mayoría de los virus tienen genomas de RNA, para aplicar la PCR en cualquier modalidad primero se le tiene que hacer una copia en DNA, proceso que se conoce como RT-PCR. En el caso de los virus con genoma de DNA, bacterias, hongos, nemátodos y fitoplasmas, la PCR se aplica directamente.

La determinación de la secuencia nucleotídica de genes conservados ha permitido desarrollar protocolos de detección precisos y específicos basados en la hibridación molecular o en la PCR con diversos niveles de especificidad en virus, hongos, y bacterias disponibles incluso a nivel comercial; algunos ejemplos se mencionan en la tabla 2.

Tabla 2
EJEMPLOS DE FITOPATÓGENOS QUE SE PUEDEN DETECTAR
POR HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS O POR PCR

Bacteria	*Hongos*	*Virus*
Erwinia Carotovora	*Leptosphaeria ckorrae*	*Pimienta huasteca*
Xanthomonas campestris	*Ophiosphaerella herpotrica*	*Mosaico de tomate*
Clavibacter michiganense	*Phythophthora parasitica*	*Mosaico de frijol*
Pseudomonas syringae	*Phythophthora capsici*	*Tomate manchado*
Pseudomonas solanacearum	*Gaeumannomyces graminis*	*Papa*
		Cebolla amarilla
		Vid

Hasta aquí se ha referido la detección de patógenos como diagnóstico *per se*. Las circunstancias determinan en la generalidad de los casos que el diagnóstico se oriente en algunos de ellos al aporte de información parcial. Sin embargo, la detección del patógeno también se usa para conocer algunos otros aspectos del diagnóstico visto en un sentido más amplio, ya sea en el campo de la etiología, epidemiología o mecanismos de patogenicidad.

Por ello se señalarán a continuación algunos logros que se han tenido y otros que se pudieran alcanzar a partir del monitoreo del patógeno en diferentes condiciones.

Determinaciones etiológicas. Algunas enfermedades tienen un periodo de latencia muy largo entre la infección y la manifestación de los síntomas y esto, obviamente, limita la definición del momento adecuado para la aplicación y definición del tipo de agroquímico por aplicarse puesto que se desconoce el agente causal. Esta situación puede ser superada mediante ensayos cinéticos en diferentes órganos de la planta que permitan medir el progreso de la enfermedad a través de la detección del DNA usando la PCR en tiempo real. Estas alternativas del uso de las herramientas biotecnológicas han permitido manejar más adecuadamente las enfermedades causadas por ejemplo por *Pyrenopeziza brassicae* y *Septoria tritici* (13). Existen situaciones particularmente complejas en ciertas enfermedades en que se han podido manejar de manera eficaz mediante el uso de herramientas biotecnológicas que han permitido la detección simultánea de varios patógenos involucrados en un mismo síndrome; por ejemplo virus (14), hongos (15) o bacterias (16). En eventos de esta naturaleza es posible diseñar acciones específicas o complementarias de manejo en que se tome ventaja de este conocimiento. Adicionalmente, se ha observado en estudios con virus y hongos fitopatógenos que la combinación de ELISA y PCR acelera y mejora la sensibilidad de la detección cuando hay elementos en la planta que inhiben esta última (17, 18, 19, 20, 21). Asimismo, la combinación de análisis mediante PCR y RFLP´s (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción), ha resultado ser un procedimiento efectivo para diferenciar ciertos virus que mediante técnicas serológicas resultan indistinguibles (22).

Determinaciones epidemiológicas. Muchas epidemias se inician y se dispersan mediante esporas que son transportadas por el viento. Por lo

tanto el monitoreo, colecta en trampas y su análisis posterior por PCR, puede permitir detectar rápidamente las esporas de un patógeno específico, incluso si sólo captura un número muy bajo de éstas (23). Esta práctica permite diseñar oportunamente una estrategia para contender con la enfermedad de manera preventiva. Lo anterior no sólo permite prevenir a nivel de predio sino a nivel de cuenca o región.

Por otro lado este tipo de estrategia de monitoreo también puede servir para evaluar las posibilidades de sobrevivencia de las esporas en diferentes condiciones y territorios a las que el viento las mueva. De esta manera, se estarían aportando elementos de carácter epidemiológico.

Contribución al conocimiento de los mecanismos de patogenicidad. La posibilidad de detección *in situ* de patógenos tales como virus, independientemente de que sea una herramienta con la que se puede avanzar sobre la etiología, también permite usarla para determinar algunos elementos de los mecanismos de acción de los diversos agentes patogénicos (24). Con una visión más amplia del análisis del potencial de esta posibilidad se puede obtener información relacionada con los sitios de localización del patógeno como virus en la planta, de la velocidad de su movilidad y transferencia, etc. Por ello se puede visualizar como una herramienta que puede contribuir al conocimiento de los mecanismos de patogenicidad. Un aspecto interesante que puede ser abordado a través de las metodologías moleculares es el de la interacción de patógenos en un mismo hospedero. Esta situación puede derivar en la posibilidad de comprender mejor los mecanismos de patogenicidad y también para desarrollar nuevas estrategias para el manejo de las enfermedades que involucran mezclas de patógenos (24, 25).

Otras aplicaciones. Muchos de los pesticidas que se utilizan actualmente tienen un solo sitio de acción, por lo tanto una simple mutación en el gene blanco puede derivar en resistencia al pesticida. Por medio de la PCR se pueden detectar los cambios en la secuencia genómica de patógenos resistentes a pesticidas. Estudios al respecto se han realizado por hibridación molecular para detectar la resistencia en hongos a fungicidas cuyo principio activo es el benomyl (26). Los datos así obtenidos pueden mejorar el entendimiento del desarrollo de las resistencias y en algunos casos superar la condición particular inherente al uso de pesticidas, modificándolo genéticamente.

Por otro lado la secuenciación y comparación de regiones genómicas codificantes (o no) de varios patógenos tales como virus, bacterias, hongos y nemátodos han permitido hacer no sólo el diagnóstico sino inclusive precisar propuestas taxonómicas (27, 28).

Las enfermedades de etiología viral pueden ocasionar pérdidas de hasta el 100%; no obstante la media de daños se estima en 30% (29). Las primeras acciones de diagnóstico en México, se orientaron exclusivamente a la detección de los diferentes virus patógenos al inicio de los sesenta. En un principio, dicha detección se realizaba usando plantas diferenciales, propiedades de infectividad, punto de inactivación térmica, longevidad *in vitro*, estudios histopatológicos, transmisión y purificación (30). A partir de fines de la década de los setenta, se empieza a realizar esta actividad usando métodos inmunológicos. De esta manera, a mediados de los ochenta, en un esfuerzo interdisciplinario se establece de manera inequívoca la presencia por lo menos en el Bajío, noroeste y noreste del país del virus mosaico del pepino (CMV), el virus mosaico del tabaco (TMV) y el virus jaspeado del tabaco (TEV), algunas veces involucrados en problemas significativos. Otros ejemplos importantes de virus patógenos de cultivos en México, se presentan a continuación.

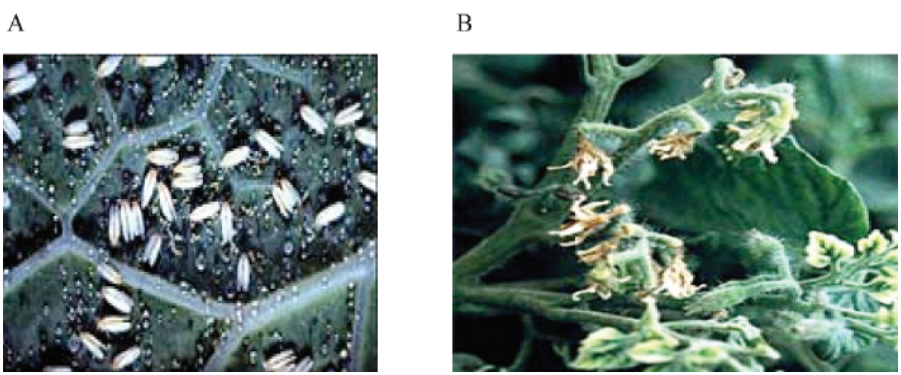


Figura 2
ENFERMEDAD PRODUCIDA EN EL CULTIVO DE CHILE
En el panel A se muestran a varios adultos de la mosquita blanca y en el panel B, una planta de jitomate con síntomas.

Rizado amarillo del chile. A fines de la década de los ochenta se detectan nuevos virus en los cultivo de chile en México; los geminivirus (31), a los cuales se les asoció con la enfermedad denominada como "atigrado del

chile". Esta detección se realizó en el noroeste del país, en la región productora de hortalizas en Sinaloa. Por lo menos, a alguno de esos geminivirus se le relacionó de manera preferencial con el tipo de chile serrano, (*serrano golden mosaic virus* (SGMV). Por otro lado, en el sur del estado de Tamaulipas apareció una enfermedad en el cultivo de chile transmitida por la mosquita blanca (figura 2), que parecía de etiología viral a la cual se le llamó "rizado amarillo". No obstante ninguno de los virus conocidos que tenían por hospedero a la planta del chile reproducía la enfermedad (29). Es hasta 1993, al reportar que mediante la clonación y la determinación de la secuencia nucleotídica (parcial) de DNA´s asociados a la enfermedad, que se encontró un geminivirus que no había sido reportado previamente al cual se le denominó virus huasteco del chile (PHV) (32).

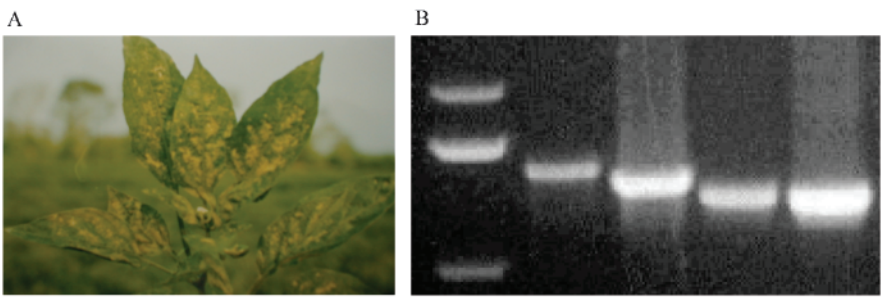


Figura 3
PLANTAS DE CHILE ENFERMAS POR GEMINIVIRUS Y SU DETECCIÓN POR PCR
En el panel A la planta mostrando los síntomas y en el panel B se muestra la fotografía de un gel que muestra los DNA´s virales amplificados.

Posteriormente, mediante la secuenciación, comparación de secuencias y uso de PCR (figura 3), se establece la identidad de otro geminivirus que conjuntamente con el PHV es capaz de reproducir los síntomas del "rizado amarillo": el virus texano del chile (TPV) llamado en algunos artículos ahora PepGMV (33), cuya presencia en chile había sido ya reportada en Texas (34). La secuenciación completa del PHV y del PepGMV (35, 36) permitió diseñar sondas especificas, lo cual a su vez permitió que se realizaran estudios sobre la distribución de estos virus en México y en parte de los Estados Unidos, no sólo en chile, sino también en jitomate y en la maleza (14, 37). Además, gracias a este esfuerzo fue posible relacionar-

los filogenéticamente con los geminivirus conocidos. Este ejercicio permitió entre otras cosas, establecer que PHV y PepGMV tienen una proteína (BR1) que comparten con una gran similitud entre ellos más que con ningún otro virus (36). Lo anterior permitió conjuntamente con estudios de carácter biológico, determinar que el PHV es capaz de complementar la función del PepGMV, pero no lo contrario (33, 36). La razón de lo anterior es que en el caso del PHV se demostró que la proteína de la cápside juega un papel importante en el movimiento de este virus (38).

La información molecular referida ha permitido también que mediante el uso de biobalística, aislamiento e inoculación de protoplastos y detección de los patógenos en la planta se hayan obtenido plantas resistentes a ambos geminivirus solos o en infección mixta (39, 40), y además se haya avanzado en el entendimiento de algunos elementos que parecen involucrados en los mecanismos que determinan tales respuestas (39).

Virus de RNA en chile y jitomate. Entre los virus de este tipo, cuyo estudio ha sido abordado con herramientas biotecnológicas, destacan el virus mosaico del tabaco (TMV), el virus mosaico de pepino (CMV) y el virus jaspeado del tabaco (TEV). Los virus TMV, TEV y CMV tienen una distribución más amplia que los geminivirus, si bien no necesariamente están involucrados en un síndrome. De todos modos es relevante señalar que se les ha encontrado en infecciones mixtas en prácticamente todas las combinaciones posibles con los geminivirus PHV y PepGMV (37).

Otro dato relevante obtenido con el estudio de estos virus, es que al menos en el caso la variante más conspicua en México de TEV, produce síntomas más severos cuando la infección se da en condiciones de temperaturas menores de 17ºC y humedad relativa mayor de 80 %.

Alternativas y ventajas del diagnóstico molecular para el manejo de variedades de plantas

Existen dos grandes preocupaciones en las instituciones dedicadas al fitomejoramiento una vez generada la variedad mejorada. La primera es la identificación varietal, es decir el monitoreo de la pureza genética de esta variedad, durante los diferentes procesos que tiene que seguir hasta llegar finalmente a las manos del agricultor, con el fin de garantizar que la variedad ofrecida sea el genotipo correcto y el origen especificado. La

segunda es cómo garantizar a la institución que la genera la protección de la propiedad intelectual de la variedad, para prevenir el robo de la misma; esto es un prerrequisito para cualquier institución ya que sin medidas efectivas para prevenir el robo, la investigación en este campo se desalienta. Se tiene conciencia de la necesidad de mantener como secreto comercial a los progenitores de variedades o híbridos mejorados desde los años veinte, pero es hasta 1961 cuando se crea la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV) bajo la dirección de la Organización Mundial de Propiedad Intelectual (OMPI) con el fin de contrarrestar el incremento del hurto de germoplasma o de materiales mejorados ya sea mediante el robo o a través de la creación de variedades sólo cosméticamente diferentes a la original. (41, 42).

Con las herramientas biotecnológicas que analizan directamente el DNA, se puede realizar un muestreo eficiente del genoma para un análisis a fondo de variedades importantes. La información tiene varios usos relevantes, entre los que destacan: a) conocer el grado de relación genética de los materiales y en algunas especies, permitir la selección de progenitores para maximizar efectos de heterosis; b) evaluar la pureza genética y descripción varietal con precisión y poder de discriminación. Dichas metodologías también son útiles para la identificación de líneas o materiales que deben preservarse para maximizar la diversidad genética de un banco de germoplasma (43).

Para este tipo de diagnóstico se tienen metodologías que usan diversos marcadores moleculares de DNA tales como RFLPs, AFLPs, RAPDs y SSRs que han sido usadas en los últimos años para estudiar la diversidad genética en distintas especies (44, 45, 46, 47, 48) que se describen a continuación y las cuales se han utilizado para enfrentar diferentes problemáticas en los cultivares mexicanos.

RFLP´S (polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción)

Con esta metodología se pueden comparar decenas o cientos de *loci* polimórficos en varias plantas cultivadas; puede ser altamente discriminativa y generar un muestreo del genoma suficientemente amplio. Usualmente se requiere un promedio de tres meses para elaborar un perfil de 50-100 variedades con 60-100 sondas individuales (49, 50, 51).

En México se ha utilizado para el mapeo en maíz de regiones genómicas que controlan la floración masculina y femenina, androestrilidad, intervalo de floración, rendimiento de grano, número de mazorcas y de granos bajo condiciones de sequía (52, 53, 54). También se ha aplicado en maíz tropical para mapear los genes relacionados con la resistencia al gusano barrenador de la caña de azúcar y *Diatraea spp.*, así como para realizar un análisis genético de las regiones del genoma que controlan la adaptación a valles altos y costa (55, 56). Esta información ha permitido establecer al INIFAP un programa de mejoramiento asistido por marcadores moleculares, del cual se han generado variedades de maíz tolerantes a sequía que están por liberarse y con posibilidades de sembrarse en poco más de un millón de hectáreas (54) (figura 1).

AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados)

Se basa en la detección de una amplificación selectiva por PCR de fragmentos generados por enzimas de restricción a partir del DNA genómico. El DNA es cortado normalmente con dos endonucleasas de restricción, una de corte raro y otra de corte frecuente; los productos de estas digestiones se ligan a secuencias conocidas de DNA de doble cadena llamadas adaptadores, las cuales sirven como DNA blanco para las posteriores amplificaciones. Sin embargo para la mayoría de DNA's la cantidad de fragmentos que podrían ser amplificados simultáneamente de esta manera sería demasiado alta para resolverse en cualquier sistema de análisis de fragmentos, por lo que los iniciadores AFLP tienen en su extremo 3' un número de nucleótidos selectivos (que depende de la complejidad del genoma que se está analizando) que se extienden hacia dentro del fragmento de restricción. Uno de estos iniciadores es marcado radiactiva o no radiactivamente; de ésta forma solamente un subgrupo de fragmentos de restricción serán amplificados y visualizados (entre 50 y 150). Estos fragmentos son separados mediante electroforesis de geles desnaturalizantes de acrilamida, generándose así los patrones de bandas conocidas como "huellas genéticas AFLP", donde se observan numerosas bandas, cada una de las cuales son potencialmente polimórficas debido a cambios en los sitios de restricción y/o por inserciones o deleciones que modifican los tamaños de los fragmentos. El ensayo de AFLP virtualmente es capaz de crear un número ilimitado de fragmentos a partir de nanogramos de DNA. Por su confiabilidad, reproducibilidad y potencia se con-

sidera altamente versátil y de gran utilidad para producción de "huellas genéticas" (*fingerprinting*) de DNA (57) (figura 4).

En México su uso es cada vez más frecuente y se han utilizado para el análisis de la diversidad genética de plantas como el agave *Agave tequilana* var. azul, en el que se encontró que no existe variabilidad genética en este cultivo, de lo cual se puede inferir el peligro que esto representa para la industria tequilera (58). También se ha usado para el análisis de la diversidad genética de fitopatógenos del frijol como son *Colletotrichum lindemuthianum* y *Macrophomina phaseolicola*. Lo anterior ha permitido al Programa de Mejoramiento de Frijol del INIFAP estar en posibilidad de generar variedades resistentes a las razas de estos patógenos específicas de cada región de México (58, 59, 60). Esta metodología se ha utilizado también para monitorear la variación genotípica de *Colletotrichum lindemuthianum*. Lo anterior representa un gran avance en el conocimiento de los mecanismos utilizados por hongos que carecen de ciclo sexual para generar variabilidad genética (61) y para la realización de "huellas genéticas" de diferentes especies de variedades mexicanas.

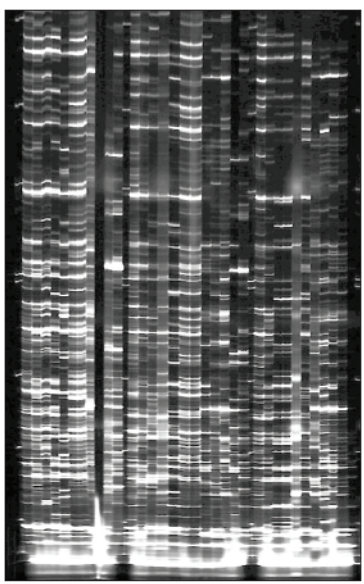


Figura 4

ENSAYO DE AFLP

Gel para análisis tipo AFLP de la diversidad genética de materiales de maíz tolerantes a sequía pertenecientes a los programas de biotecnología y mejoramiento de maíz del INIFAP.

RAPD (DNA polimórfico amplificado al azar)

Esta metodología consiste en la amplificación de DNA utilizando oligonucleótidos al azar. Normalmente un solo oligonucleótido es utilizado como iniciador y las regiones flanqueadas por secuencias repetidas invertidas con homología al oligonucleótido, serán amplificadas de acuerdo con las condiciones normales para amplificación de PCR (62). En estos marcadores idealmente, cada uno de los fragmentos amplificados por el uso de iniciadores al azar representaría un *locus* específico en el genoma y los polimorfismos detectados pueden básicamente ser el resultado de varios tipos de eventos tales como: a) inserción de grandes fragmentos de DNA entre los dos sitios de alineación lo que origina un fragmento muy largo provocando que se pierda; b) la deleción de un fragmento de DNA que lleve uno de los dos sitios de alineación lo que provoca también su pérdida; c) la sustitución de un nucleótido que puede afectar el alineamiento de uno de los dos iniciadores por cambios en la homología lo que provoca la ausencia o presencia del polimorfismo o el cambio en el tamaño del fragmento; y d) inserción o deleción de pequeños fragmentos de DNA lo que origina cambios en el tamaño del fragmento. En la práctica, sin embargo, cambios en el tamaño son raros. Un fragmento particular generado por esta metodología está usualmente presente (alelo 'A') o ausente (alelo 'a') la cual es una distribución típica para marcadores dominantes. Un fragmento se presenta únicamente cuando es homocigoto (AA) o heterocigoto (Aa), y sólo su ausencia da a entender la presencia de genotipo (aa) (63).

SSR (Detección de secuencias repetidas o análisis de microsatélites)

Las secuencias repetidas de DNA son aquellas que tienen una unidad núcleo de dos o cinco nucleótidos tales como (AT), (CTT) y (ATGT), las cuales están repetidas en tandem y dispersas por todo el genoma. Estas pequeñas secuencias son la base de la PCR en este método ya que se utilizan iniciadores complementarios a las regiones que las flanquean, las cuales son generalmente conservadas entre genotipos de la misma especie, amplificando de esta manera los fragmentos que contienen las SSR. El polimorfismo es creado cuando los productos de PCR de diferentes individuos varían en longitud como resultado de la variación en el número de unidades repetidas en las SSR. Varios investigadores han iniciado su

desarrollo y uso en un amplio rango de especies de plantas, como por ejemplo: maíz (*Zea mays* L) (64), trigo (*Triticum aestivum* L.) (65), soya (*Glycine max* L) (66), cebada (*Hordeum vulgare* L) (67), arroz (*Oryza sativa* L) (68), aguacate (*Persea americana*), (69) y otras muchas.

Genómica y diagnóstico molecular en la agricultura

Para tratar de entender de forma general las estrategias genéticas que existen para que una planta se defienda de algún patógeno, y poder eventualmente emplear esta información con fines de diagnóstico o mejoramiento genético, es necesario identificar y caracterizar los genes de la planta que respondan específicamente a la infección por algún patógeno determinado. La utilización de "candidatos a genes de resistencia" (CGR) genes de resistencia (GR) y genes de respuesta de defensa (GRD) para la identificación de marcadores útiles para programas de mejoramiento asistido por marcadores moleculares y diagnostico, es una opción viable en la actualidad. Dentro de las posibilidades de aplicación del diagnóstico molecular que en los últimos años se ha estado evaluando, es la asociación entre candidatos a genes de resistencia y *loci* de caracteres cuantitativos (QTL´s), con la finalidad de ir mapeando a los genes de resistencia correlacionándolos con *loci* que previamente se hayan identificado como asociados con la resistencia a algún patógeno (70, 71, 72, 73). Esta estrategia debe considerarse y apoyar los programas de selección asistida por marcadores moleculares, así como también en dilucidar las bases moleculares de la resistencia poligénica en plantas a algún patógeno. Para realizar este tipo de estudios, es necesario conocer los genes que en una planta son expresados en respuesta a un patógeno (GRD), genes en los que ya se haya comprobado su papel en la resistencia a algún patógeno (GR), y genes que posiblemente se relacionen con la resistencia a estos patógenos (CGR). Es precisamente la búsqueda de nuevos posibles genes involucrados en la resistencia a patógenos en plantas, en donde se tiene un gran potencial para entender a nivel molecular los mecanismos de resistencia con los que una planta se defiende contra patógenos. Estos estudios deberán impactar el desarrollo de métodos de diagnóstico más precisos, métodos de mejoramiento asistido por marcadores moleculares, así como también en la posibilidad de diseñar en un momento dado, nuevas estrategias de resistencia contra patógenos específicos.

Para encontrar candidatos a genes de resistencia contra patógenos en plantas, la elaboración de colecciones de genes expresados etiquetados (ESTs) ha resultado una estrategia de gran importancia. Sin embargo, las colecciones de ESTs existentes no están completas y la mayoría han sido derivadas de bibliotecas de DNA complementario realizadas a partir de plantas crecidas bajo condiciones normales; por lo tanto, transcritos que sean inducidos de manera diferencial por el ataque de algún patógeno a la planta muy probablemente estén poco representados (74). Por lo anterior, es necesario generar colecciones de ESTs específicas para diferentes tipos de interacción patógeno/planta. Existen varias estrategias para identificar transcritos expresados diferencialmente, dentro de las que se incluyen el despliegue diferencial (75), análisis de diferencia representacional (76), análisis seriado de expresión genética (77), sustracción por degradación enzimática (78) e hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión por PCR (79). El procedimiento de hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión por PCR, ha sido una metodología que varios grupos en el mundo han utilizado para identificar genes de plantas que se expresan bajo una condición de interés especifico (80). Este método tiene las ventajas de que normaliza la cantidad de transcritos, enriquece los transcritos diferencialmente expresados y estos fragmentos pueden ser directamente empleados en la construcción de microarreglos de DNA para su posterior análisis (figura 5). En México, existen varios grupos de investigación que han comenzado a abordar estudios genómicos en plantas en respuesta a patógenos bacterianos, fúngicos y virales, entre otros. Un ejemplo de este tipo de trabajo que se ha estado desarrollando ha sido el estudio de la expresión genética diferencial en plantas de chile (*Capsicum chinense* Jacq.) que previamente se identificaron como resistentes a infecciones simples y mixtas por geminivirus (39, 40). En este trabajo se han empleado las técnicas de despliegue diferencial y de hibridación sustractiva bajo condiciones de supresión por PCR, encontrándose hasta el momento poco más de 100 fragmentos de genes expresados en las plantas de chile mencionadas cuando son infectadas por los geminivirus huasteco del chile (PHV) y mosaico dorado del chile (PepGMV), que son los patógenos virales más importantes en nuestro país que atacan este cultivo. Algunos de estos genes han resultado ser interesantes por el hecho de que presentan cierta similitud con genes que en *Arabidopsis thaliana* se relacionan con resistencia a infecciones por el virus del mosaico del pepino mediante silenciamiento génico. Actualmente, se encuentra en proceso de completar la secuen-

ciación de los genes que se tienen hasta el momento y la elaboración de varias bibliotecas sustractivas de DNA complementario a partir de las plantas de chile resistentes a geminivirus mencionadas, siendo infectadas de forma simple y mixtas con los geminivirus PHV y PepGMV, con lo que el número de fragmentos de genes deberá de aumentar a alrededor de mil. Con la información que se obtenga se espera generar datos valiosos sobre genes de las plantas de chile resistentes a geminivirus, que son expresados en forma específica en presencia de estos patógenos, siendo algunos de estos genes buenos candidatos a ser genes de resistencia a geminivirus, con lo que en un futuro se puede emplear este tipo de información para los fines mencionados sobre correlaciones con QTLs, diagnóstico, e inclusive diseño de nuevas estrategias de resistencia en chile contra estos patógenos.

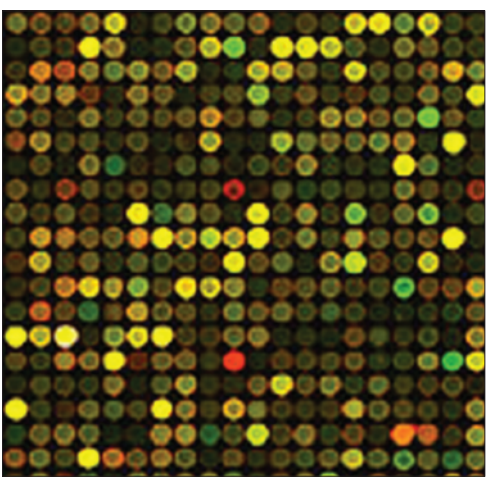


Figura 5

UN EJEMPLO DE MICROARREGLOS DE DNA

Finalmente, con combinaciones de algunas de las metodologías mencionadas, actualmente se está estableciendo la determinación de la huella genética del germoplasma que tiene bajo su resguardo el INIFAP, por lo pronto en maíz, frijol, papa, y chile. Por otro lado, es importante señalar también que se ha suministrado el servicio de diagnóstico de la pureza varietal en diferentes eventos tanto en el CINVESTAV-Unidad Irapuato, como en la Unidad de Biotecnología del INIFAP en Celaya. Asimismo, en

instituciones como INIFAP, el Instituto Tecnológico de Celaya y el CINVESTAV-Unidad Irapuato, se ha comenzado con estudios encaminados a la exploración de la expresión genética global de plantas de interés para México (chile, frijol, maíz, plátano, etc.) en repuesta al ataque por varios patógenos a fin de que en un futuro a mediano plazo, se tenga información que pueda ayudar a generar tecnologías nacionales para el diagnóstico molecular, diseño de nuevas metodologías de resistencia y selección asistida por marcadores moleculares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mc Calla A.F., Brown R.L. "Feeding the development world in the next millennium a question of science". *Promethean Science*, CGIAR (1999).
2. Clark, M.F., Adams, A.N. "Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of plant viruses". *J. Gen. Virol.* 34: 475-483 (1977).
3. Kohler, G., Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497 (1975).
4. Hampton, R.O., Ball, E.M., De Boer, S.H. *(Editores)*. Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant patogens: a laboratory manual. American Phytopathological Society, St. Paul, Minn. USA, (1990).
5. Miller, S.A., Martin, R.R. Molecular diagnosis of plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26: 409-432 (1988).
6. Mullis, K.B., Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350 (1987).
7. Voller, A., Bartlett, A., Bidwell, D. D., Clark, M. F., Adams, A. N. The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of General Virology* 33: 165 (1976).
8. Van Vuurde, J.W.L. Inmunofluorescence colony staining. En: *Serological Methods for detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens, a Laboratory manual*, pp. 299-305. Hampton, R., Ball E., De Boer S. (eds.), APS Press, St. Paul, Minnesota, USA (1990).
9. Becker, J.M., G.A. Cadwell, E.A. Zachago. *Biotechnology. A Laboratory Course.* 2nd. Ed. Academic Press. New York, pp. 141-156 (1997).
10. Grogan, R.G. The science and art of plant-diseases diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 19: 333-351 (1981).
11. Miller, S.A., T.R. Joaquim. Diagnostic techniques for plant pathogens. En: *Biotechnology in Plant Disease Control*, 321-339 (1993).

12. Brlansky, R.H.R.F., I. M. Lee. Detection of *Xanthomonas campertris* pv. *Citrumelo* and *X. citri* from citrus using membrane entrapment inmunofluorescence. *Plant Dis.* 74: 863-868 (1990).
13. Foster S.J., Ashby A.M., Fitt B.D.L. Improved PCR-based assays for pre-symptomatic diagnosis of light leaf spot and determination of mating type of *Pyrenopeziza brassicae* on winter oilseed rape. *European Journal of Plant Pathology* 108: 379-383 (2002).
14. Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brown J. K., Becerra-Flora, A. Rivera-Bustamante, R. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopatology* 86: 1186-1192 (1996).
15. Foster S.J., Singh G., Fitt, B.D.L., Ashby A.M. Development of PCR based diagnostic techniques for the two mating types of *Pyrenopeziza brassicae* (light leaf spot) on winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 111-119 (1999).
16. Fessehaie, S. H., H. De Boer, C. A. Lévesque. An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. 93(3): 262-269 (2003).
17. Bertolini E. A., Olmos, M.M. López, M. Cambra. Multiplex nested reverse transcription-polymerase chain reaction in a single tube for sensitive and simultaneous detection of four RNA viruses and *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive trees. *Phytopathology* 30(3): 286-292 (2003).
18. Bailey-Moreno A.M., Mitchell D.J., Manjunath K.L., Nolasco G., Niblett C.L. Identification to the species level of the plant pathogens *Phytophthora* and *Pythium* by using unique sequences of the ITS1 region of ribosomal DNA as capture probes for PCR-ELISA. *FEMS Microbiology Letters* 207: 153-158 (2002).
19. Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T, Asensio, M. Simultaneous detection and typing of plum pox potyvirus (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *J. Virol. Methods* 68: 127-137 (1997).
20. Pollini, P., Giunchedi, L., Bissani, R. Specific detection of D- and M-isolates of plum pox virus by immunoenzymatic determination of PCRproducts. *J. Virol. Methods* 67: 127-133 (1997).
21. Shamloul, A.M., Abdallah, N.A., Madkour, M.A., Hadidi, A. Sensitive detection of the Egyptian species of sugarcane streak virus by PCR-probe capture hybridization (PCR-ELISA) and its complete nucleotide sequence. *J. Virol. Methods* 92: 45-54 (2001).
22. Barbara, D.J., Morton, A., Spence, N.J., Miller, A. Rapid differentiation of closely related isolates of two plant viruses by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Virol. Methods* 55: 121-131 (1995).
23. Calderón C., Ward E., Freeman J., Foster S.J., McCartney H.A. Detection of airborne inoculum of *Leptosphaeria maculans* and *Pyrenopeziza brassicae* in oilseed rape crops by polymerase chain reaction (PCR) assays. *Plant Pathology* 51: 303-310 (2002).

24. Silva, C.S., Tereso, G. Nolasco, M. M. Oliveira. Cellular location of *Prune dwarf virus* in almond sections by *in situ* reverse transcription-polymerase Chain Reaction. *Phytopathology* 30(3): 278-285 (2003).
25. Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet C.M., Rivera-Bustamante, R.F. Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huastecovirus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93(3): 270-277 (2003).
26. Koenraadt H., Jones A.L. Allele-specific oligonucleotides and their use in characterization of resistance to benomyl in *Venturia inaequalis*. En: *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, detection and quantification*. A Schots, F.M. Dewey y R. Oliver (eds.), CABI Publishing, England, (1994).
27. Menzies, J.G., G. Bakkeren, F. Matheson, J.D. Procunier, S. Woods. Use of inter-simple sequence repeats and amplified fragment length polymorphisms to analyze genetic relationships among small grain-infecting species of *Ustilago*. *Phytopathology* 30(2): 167-175 (2003).
28. Padidam, M., Beachy, R.N., Fauquet, C.M. Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *J. Gen. Virol.* 76: 249-263 (1995).
29. Garzón, T.J.A., Rivera, B.F.R., Herrera, E.L., Delgadillo, S.F., Pozo, C.O. Estudio preliminar sobre el "rizado amarillo" del chile (*Capsicum annuum* L.), en el sur de Tamaulipas. Un geminivirus. SMF. XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, p. 16 (1989).
30. Rodríguez, M. R. Estudio preliminar sobre el sobre el mosaico del chile en la región del Bajío. Tesis de Maestría. C.P. Chapingo Méx. (1971).
31. Brown J.K. Nelson M.R. Transmission host range and virus-vector relationship of chino del tomate virus a whitefly-transmitted geminivirus from Sinaloa México. *Plant Disease* 72: 866-869 (1988).
32. Garzón-Tiznado, J.A., Torres Pacheco, I., Ascencio Ibáñez, J., Herrera-Estrella, L., Rivera Bustamante, R.F. Inoculation of peppers with infection clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phythopathology* 83: 514-521 (1993).
33. Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet C.M., Rivera-Bustamante, R.F. Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huastecovirus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93(3): 270-277 (2003).
34. Stenger, D.C, J.E Duffus, B. Villalon. Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80: 704-709 (1990).
35. Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Herrera-Estrella, L., Rivera-Bustamante, R. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *Journal of General Virology* 74: 2225-2231 (1993).
36. Torres-Pacheco, I. Geminivirus involucrados en el rizado amarillo del chile: interacciones entre PHV y TPV. Tesis de doctorado. CINVESTAV Unidad Irapuato (1997).

37. Vera-Aguado, M.G. Detección de virus en tomate (*Licopersicon lycopersicum*), chile (*Capsicum annuum*) y maleza en diferentes ambientes de cultivo en México. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya-INIFAP (2000).
38. Guevara-González R.G., Ramos P.L., Rivera-Bustamante R.F. Complementation of coat protein mutants of pepper huasteco geminivirus in transgenic tobacco plants. *Phytopathology* 89: 540-545 (2000).
39. Godínez-Hernández, Y., Anaya-López, J.L., Díaz-Plaza, R., González-Chavira, M., Rivera-Bustamante, R.F., Torres-Pacheco I., Guevara-González, R.G. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili pepper from Yucatan, México. *Hortscience* 36(1):139-142 (2001).
40. Anaya-López, J.L., Torres-Pacheco I., Guevara-González, R.G., González-Chavira, M., Pons-Hernández, J.L., Guevara-Olvera, L., Muñoz-Sánchez, C.I., Hernández-Verdugo, S., Rivera-Bustamante, R.F. 2003. Resistance to geminivirus mixed infections in mexican wild peppers (*Capsicum spp*). *Hortscience*. En prensa.
41. UPOV Publication núm. 221 (E). International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Ginebra, Suiza (1992).
42. Baenziger P.S., Kleese R., R.F. Barnes. Intellectual property rights: Protection of plant materials. *Crop Sci. Soc. Amer.,* Madison, WI. USA, (1993).
43. Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, W. Meyer. *DNA fingerprinting in plants and fungi.* CRS Press, Inc. USA, (1995).
44. Gepts P. Origin and evolution of common bean: Past events and recent trends. *Hortscience* 33(7): 1124-1130 (1998).
45. Lin J.J., J. Kuo. AFLP: A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus* 17: 66-70 (1995).
46. Janssen, P., R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau K. Keraters. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142: 1881-1893 (1996).
47. Pejic I., Ajmone-Marsan P., Morgante M., Kozumplick V., Castiglioni P., Taramino G., Motto M. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1248-1255 (1998).
48. Sharma S.K., Knox M.R., Ellis T.H.N. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 751-758 (1996).
49. Beckmann, J.S., M. Soller. Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35: 114-124 (1986).
50. Beckmann, J.S., M. Soller. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement:methodologies, mapping and costs. *Theor Appl Genet.* 67: 35-43 (1986b).
51. Smith J.S.C. *Identification of food-Grain varieties.* Wrigley CW (ed). Amer. Assoc. Cereal Chem., Saint Paul, Minn. USA., pp. 131-150 (1995).

52. Ribaut, J.M., D.A. Hoisington, J.A. Deutsch, C. Jiang, D. González-de-León. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1 Flowering parameters and the anthesis-silking interval. *Theor Appl Genet.* 92: 905-914 (1997).
53. Ribaut, J.M., C. Jiang, D. González-de-León, G.O. Edmeades, D.A. Hoisington. "Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 2 Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.* 94: 887-896 (1997).
54. Pons-Hernández, J.L. Comunicación personal. Unidad de Biotecnología. INIFAP (2003).
55. Bohn, M., M.M. Khairallah, D. González-de-León, D.A. Hoisington, H.F. Utz, J.A. Deutsch, D.C. Jewell, J.A. Mihm, A.E. Melchinger. QTL Mapping in tropical maize: I. Genomic regions affecting leaf feeding resistance to Sugarcane Borer and other traits. *Crop Sci.* 36: 1352-1361 (1996).
56. Bohn, M., M.M. Khairallah, C. Jiang, D. González-de-León, D.A. Hoisington, H.F. Utz, J.A. Deutsch, D.C. Jewell, J.A. Mihm, A.E. Melchinger. QTL Mapping in tropical maize: II. Comparison of genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. *Crop Sci.* 37: 1892-1902 (1997).
57. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Vande Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper M. Zabeau. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting". *Nucleic Acids Res.* 23(21): 4407-4414 (1995).
58. Gil-Vega K., González-Chavira M., Martínez de la Vega O., Simpson J., G. Vandemark. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119: 335-341 (2001).
59. González, M., R. Rodríguez, M.E. Zavala, J.L. Jacobo, F. Hernández, J. Acosta, O. Martínez, J. Simpson. Characterization of mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology* 88(4): 292-299 (1998).
60. Mayek-Pérez, N., C. López-Castañeda, M. González-Chavira, R. Garcia-Espinosa, J. Acosta-Gallegos, O. Martínez de la Vega, J. Simpson. Variability of mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 257-264 (2001).
61. Rodríguez-Guerra, R., M.T. Ramírez-Rueda, O. Martínez de la Vega, J. Simpson. Variation in genotype and anastomosis groups of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from México. *Plant Pathology.* En prensa (2003).
62. Simpson J., Martinez O., Mendoza A., Reyna G., E. García En: Manual of second international training course on analysis and manipulation of the plant genome. CINVESTAV-Irapuato, México (1994).
63. Williams, G.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, S.V. Tingey. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535 (1990).

64. Senior, M.L., M. Heun. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome* 36: 884-889 (1993).
65. Devos, K.M., G.J. Bryan, A.J. Collins, P. Stephenson, M.D. Gale. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. *Theor Appl Genet.* 90(2): 247-252 (1995).
66. Mian, M.A.R., D.A. Ashley, W.K. Vencill, H.R. Boerma. QTL conditioning early growth in soybean. *Theor. Appl. Genet.* 97: 1210-1216 (1998).
67. Kleinhofs A., Kilian A., Saghai-Maroof M.A., BiyashevR. M., HayesP., Chen F.Q., Lapitan N., Fenwick A., Blake T.K., Kanazin V., Ananiev E., Dahleen L., Kudrna D., Bollinger J., Knapp S.J., Liu B., Sorrells M., Heun M., Franckowiak J.D., Hoffman D., Skadsen R., Steffenson B.J. A molecular, isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. *Theor. Appl. Genet.* 86: 705-712 (1993).
68. Yang G.P., M.A. Saghai-Maroof, C.G. Xu, Q. Zhang, R.M. Biyashev. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Molecular and General Genetics* 245: 187-194 (1994).
69. Lavi U., Akkaya M.S., Bhagwat A.A., Lahav E., P.B. Cregan Minisatellite and SSR DA Markers in avocado. *Euphytica* 80: 171-177 (1995).
70. Gebhardt, C., Valkonen, J.P. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 79-102 (2001).
71. Ramalingam, J., Vera-Cruz, C.M., Kukreja, K., Chittoor, J.M., Wu, J.L., Lee, S.W., Baraoidan, M., George, M.L., Cohen, M.B., Hulbert, S.H., Leach, J.E., Leung, H. Candidate defense genes from rice, barley, abd maize and their association with qualitative and quantitative resistance in rice. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 16: 14-24 (2003).
72. Trognitz, F., Manosalva, P., Gysin, R., Ninio-Liu, D., Simon, R., del Herrera, M.R., Trognitz, B., Ghislain, M., Nelson, R. Plant defense genes associated with quantitative resistance to potato late blight in *Solanum phureja* x dihaploid *S. tuberosum* hybrids. *Mol. Plant-Microbe Interactions* 15: 587-597.
73. Wang, Z., Taramino, G., Yang, D., Liu, G., Tingey, S.V., Miao, G.H., Wang, G.L. Rice ESTs with disease-resistance gene- or defense- response gene-like sequences mapped to regions containing major resistance genes or QTLs. *Mol. Genet. Genomics* 265: 302-310 (2001).
74. Ramamurthy, M., Gómez-Buitrago, A.M., Eckardt, N., Shah, N., Guevara-Garcia, A., Day, P., Raina, R., Fedoroff, N. Characterizing the stress/ defense transcriptome of Arabidopsis. *Genome Biology* 4: R20 (2003).
75. Liang, P., Pardee, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967-971 (1992).
76. Lisitsyn, N., Wigler, M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 259: 946-951 (1993).

77. Velculescu, VE., Zhang, L., Vogelstein, B., Zinzler, K.W. Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487 (1995).
78. Watson, J.B., Margulies, J.E. Differential cDNA screening strategies to identify novel stage-specific proteins in the developing mammalian brain. *Dev. Neurosci.* 15: 77-86 (1995).
79. Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D., Siebert P.D. Suppression substractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 6025-6030 (1996).
80. Anaya-López J.L. Análisis de la expresión diferencial de genes en presencia del virus huasteco del chile en plantas de chile con resistencia a geminivirus. Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Celaya-INIFAP (2002).

LA EXPERIENCIA DEL GRUPO SAVIA EN EL CAMPO MEXICANO

P. Bosch Guha

Introducción

La participación del Grupo Savia en el campo mexicano ha sido, después de muchos esfuerzos, de gran éxito. El papel que ha desempeñado ha sido múltiple y son pocas las empresas mexicanas que puedan representar un ejemplo similar de integración productiva, desde la investigación hasta la comercialización final, en torno a un concepto de negocio, en donde la producción agrícola rebasa los límites nacionales para competir a nivel internacional con las condiciones y términos de productividad, calidad y precio que la globalización de la economía mundial exige.

La experiencia que Grupo Savia ha adquirido a lo largo de estos últimos años como la de otros grupo similares, es poco conocida. Esto se explica porque, a diferencia del sector industrial cuyo comportamiento acapara la atención de los medios de comunicación y es motivo de análisis por parte de los expertos, las empresas agrícolas, como tales, son prácticamente desconocidas. Basta revisar las publicaciones periódicas nacionales e internacionales para darse cuenta del poco interés y presencia que representan las empresas agrícolas en la prensa y los medios de divulgación en general.

Por otra parte, a pesar que el sector agrícola no ha dejado de ser estratégico, en tanto sigue siendo la fuente fundamental de la alimentación del mundo, hoy en día producto de la urbanización, ya no es la fuente de información y conocimientos de donde los analistas y académicos desarrollen modelos de administración moderna que se apliquen a los ámbitos económico, social y político del ser humano. Más aún, las más recientes novedades en materias como la administración, comunicación y sistemas no encuentran su inspiración en esta actividad primaria.

Sin embargo, al igual que otras actividades económicas, el campo en el mundo está experimentando importantes transformaciones: la dismi-

nución de la población rural, producto de la urbanización, la globalización de los mercados, el surgimiento acelerado de innovaciones tecnológicas y la creciente preocupación por la salvaguarda de los recursos naturales y el medio ambiente, más que nunca, influyen en su desempeño.

La experiencia de Savia, su éxito, si bien se manifiesta en el desarrollo de diversos cultivos con tecnología moderna, adquiere mayor relevancia cuando se le visualiza como un modelo de aplicación integral de la biotecnología en el campo mexicano. Savia se concibe como una empresa que mediante la investigación avanzada desarrolla nuevas variedades y participa en la producción y comercialización de semillas y de productos frescos a través de diversas empresas.

Grupo Savia

Descripción del Grupo

Savia, S.A. de C.V., es la empresa tenedora de Seminis*. Seminis está orientada el desarrollo, producción y comercialización de semillas de hortalizas y frutales. Con ello, se ha constituido en líder mundial con ventas anuales del orden de los 800 millones de dólares con cerca de 8 000 empleados.

Savia, a través de sus empresas, participa en forma directa e indirecta en distintas áreas del sector agroindustrial. Esta diversificación le ha permitido ubicarse estratégicamente para capturar el valor que se genera en los distintos eslabones de la cadena de alimentos, a fin de capitalizar con mejores márgenes sus inversiones.

La tecnología desempeña un papel central dentro de la estrategia del grupo. Con sus afiliadas, Savia es propietaria de tecnologías avanzadas que constituyen la plataforma para el desarrollo de semillas mediante técnicas tradicionales de hibridación, una especialización que domina a nivel global. Sin embargo, la empresa también se ha fortalecido en las áreas de mejoras genéticas de hortalizas y frutales y está lista para participar en este sector en cuanto el mercado demande esta categoría de productos (en el presente sólo 0.2% de sus ventas provienen de productos de esta naturaleza). El énfasis que Savia ha puesto en el desarrollo de la agrobiotecnología aplicada a hortalizas y frutales le permite en menor tiempo ofrecer semillas de alta calidad.

* Seminis dejó de ser subdiaria de Grupo Savia en mayo de 2003.

Seminis es la principal empresa que desarrolla, produce y comercializa semillas de hortalizas y frutales a nivel mundial, con ventas en más de 150 países. Mediante la mejora de plantas por medio de técnicas de polinización cruzada y métodos avanzados de hibridación, se reduce la necesidad del uso de agroquímicos, incrementa el rendimiento de las cosechas, limita las mermas de producto y crea alimentos con mejores características organolépticas.

Comercializa sus semillas a través de distintas marcas de reconocido prestigio entre las que destacan: Asgrow Vegetable Seeds, Petoseed, Royal Sluis, Bruinsma, California, Choong Ang, Genecorp, DiVine Ripe/LSL, Horticeres, Hungnong, y Seneca.

A través de estas marcas ofrece a los agricultores más de 4 000 distintas variedades de semillas que representan cerca de 60 especies que incluyen: frijol, brócoli, calabaza, zanahoria, puerro, coliflor, apio, pepino, col, lechuga, berenjena, melón, cebolla, chícharo, pimiento, rábano, espinaca, maíz dulce, jitomate y melón. Seminis es propietaria de más de 132 patentes y ha protegido más de 380 variedades bajo la Ley de Protección de Variedades Vegetales. Opera 49 centros de investigación y estaciones de desarrollo en 17 países.

Este enfoque global le ha permitido adaptar sus productos a cualquier microclima, así como responder a las preferencias de los consumidores locales. En los últimos dos años Seminis ha invertido más de 100 millones de dólares en el desarrollo de productos. Por otra parte, los esfuerzos de investigación y desarrollo se han potenciado por medio de alianzas tecnológicas a nivel internacional, con más de 100 instituciones públicas y privadas, entre ellas: las Universidades de Cornell, Texas A&M, California, Davis, Florida y Wisconsin, en EUA, Nacional de Seoul en Corea, así como el Instituto John Innes en el Reino Unido, el Centro Internacional de Investigación en Plantas en Holanda y el Centro de Investigación en Alimentos y Cultivos en Nueva Zelanda.

Áreas de investigación

En Seminis se pueden distinguir cuatro áreas de investigación básica:

1. Mejoramiento vegetal;
2. Desarrollo de germoplasma;
3. Patología;
4. Investigación para la calidad.

El programa de mejoramiento vegetal está orientado a identificar los mecanismos a través de los cuales las características de una planta pasan de una generación a otra y determinar cuáles son las mejores técnicas para introducir nuevas y mejores cualidades en las plantas. Los especialistas realizan miles de polinizaciones o cruzas cada año buscando la mejor combinación de características. Estas miles de plantas son sujetas a pruebas y las mejores son seleccionadas para mayores evaluaciones durante un lapso de diez años hasta lograr la variedad óptima.

En cuanto al desarrollo de germoplasma, éste se lleva a cabo por un importante grupo de investigadores —desarrolladores de germoplasma— dedicados a la identificación de genes aún confinados en la amplia reserva de variedades silvestres de los vegetales domesticados. Los desarrolladores de germoplasma usan las técnicas más modernas en biología para identificar estos nuevos genes y hacerlos viables a los técnicos mejoradores de plantas.

En el tomate por ejemplo, los investigadores están identificando genes que ofrecen protección a enfermedades, mejoras en las cualidades de firmeza, contenido y de azúcares y en los niveles de antioxidantes.

La biodiversidad no es sólo importante para la salud del planeta sino también es indispensable para mejorar y hacer sustentables los cultivos.

Cuando las preferencias del mercado cambian o nuevas enfermedades y plagas ponen en riesgo los cultivos, se constituyen en un serio problema. Los especialistas en el mejoramiento de vegetales acuden a la información genética de los bancos de germoplasma para rescatar de las semillas las características que se necesitan para contrarrestar su impacto. Por ello Seminis dispone de uno de los bancos más amplios y diversificados de información genética de frutas y hortalizas en el mundo.

El programa de patología cuenta con especialistas líderes a nivel mundial en el desarrollo de nuevas variedades resistentes a bacterias, hongos, nemátodos y virus. Cuando una planta en forma natural es resistente a una enfermedad se ofrece la mejor protección sin incurrir en los pesticidas químicos. Por ello, ha puesto énfasis en este tipo de investigaciones.

Cuando una plaga o enfermedad se convierte en problema, los patólogos de la empresa ayudan a los agricultores a diagnosticar la enfermedad, a identificar el agente que la causa y a diseñar las acciones para su control y erradicación.

Por ejemplo, en los centros de cultivo de calabaza más importantes de los Estados Unidos y de Canadá, el ataque de virus destruye anualmente

entre 20 y 80% de las cosechas, en especial las que se realizan en la temporada de otoño.

Para el control de estos virus los agricultores tradicionalmente se apoyan en el uso de agroquímicos para combatir los áfidos y otros insectos que contribuyen a diseminar ésta y otras enfermedades. Sin embargo, el uso de los métodos químicos regularmente es costoso y poco efectivo.

Con relación a esto último, los técnicos, durante diez años, con base en los resultados de la investigación biotecnológica, han desarrollado variedades híbridas, con mayor capacidad de defensa al ataque de virus que las variedades convencionales, por lo que se han alcanzado mejores rendimientos en la mayoría de los campos de cultivo de los Estados Unidos. Con el tiempo esto se traducirá, por una parte, en una menor presión sobre la tierra al incrementarse el rendimiento por hectárea y por otra, en que la disponibilidad en el mercado sea menos estacional al ampliarse las temporadas de cosecha.

Por lo que se refiere al programa de calidad, éste está enfocado a la búsqueda de mejores opciones de producto para satisfacer las necesidades de los consumidores. Esto conlleva al análisis de los componentes de hortalizas y frutas que afectan sus características de proceso, sus contenidos nutricionales así como los agentes bioquímicos que influyen en su sabor, textura y apariencia. De esta manera, se prueban docenas de muestras de diferentes especies de todo el mundo buscando identificar características que ofrezcan valor agregado tales como azúcares, acidez, contenido enzimático, carotenoides, color y pungencia. Estas mejoras incluyen también potenciar componentes naturales reconocidos como agentes efectivos en la cura de enfermedades tales como cáncer y males cardiovasculares.

Al respecto, a partir de enero de 2003, Seminis tiene los derechos exclusivos para comercializar un brócoli que contiene 80 veces más capacidad para combatir el cáncer que las variedades convencionales. Esta variedad fue desarrollada en el John Innes Center del Reino Unido y fue licenciada por la empresa administradora de tecnología Plant Bioscience Limited.

El desarrollo de esta variedad de brócoli requirió más de cinco años de investigación utilizando técnicas tradicionales de mejoramiento de vegetales y se estima que su adaptación para realizar las pruebas a nivel global, para su manejo comercial, necesitará de tres años más.

El acuerdo comercial contempla la transformación de estas nuevas líneas básicas en productos comerciales para su manejo en fresco, como

producto funcional y suplementos nutricionales, entre otros, a cambio del pago de derechos por el uso de la tecnología y la variedad mejorada.

Los investigadores de la empresa están haciendo cruzamientos de esta nueva variedad con las convencionales adaptadas a importantes zonas de producción, debido a que factores ambientales y agronómicos pueden afectar los niveles de concentración de los glucosinolatos en el brócoli. Con estas pruebas se está determinando cuáles son las mejores condiciones y prácticas agronómicas que garanticen su adaptación a diferentes condiciones de cultivo sin perder las características especiales de esta variedad.

Lo anterior es un ejemplo de cómo, a través de alianzas con empresas como Plant Bioscience Limited, que reúne tecnologías de una amplia red de centros de investigación, Seminis ha logrado combinar sus diversas capacidades de mejoramiento de vegetales con las innovaciones más promisorias a un costo competitivo en el mercado. Es importante señalar que la empresa vende 120 variedades de brócoli.

Es por medio de estas alianzas que los resultados de la investigación de la comunidad científica se diseminan y benefician a la sociedad. A su vez, el pago de derechos que realiza Seminis a las administradoras de tecnología, les permite a éstas financiar nuevos proyectos de investigación, con lo que se alcanza un círculo virtuoso (1, 2, 3).

Estrategia de negocios

Lo hasta ahora comentado no sería posible sin una adecuada estrategia de negocios. Seminis parte del concepto de que la semilla mejorada es la manera más eficiente de transferir valor agregado al agricultor y al consumidor final de alimentos.

En los mercados de Norteamérica y Europa se están desarrollando características en las semillas que provean beneficios más allá del campo de cultivo. De acuerdo con investigaciones realizadas en los Estados Unidos, 89% de los entrevistados citaron que consumían vegetales por razones nutricionales y 73% señalaron que estarían dispuestos a pagar un sobreprecio por versiones más saludables de los alimentos que ingerían regularmente.

La idea es transformar las frutas y hortalizas de productos agrícolas tradicionales en artículos con valor agregado que los diferencie en el mercado. De esta manera el crecimiento del mercado de semillas responde

a la demanda de alimentos con alta calidad nutricional debido a la creciente preocupación de la población por obtener mayores beneficios para su salud.

Por otra parte, la consolidación de los comercializadores, distribuidores y productores ofrece a Seminis nuevas oportunidades de negocios para capturar el valor que se genera a lo largo de la cadena alimenticia que se inicia con la semilla. Al respecto, el rápido crecimiento de las industrias que manejan productos procesados están demandando nuevas variedades de vegetales que ofrezcan mayor calidad, menores mermas, así como sabor y calidad nutricional superiores.

En los países en desarrollo, en donde la escasa calidad de la semilla limita la oferta local de alimentos, se apoya la transición de agricultores hacia el uso de semillas híbridas. El alcance global de la empresa, así como la disponibilidad de amplios bancos de germoplasma aseguran que se puedan cubrir las necesidades de cualquier mercado local (3).

Participación en México

Grupo Savia en México es tal vez la primera empresa mexicana que en los hechos, ha concebido al campo como una industria de alcance global y no meramente como una actividad local, en donde el manejo de conceptos como rentabilidad, productividad y competitividad vía diferenciación y agregación de valor a los productos, son el modelo base de sustentación del negocio. A través de sus diferentes empresas agrícolas y comercializadoras, tiene un valor de ventas superior los 200 millones de dólares anuales, emplea a más de 18 000 personas y mantiene en producción cerca de 8 000 Ha.

Esquema conceptual

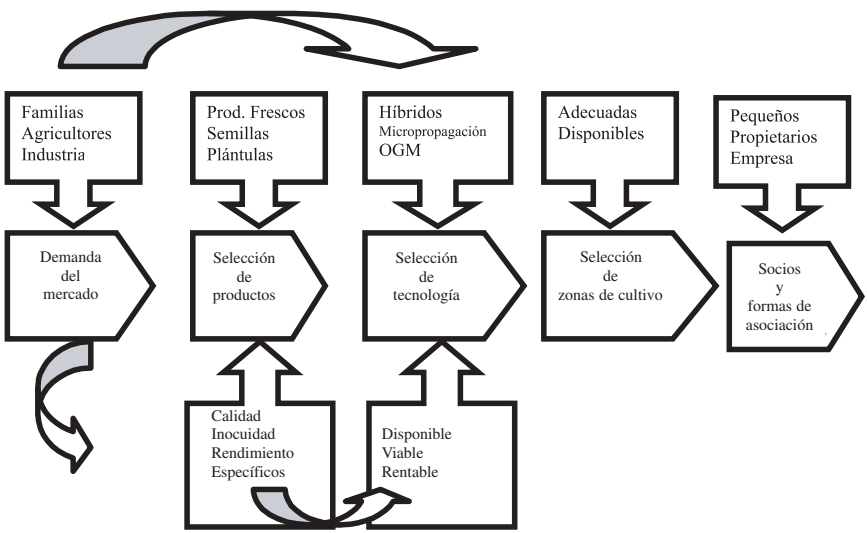
El modelo en el cual sustenta su actividad tiene como punto de partida atender las necesidades del mercado nacional e internacional; en segundo término, se investigan cuáles son las tecnologías más adecuadas para maximizar la productividad por hectárea. En tercer lugar, se orienta a identificar las zonas del país en donde se reúnen las mejores condiciones agronómicas para el cultivo particular de que se trate. Posteriormente,

se determinan los posibles grupos asociados y se definen los elementos jurídicos necesarios para mantener los compromisos de inversión y producción a mediano y largo plazos. Finalmente, se evalúan las fuentes de financiamiento más adecuadas (tabla 1).

Para todo lo anterior se realiza una programación que asegure: a) una oferta de frutas y hortalizas con la calidad de exportación a precio competitivo en el mercado; b) el aprovechamiento óptimo de los recursos técnicos, humanos y financieros; c) el cumplimiento de los compromisos contraídos con los asociados.

Este modelo, con una estricta orientación de mercado en la práctica, se ha aplicado no sólo a la producción de cultivos tradicionales como hortalizas y frutales destinados a resolver la demanda revelada de los consumidores de productos frescos en México, Estados Unidos y Canadá, sino también su enfoque se amplió, en su momento, a través de proyectos específicos, encaminados a atender los requerimientos de otros productos de los agricultores y la industria de proceso.

Tabla 1
MODELO CONCEPTUAL



El mercado

El grupo participa en México en tres mercados distintos. En el de consumo con una gran variedad de frutas y hortalizas frescas, en el sector agrícola, promoviendo el uso y atendiendo la demanda por semilla de alta calidad, así como la de plántulas del banano y en la industria, con proyectos especiales para la reproducción masiva de plántulas de agave, entre otros (3).

Tabla 2

Clientes / *Producto*	*Consumidores*	*Agricultores*	*Industria*
Frutas y hortalizas	X		
Semillas		X	
Bambú		X	
Plántulas		X	X

Atender las necesidades del mercado de exportación implica la identificación de productos que ofrezcan la seguridad de que su demanda es de largo plazo y que la posibilidad de que otros productores participen en el mercado no se traduzca en una caída de la rentabilidad del negocio. Esto es, la selección final de productos considera la identificación de nichos de alta rentabilidad, en donde se pueda tener en el mercado una ventaja competitiva a largo plazo.

Al respecto es importante señalar que las inversiones en tecnología de cultivo moderno, el uso de semillas híbridas y la aplicación de sistemas de mejoramiento, distribución y comercialización de alta calidad, no se podían justificar sin la participación en los mercados de exportación. La dimensión de estos hace rentable la operación en México (tabla 2).

La tecnología moderna de producción agrícola y la participación del grupo Savia

El tránsito entre el análisis del mercado y las decisiones de producción requiere de varias consideraciones previas, siendo la primera la selección de la tecnología adecuada.

La selección de tecnología adecuada responde a la búsqueda de mejores insumos (semillas, fertilizantes y equipos), al diseño de las técnicas agronómicas que mayores ventajas ofrezcan en la aplicación de los recursos invertidos por el Grupo y por nuestros asociados y también a la percepción que respecto a la tecnología utilizable tengan los productores y los mismos consumidores.

Si los productos y la tecnología que ofrece el Grupo no tienen una aplicación práctica para nuestros clientes y si además se traduce en un sobreprecio, difícilmente serán atractivos. Asimismo, si nuestros productos, a pesar de su atractivo tecnológico, tienen forma de ser sustituidos por alternativas mejor conocidas y probadas (tradicionales), tardarán más en ser aceptados. Además, si tanto productores y consumidores tienen reservas por diversas razones en cuanto a su inocuidad respecto a la salud humana, difícilmente se logrará su utilización.

Tabla 3

Cliente / *Tecnología*	*Consumidores*	*Agricultores*	*Industria*
Hibridación	X	X	X
C. Tejidos		X	X
Genética			
Resistencia		X	
Maduración			
Retardada		X	

En la tabla 3, se resume la experiencia del Grupo al respecto. En primer término, las preferencias reveladas muestran que los consumidores en general son indiferentes a la técnica que se utilice en el cultivo de frutas y hortalizas. Lo que esperan es un producto fresco, inocuo y de alta calidad y no están dispuestos a pagar un sobreprecio, salvo que éste reúna cualidades excepcionales. Por ello el interés en el mercado de los consumidores, es el de ofrecer un buen producto, a buen precio, a través de una amplia red de comercialización con marcas de reconocido prestigio.

Con relación a la reacción de los consumidores relativos al consumo de hortalizas y frutas genéticamente mejoradas, no constituye hasta el presente, un tema en el mercado y es muy factible que los consumidores acepten estos productos si se les ofrece mejores cualidades nutricionales.

En cuanto a los agricultores, la demanda de semilla en México se atiende, hasta la fecha, con tecnología tradicional cuando se trata de frutales y hortalizas. Como parte de la estrategia de mercado, se está promoviendo entre ellos el uso de semillas mejoradas con rendimientos superiores entre el 15 y 20% respecto a las tradicionales.

El agricultor espera siempre un mayor rendimiento, un menor costo y un mejor precio por sus productos en el mercado. La mayoría de los cultivos se propagan por medio de las semillas y son éstas el mejor vehículo para introducir las innovaciones tecnológicas en la actividad agrícola. Algunos autores estiman que el éxito de la agricultura norteamericana en cuanto a los rendimientos por hectárea se debe entre el 50 y 70 % a la introducción y uso de semillas mejoradas y el resto al uso de fertilizantes y plaguicidas. Sin embargo, los rasgos que le transfieren valor agregado a las semillas a través de las técnicas de la biotecnología moderna como son: una mayor resistencia a plagas y enfermedades o mejoras en la calidad nutricional, se capitalizan mejor si se incorporan a variedades ya desarrolladas para generar altos rendimientos y calidad. Para ello, es importante disponer de fuentes de abastecimiento de germoplasma de cultivos de alta calidad. A lo largo del tiempo Savia, por medio de sus diferentes filiales en el mundo, ha integrado uno de los bancos de germoplasma más grandes del mundo. En México, éste se encuentra en Tapachula, Chiapas, con distintas variedades de frijol, chile y calabaza.

El Grupo produce semilla mejorada para hortalizas en las regiones de Comitán y Tapachula, Chiapas y en San Quintín, Baja California. En cuanto a la producción en Tapachula ésta se hace a campo abierto de diversas variedades comerciales de chile para exportación. La producción de semilla en Comitán se realiza bajo el sistema de invernaderos para proteger nuestras variedades del ataque de plagas, así como de contaminaciones no deseadas.

En cuanto a la demanda de semillas genéticamente mejoradas, el marco legal que en la actualidad existe en el país no facilita su comercialización máxime si es una variedad de la cual México sea su centro de origen.

Cuando el agricultor requiere de facilidad de reproducción, calidad fitosanitaria y homogeneidad, la promoción se orienta hacia las plántulas. Ejemplo de esto último lo encontramos en el banano cuyo cultivo *in vitro*, el Grupo Savia lleva desarrollando con éxito durante quince años.

Como se puede observar en la tabla 4, las ventajas que ofrece al agricultor la biotecnología moderna superan por mucho lo que éste puede

Tabla 4

Banano	*Tradicional*	*Cultivo de tejidos*
Floración (meses)	9	5-6
Cosecha (meses)	12	9
Retorno (cosechas al año)	1.2	2.0
Conversión (cajas por racimo)	1.2	2.0
Rendimiento (cajas por Ha.)	3 500	5 000

esperar de las técnicas tradicionales en cuanto a floración, tiempo de espera para la primera cosecha y en cuanto a la productividad, por lo que se refiere al número de cosechas al año, cajas por racimo y cajas por hectárea. Sin embargo, es importante señalar que el agricultor sólo después de diez años, ha empezado a aceptar correr riesgos con esta tecnología.

La razón de lo anterior es que en el campo todos los plazos se retrasan y los cambios son más lentos. El ritmo lo marcan los procesos productivos, que duran varios meses y se pueden realizar normalmente una vez al año en la mayoría de los cultivos de ciclo corto o pueden extenderse por muchos años en las plantas perennes. Estos ciclos imponen rigores y límites al crecimiento.

En la medida en que la agricultura no sea un proceso de producción continuo y que una vez que el proceso se ha iniciado, no siempre es posible corregir todos los errores. Introducir cambios y novedades requiere de diez años cuando menos. Por ello, cambiar las prácticas agrícolas tradicionales, comerciales y tecnológicas, exige una enorme cantidad de tiempo.

Finalmente la tabla 5 incluye los productos que ofrece el Grupo Savia y la tecnología que se utiliza. La oferta, se concentra en la producción de frescos, semillas híbridas para el cultivo de hortalizas y frutas y de plántulas, vía cultivo de tejidos.

La investigación y desarrollo de aplicaciones tecnológicas en México se ha concentrado con éxito, primero, en variedades mejoradas de tabaco, en la domesticación y adaptación de variedades de la vainilla y bambú en Chiapas y posteriormente, en la aplicación del cultivo de tejidos en variedades ya mencionadas como el agave y el plátano.

En el caso de las plántulas de agave, cuya demanda proviene de la industria de proceso y que se encuentra integrada desde la producción en el campo para garantizarse el abasto de insumos suficiente, oportuno

Tabla 5

Producto / *Tecnología*	*Frutas y hortalizas*	*Semillas*	*Plántulas*
Hibridación	X	X	
C de Tejidos			X
Genética			
Resistencia y		X	
Maduración			
retardada			

y de calidad, mantiene una posición más abierta y flexible para adoptar nuevas tecnologías. La producción de estas plántulas son un ejemplo importante de desarrollo y por ello, se describe a continuación.

El caso de la micropropagación de agave para la industria del tequila

En noviembre de 1998 se tuvieron los primeros indicios de que la industria del agave para tequila (*Agave tequilana* Weber var. Azul) tenía una gran demanda y por ende se estaban realizando año con año plantaciones cada vez mayores. Las estadísticas de siembra indicaban necesidades de hasta 30 millones de plantas al año. Este hecho fue el detonador de que AGROMOD, una subsidiaria de Savia en México, a través de su organismo de investigación científica (CIICA, A.C.) iniciara el desarrollo de la tecnología de micropropagación de agave a través de las técnicas de cultivo de tejidos.

En 1999 ya se había declarado una fuerte necesidad de material vegetal de siembra sano para esta industria, dado que las enfermedades propias del cultivo estaban acabando con gran parte de las plantaciones. Esto, aunado al hecho de que la gran necesidad de agaves por parte de la industria tequilera propició la cosecha temprana de muchas plantaciones, preocupó a los industriales del tequila y productores de agave, propiciando, entre otras cosas, un acercamiento con AGROMOD, lo que se tradujo en el inicio de la experiencia de micropropagar agaves a gran escala.

La manera más rápida de obtener material de siembra seleccionado por su calidad, libre de enfermedades y homogéneo, es precisamente a través de las técnicas de micropropagación, utilizando el cultivo de teji-

dos y las técnicas bioquímicas y moleculares que permiten certificar la sanidad de las plantas producidas.

Ha sido un reto desarrollar una tecnología eficiente y rentable para producir agaves micropropagados a gran escala (con un objetivo de diez millones de plantas en tres años). Ello ha requerido llevar los conceptos académicos y los resultados de la investigación científica que se han desarrollado en nuestro país, a escala industrial, en donde los procesos deben ser rigurosos, eficientes, robustos y rentables (figura 1).

En este caso, llevar una metodología del artículo científico a la práctica no fue difícil. Lo difícil consistió en llevarlo a gran escala comercial. El primer mérito fue conceptualizar, paso a paso, lo que más tarde conformaría el protocolo de trabajo. Esto implicó la actualización de la información tecnológica, la ingeniería del proceso, la introducción a la ingeniería de calidad y el diseño robusto (planeación de experimentos por medio de las técnicas Taguchi) que permitiera, en el corto plazo, definir los parámetros para poner en marcha el proceso de manufactura de las vitroplantas de agave, del campo a la probeta y de la probeta al campo, en donde las plantas habrán de pasar largos años.

Una vez definido este proceso, el siguiente reto fue el de entrar formalmente al ritmo de producción industrial, a la organización de una fábrica, nada que ver con la parte académica o los laboratorios de un centro de investigación, capacitando a las más de cien personas que trabajan en laboratorio e invernaderos, confrontando los pormenores de una planta rústica, que nunca antes había sido micropropagada en estas dimensiones en ninguna parte del mundo, siendo el principal de los retos, sin duda, el control de la contaminación microbiana.

Ahora que se ha entrado en la etapa de control y dominio del proceso industrial, se pueden resumir los principales logros de micropropagación e invernaderos de la manera siguiente:

— El primer año de funcionamiento, se produjeron 400 mil plantas. En el año 2002 se lograron dos millones y para 2003 se tiene proyectado superar los 4.5 millones, tomando en cuenta tres especies: Cordyline, banano y agave.

— Es la primera empresa en el mundo en haber producido más de dos millones de agaves; y se está iniciando la entrega del tercer millón.

— En el campo hay actualmente 500 mil agaves micropropagados, entregados por AGROMOD a la industria tequilera, cuyo desempeño agronómico ha sido excelente, superando al mejor material de siembra tradicional.

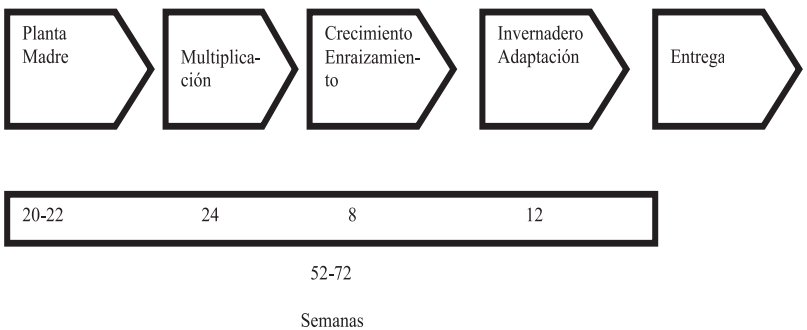
Figura 1

MICROPROPAGACIÓN DE AGAVE

(a) Selección de las plantas donadoras por su alta productividad; (b) Inducción de la planta madre para selección de tejidos libres de enfermedades; (c) Multiplicación de plantas *in vitro* por gemación axilar; (d) Plantas enraizadas al salir del laboratorio listas para su aclimatación en invernadero; (e) Plantas adaptadas al salir del invernadero; (f) Plantas micropropagadas de cuatro meses en el campo; (g) Plantas microropagadas de ocho meses en el campo.

— Desde el punto de vista económico, no sólo se resuelve el desabasto de material limpio, homogéneo y de calidad, sino que se espera un impacto en los costos de producción de materia prima para tequila, altamente significativo.

El proceso de micropropagación de agave se esquematiza en la figura 2.



- En la actualidad se cultivan 50 mil Ha. **de** agave. Se requieren 80 mil Ha.
- Cada 4 o 5 años se reemplazan 5 mil Ha. Se requieren reponer 12 mil anualmente.
- En el presente el mercado tiene un potencial de 40 millones de plantas al año.

Figura 2

PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN DE AGAVE

Zonas de cultivo

Una vez identificados los productos objetivo y la tecnología aplicable, la búsqueda de las zonas más ventajosas para su cultivo se resuelve considerando no sólo la calidad climática y la calidad de la tierra disponible y existencia de agua, sino también el impacto que en el medio ambiente puede tener el cultivo.

El hecho de que las actividades del grupo en la agricultura no se base en la propiedad de la tierra le da la flexibilidad para llevar a cabo la mejor selección posible sin la limitante que para otros inversionistas en el campo esto significa. Dos ejemplos son ilustrativos del caso: las plantaciones de vainilla 60 Has., y bambú 700 Has., en el estado de Chiapas y el cultivo de eucalipto 2 000 Has., en el estado de Tabasco, se hicieron a través de la asociación con pequeños agricultores. Es importante señalar también, que lo anterior permite la creación de módulos mínimos de

producción, de 60 Has. como en el caso de hortalizas y frutales, y optimizar la aplicación de tecnologías modernas.

Selección de socios

Uno de los elementos estratégicos del Grupo Savia, lo constituye la selección de socios. El grupo no tiene como uno de sus intereses ser propietario de grandes extensiones de tierra, pero sí tener el acceso a ella en las mejores condiciones.

Por ello, se adoptó como política el esquema de asociación con pequeños propietarios agrícolas que estuvieran dispuestos a participar en un proyecto productivo bajo el esquema de una empresa comercial moderna. Ello implica en muchos de los casos, realizar una ardua labor y negociación que siempre se logra cuando los potenciales socios están dispuestos a respetar los términos que demanda una actividad comercial moderna. Esto es, respeto de las técnicas de cultivo, productividad, control de costos y de la calidad del medio ambiente y oportunidad en la comercialización y reparto justo de las utilidades de acuerdo con lo convenido.

Las formas de asociación que se utilizan proporcionan diversas alternativas para el asociado según las condiciones que a su juicio mejor le convengan. La más sencilla es cuando nuestro socio aporta exclusivamente la tierra y accede a participar sólo en la utilidad del negocio una vez realizada la comercialización del producto; puede además, si así lo prefiere, y se emplea en las tareas del cultivo, recibir un salario y finalmente, cuando dispone de equipos agrícolas, obtener un ingreso extra por su renta.

Consideraciones finales

A esta conceptualización, se suma el mérito de enfrentar las limitaciones culturales, jurídicas y estructurales del campo mexicano. A pesar de que las modificaciones al artículo 27 constitucional sentaron las condiciones para promover una mayor inversión en el campo, con el tiempo éstas no han rendido los frutos esperados. Tal vez una respuesta la encontremos en que las limitantes jurídicas que superó la iniciativa del artículo 27, tienen todavía que enfrentar una diversidad compleja de fronteras culturales y sociales que le restan, por una parte, impulso a la

iniciativa empresarial en la agricultura y por otra, mantienen distorsiones en los mecanismos comerciales cuyos costos desincentivan cualquier iniciativa de modernización.

En el campo mexicano no existen fórmulas consagradas de éxito. La amplia diversidad cultural impide que un modelo empresarial pueda ser replicado sin tomar en cuenta las características particulares de cada región. Sólo en el sureste hay tantas diferencias en los usos y costumbres sociales y económicas como comunidades existen; algunas de ellas tuvieron su origen en el siglo XVI.

A lo anterior se suma la complejidad del escenario agrícola de los últimos años. La apertura del mercado interno a la importación de productos agropecuarios más baratos que los nacionales, la falta de financiamiento, la desaparición de instituciones públicas de apoyo a la comercialización sumado al surgimiento de regulaciones ecologistas y a la discrecionalidad en su interpretación y aplicación, han enrarecido y politizado el ambiente para modernizar el sector agrícola en su totalidad.

Por lo anterior, es necesario trabajar en el propósito de modificar la legislación para alcanzar marcos jurídicos adecuados que permitan resolver estos problemas y avanzar así en el desarrollo de la agrobiotecnología en México, para asegurar la producción de alimento sano y nutritivo.

Bibliografía

1. *Chrispeel JH, E. G. Sadava. Plants, Genes, and Crop Biotechnology,* (2ª ed.). Jones Bortlett, N.Y. USA (2003).
2. *Penson J, RH, Capps, PH. Rosson. Introduction to Agricultural Economics,* Prentice Hall. N.Y. USA (1996).
3. Savia, S.A. de C.V. Reporte a los Accionistas años 2001 y 2002.

DESARROLLO Y APLICACIÓN DEL PROCESO BIOFERMEL
UNA FERMENTACIÓN LÁCTICA PARA EL APROVECHAMIENTO EFICIENTE DE LA MELAZA POR EL GANADO

G. Viniegra González

Introducción

A principios de los años setenta, el hato bovino de México era cercano a 22 millones de cabezas, con un sacrificio anual estimado en 3.5 millones de cabezas y un rendimiento en canal de 700 mil toneladas de carne (INEGI, 2000). Lo anterior correspondía a una población de 48 millones de habitantes con un consumo aparente de 14 kg de carne *per cápita*. Este consumo de carne comprometía, y aún compromete, la disponibilidad de granos para el consumo humano. Un novillo cebado en forma intensiva con granos, consume diariamente hasta 3% de su peso vivo y solamente engorda 15% de su ingesta, con un rendimiento final en canal de 40%, lo cual da un requerimiento alimentario de 17 kg de alimento por cada kg de carne en canal. Por ejemplo: la engorda intensiva y parcial (tres meses con ganancias de 1 kg diario), usando granos de cereal en la alimentación de un millón de novillos hubiera requerido de 3.5 millones de toneladas de alimento.

Lamentablemente, la producción de cereales ha sido deficitaria en México a partir de esa época y ha generado la necesidad de importar volúmenes crecientes de esos alimentos. Por otra parte, la industria azucarera siempre ha producido excedentes de mieles incristalizables, llamadas melazas o mieles finales, cuyo precio como alimento energético es relativamente barato en comparación con el costo energético de los granos de cereales. Por ejemplo: de acuerdo con Nova-González y Peña, (1) el precio a futuro (2007) de la melaza puesta en Nueva Orleáns es menor a 75 dólares por tonelada, que se compara favorablemente con el precio del maíz, superior a 90 dólares por tonelada. Esa ventaja comparativa de precios entre la melaza y los granos era mayor en 1970 que ahora. Los esfuerzos realizados para engordar novillos en gran escala con

dietas ricas en melazas y pobres en forraje, que se llevaron a cabo en 1972 y 1973 en sendos cebaderos comerciales de Tecámac, Hidalgo, y de Mexicali, Baja California, con financiamiento de la banca oficial, tuvieron un resultado desastroso. Los animales se morían en un estado similar a la borrachera y en la necropsia se encontraba degeneración del cerebro y de los riñones (2, 3).

Para ese tiempo, los investigadores del Instituto de Ciencia Animal de Cuba, con apoyo de asesores ingleses, dirigidos por el doctor Thomas R. Preston, egresado del Instituto Rowett de Escocia, habían demostrado que esa enfermedad metabólica derivada del uso de altas dosis de melaza se podía contrarrestar con cantidades importantes de proteína en la dieta (4). Sin embargo, dicha suplementación era poco rentable para la ganadería mexicana que siempre ha carecido de fuentes abundantes de proteína barata. Con base en lo anterior, surgió el interés de la Comisión Nacional Azucarera, la cual dirigía esa industria en manos del Estado, de que se resolviese dicho problema. Así, y por recomendación del propio doctor Preston, se firmó en 1973 un contrato de investigación básica con el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM para encontrar una alternativa barata y práctica al problema. Estos son los antecedentes para la investigación que resultó en la invención aquí reseñada.

Es importante señalar que la solución del problema permitiría que los grandes cebaderos de ganado en México dejasen de utilizar granos importados y utilizaran los excedentes de melaza que por ese entonces tenían un precio subsidiado si se dedicaban a la ganadería. En aquellos años, se trataba de un volumen total cercano a 200 mil toneladas de melaza (en 2002 se estimó en 640 mil toneladas el uso ganadero de la melaza, de un total de 1.635 M ton, según datos de la Asociación Mexicana de Engordadores de Ganado Bovino, A.C.) y por lo tanto, se trataba y aún se trata de un problema de gran interés nacional. Para entender mejor la naturaleza y el alcance de la innovación que aquí se reseña, conviene hacer una breve revisión del problema técnico involucrado.

Planteamiento del problema

La melaza es una abundante fuente de azúcares fermentables, pero, tiene dos grandes deficiencias nutricionales para el ganado bovino:

a) Carece de proteínas y b) Las dietas con altos niveles de melaza y bajos niveles de forraje, producen trastornos metabólicos del ganado, por la

llamada “toxicidad de miel” o “borrachera de la melaza” documentada por Verdura y Zamora (2) y por Losada y Preston (3).

La primera deficiencia puede resolverse por el uso de suplementos con urea. Porque, según lo demostró Virtanen (5), los bovinos pueden producir una alta proporción de su proteína, por medio de la fermentación anaerobia que ocurre en sus estómagos, ya que pueden transformar parte de los alimentos fermentados en biomasa microbiana que será digerida en el intestino y formará parte de su dieta. Estos microorganismos contienen más de 50% de su materia seca en forma de proteína, según se indica en la fórmula empírica, $C_{4.17}H_{7.33}O_{3.125}N$, basada en la abundancia relativa de los elementos C, H, O, N, presentes en las bacterias (6). El rendimiento de la biomasa, puede ser expresado como un cociente

$$Y_{X/S} = (\text{g biomasa})/(\text{g sustrato}),$$

cuyo valor numérico se encuentra, según Stouthamer y Bettenhausen (7), en el intervalo, $0.1 < Y_{X/S} < 0.2$ (7). De ahí que un bovino de 500 kg pueda ingerir 12 kg diarios de materia seca con una proporción fermentable de 7.6 kg de sustrato (60%), para que se produzcan en el rumen 760 g de biomasa con cerca de 550 g de proteína cruda (nitrógeno x 6.25) incorporada en esa biomasa. Tal cantidad de proteína es cercana a 30% de los requerimientos diarios de un novillo de ese peso. Si, tal y como han propuesto Stouthamer y Bettenhausen (7), el rendimiento pudiera duplicarse ($Y_{X/S} = 0.2$), se alcanzaría el nivel de biosíntesis de 1 100 g de proteína microbiana, lo cual explicaría los resultados de Virtanen (5), quien alimentó con celulosa, urea y minerales, a dos vacas lecheras por cerca de dos años, sin que sufrieran deficiencias nutricionales ni dejaran de lactar. Conforme a lo anterior, bastaría con suministrar urea como fuente de nitrógeno para que gran parte de los requerimientos proteínicos de los bovinos puedan ser satisfechos mediante la biosíntesis ruminal (8, 9).

Sin embargo, la segunda deficiencia es más difícil de superar. Se requiere tomar en cuenta los patrones de fermentación de los hidratos de carbono, como la glucosa ($C_6H_{12}O_6$) para producir ácidos grasos volátiles (AGV) como son: los ácidos acético ($C_2H_4O_2$), propiónico ($C_3H_6O_2$) y butírico ($C_4H_8O_2$), que se generan en el rumen siguiendo el esquema que se presenta en la figura 1, donde se muestra que la producción de ácido acético produce hidrógeno y que las producciones de los ácidos propiónico

y butírico consumen este gas. Por otra parte, la producción de metano en los procesos de fermentación en el rumen también consume hidrógeno en forma importante (figura 2) y en consecuencia, el destino final del hidrógeno (metano, ácido butírico o ácido propiónico) afecta notablemente la producción final de ácido propiónico.

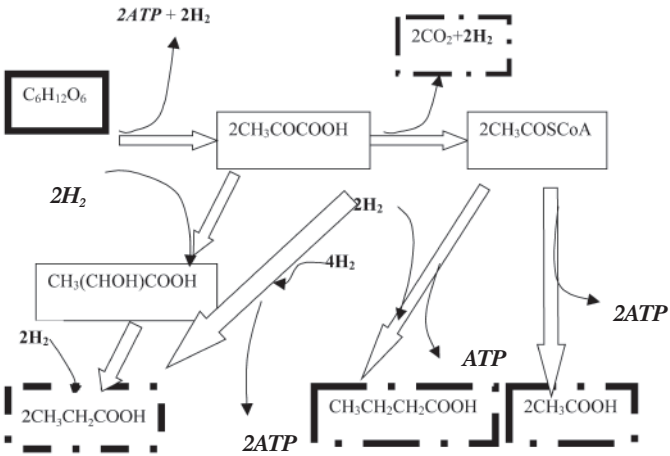


Figura 1

ESQUEMA DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL

Los nombres de los compuestos se indican a continuación: CO_2 = Bióxido de carbono; CH_3COOH = Ácido acético; $CH_3COSCoA$ = Acetil Coenzima A; $CH_3COCOOH$ = Ácido pirúvico; $CH_3(CHOH)COOH$ = Ácido láctico; CH_3CH_2COOH = Ácido propiónico; $CH_3CH_2CH_2COOH$ = Ácido butírico; $C_6H_{12}O_6$ = Azúcar (hexosa). El cuadro con línea gruesa sólida, corresponde a la alimentación. Los cuadros con línea gruesa interrumpida a los productos con carbono. Los de línea fina, a los principales compuestos intermedios. Se omite el balance detallado de hidrógenos y coenzimas. Adaptado de Kohn y Boston (10).

De la figura 1 también se puede deducir que una forma de aumentar la producción de ácido propiónico es el incremento de la producción del ácido láctico (CH_3-CHOH-COOH) que resulta ser un precursor del ácido propiónico. De lo anterior se puede inferir que la incorporación de hidrógeno en ácido propiónico o butírico dependerá de la ventaja relativa que tengan las bacterias productoras de ácido láctico sobre las productoras de ácido butírico.

Los estudios de Losada y Preston (3) mostraron que durante la producción de estos ácidos, la proporción R=[Propiónico]/[Butírico], pre-

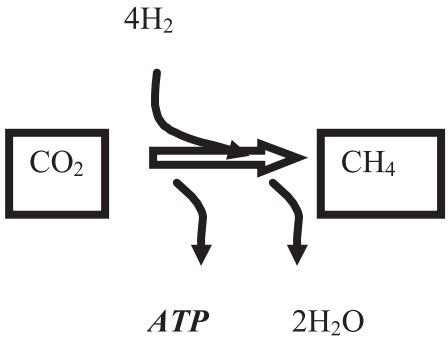


Figura 2

ESQUEMA DE LA PRODUCCIÓN DE METANO

El exceso de hidrógeno derivado de la fermentación (figura 1) se utiliza para reducir parte del bióxido de carbono (CO_2), por medio de las bacterias metanogénicas (productoras de CH_4), que compiten con la utilización del hidrógeno para reducir al ácido láctico y producir ácido propiónico, como se indica en la figura 1. Adaptado de Kohn y Boston (10).

sentó un descenso muy grande (de 3 a 1) cuando se estudió a un lote de novillos afectados por la borrachera de la melaza (tabla 1) en los cuales la intoxicación se asoció con una pérdida importante de peso vivo. Estos datos fueron confirmados posteriormente por Pérez-Gavilán y Viniegra-González (11). De lo anterior se concluyó que era necesario manipular la fermentación ruminal para contrarrestar esta intoxicación. Un trabajo posterior de Gaytán y colaboradores (12) mostró que la adición de glicerol a una dieta rica en melaza y pobre en forraje y proteína verdadera, prevenía en forma efectiva la intoxicación por melaza de los novillos. Estos resultados vinieron a justificar aún más la idea de corregir la fermentación ruminal para prevenir este trastorno metabólico. En este sentido, se supuso que el aumento de compuestos con tres átomos de carbono (glicerol, ácido láctico o ácido propiónico) servirían de precursores para formar glucosa (gluco-neogénesis), ya que se transformarían en ácido fosfo-enol pirúvico, por la vía de la condensación del piruvato y del CO_2, para formar oxaloacetato. A su vez, el fosfo-enol piruvato a través de la vía glucolítica podría formar glucosa. En cambio, el acetato y el butirato tendrían que oxidarse en el ciclo de Krebs y no darían lugar a la formación de glucosa; es decir no serían compuestos gluco-neogénicos como el fosfo-enol piruvato. Lo anterior indica que solamente los compuestos de tipo, C_3, y no los de tipo C_2 o C_4, darán origen a la formación

de glucosa en el metabolismo del animal y de ahí la importancia del cociente, R, descrito por Losada y Preston (3) e ilustrado en la tabla 1.

Tabla 1
RELACIÓN ENTRE LAS PROPORCIONES DE ÁCIDOS PROPIÓNICO Y BUTÍRICO Y LA GANANCIA PONDERAL DE TERNEROS ALIMENTADOS CON MIEL/UREA (*)

Condición	*%Animales intoxicados*	*R=Propiónico/Butírico*	*Ganancia diaria (kg)*
Forraje fresco	20	3.43	+0.480
Forrraje molido y deshidratado	20	2.10	+0.161
Sin forraje	100	0.75	-.082

* Datos de Losada y Preston (3).

Entre los factores que influyen en el aumento de la producción del ácido butírico, merecen destacarse:

a) *El tiempo de recambio en el rumen,* que al aumentarse, le otorga ventajas a los microorganismos butíricos sobre los aceto propiónicos. Lo anterior es resultado de que, cuando el contenido ruminal se recambia lentamente, los AGV producidos se absorben en forma más completa, aumenta el pH y se favorece el crecimiento de las bacterias butíricas que se especializan en medios con pH alcalino (13, 14). Este tiempo de recambio se aumenta cuando falta forraje con fibra larga, por ejemplo, con dietas ricas en melaza.

b) *La escasez de material proteínico* que limita el crecimiento de las bacterias lácticas, precursoras de la fermentación propiónica, ya que estos microorganismos generalmente requieren de ciertos aminoácidos para su crecimiento (14, 15, 16). Además las bacterias lácticas funcionan mejor en pH ligeramente ácido, es decir pH = 5.5 (14), y por ello crecerán en forma limitada si el pH del rumen aumenta por la razón indicada en el inciso anterior. Esta deficiencia se podría corregir por la adición de proteína (16), pero como se verá más adelante no es la forma más económica de resolver el problema.

Por lo tanto, el problema principal radicaba en reducir la producción de ácido butírico, fomentando la producción de ácido propiónico por medio del aumento en la producción del ácido láctico. Todo lo anterior, permitió formular una hipótesis para un nuevo sistema de alimentación a base de melaza, sustentado en los siguientes considerandos:

La producción industrial de grandes dosis de inóculos de bacterias lácticas crecidas en mostos diluidos de melaza, convenientemente adicionados con un compuesto regulador del pH (urea) y conservadas sobre un soporte sólido (rastrojo), para que, al ser alimentadas a los bovinos, pudiesen producir grandes cantidades de ácido láctico, precursor del ácido propiónico, y así se revirtiera el efecto de la llamada "borrachera" de la melaza, ligado a la excesiva producción de ácido butírico.

La idea era modificar el patrón de fermentación ruminal de los bovinos, mediante la adición, en grandes cantidades, de un fermento láctico vivo, de manera similar a lo que se propone a través de la alimentación diaria de leches agrias con bacterias lácticas, para reducir el efecto de los microorganismos putrefactivos en el intestino humano. De ahí que la reivindicación principal de la invención registrada ante la Dirección General de Invenciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico, con el número de Certificado de Invención 4910, otorgado el 21 de mayo de 1987, dijera:

> *El problema específico que se presentó, fue definir las condiciones adecuadas de fermentación líquida que produjeran niveles altos de ácido láctico (precursor de ácido propiónico), o del mismo ácido propiónico y bajos niveles de ácidos acético y butírico, y poco o nada de etanol, para poder producir a nivel industrial grandes cantidades de melaza prefermentada que fuera apetecible y provechosa para la alimentación ganadera.*

Esta aclaración técnica es importante para esta reseña, pues algunos investigadores del medio biotecnológico y veterinario, han pensado erróneamente que el proceso Biofermel estuvo destinado a la reutilización de las heces bovinas. Esto, según se verá más adelante, fue un objetivo parcial y completamente secundario del proceso. De hecho, ni el uso de las heces bovinas ni la melaza como tal, son esenciales en la invención que ahora reseñamos, ya que fueron tan sólo parte de un ejemplo práctico que, veinte años después de ser registrado como invención puede ser adaptada para muchos nuevos usos.

Investigación y desarrollo de la invención

Investigación del proceso

Para investigar este proceso, se procedió a una etapa de laboratorio que se inició en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Una parte importante de esta investigación fue formar un equipo de estudiantes con distintas disciplinas complementarias. La lista de los principales participantes y coautores del proceso aparece en la tabla 2. La investigación se orientó a establecer la veracidad de las siguientes hipótesis parciales:

— La fermentación *in vitro* de melaza inoculada con líquido ruminal puede llegar a producir altos niveles de ácidos gluco-neogénicos *(láctico o propiónico)* mediante la regulación de: temperatura, pH, fuente de nitrógeno y fuente de carbono (13).

— La regulación del pH para facilitar la fermentación láctica puede efectuarse mediante la adición de urea, ya que este compuesto libera amoniaco durante su primera fase de hidrólisis (11 a 20).

— Este tipo de fermentación se puede replicar usando otros inóculos de amplia disponibilidad, como son las heces de bovinos (14, 20).

— El producto fermentado se puede estabilizar mediante la mezcla del mosto fermentado con fibras absorbentes de la humedad. Además, puede dar lugar a una fermentación secundaria lenta (ensilado), de tipo láctico, que permita conservar el producto bajo condiciones anaerobias (11, 20).

— El producto ensilado puede reactivarse en un recipiente o saco de fermentación (sea *in vitro* o en el rumen) para reorientar una fermentación que esté dirigida hacia la producción principal de ácido butírico (20).

— La aplicación de este producto en la dieta de animales con fístula ruminal, con altas dosis de melaza, producirá un patrón muy similar al obtenido con dietas con alto nivel de granos, es decir, con una relación propiónico/butírica mayor de tres (11, 20).

Todas estas hipótesis fueron verificadas en el laboratorio y dieron lugar a las publicaciones señaladas. La verificación de la última hipótesis fue el sustento para justificar la siguiente etapa.

Escalamiento y desarrollo industrial de proceso

El escalamiento de este proceso se hizo posible por una subvención del IDRC (Institute for the Development in Cooperation, con sede en Ottawa, Canadá) que se otorgó al Conacyt (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), después de que terminó el contrato de investigación del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM con la Comisión Nacional de la Industria Azucarera. En este contrato se especificó que los derechos de propiedad industrial serían asignados a las instituciones participantes (Conacyt y la UNAM). Ésta fue una cláusula en la que intervino

Tabla 2
RELACIÓN DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN QUE INVENTÓ Y DESARROLLÓ EL PROCESO BIOFERMEL*

Nombre	*Cargo*	*Tema de trabajo*
Gustavo Viniegra González*	Investigador Titular	Supervisión y coordinación
José Pablo Pérez Gavilán*	Técnico Académico	Desarrollo tecnológico
Rubén Álvarez Barajas*	MVZ, becario	Nutrición animal
Guadalupe Fernández Zúñiga*	QFB, becaria	Análisis bioquímicos
Alejandro Meyer Willerer*	QFB, becario	Bioquímica de la fermentación
Víctor Francisco Pacheco Salazar*	Ing. Quím., becario	Ingeniería del proceso
Eduardo Alexis Peschard Mariscal*	Ing. Quím., becario	Tecnología de la fermentación
Carmen Ponciano Rodríguez*	QFB, becaria	Microbiología de la fermentación

* Coautores del certificado de invención 4910.

decisivamente el entonces director general de ese Consejo, el licenciado Gerardo Bueno Zirión. Con dicha subvención se adquirió maquinaria agrícola de molienda y mezclado de alimentos. Es importante destacar la relación personal establecida por un becario, el MVZ Rubén Álvarez, quien había sido discípulo del doctor Carlos Galina, asesor veterinario de la empresa Ganadería Pastejé S. de R. L. A través de este contacto se negoció con esta empresa el desarrollo de un experimento nutricional con dos lotes de novillos de raza Angus. Uno, de tipo testigo, alimentado con la dieta convencional con granos de maíz y el otro, con la dieta de prueba con melaza y Biofermel. Los resultados de ese experimento se resumen en la tabla 3.

La dieta de Biofermel consistió en lo siguiente (20):

Mosto fermentado:	20%
Melaza de 85º Bx con 2% de urea:	80%

La pasta resultante fue mezclada en proporción 4:1, con rastrojo de maíz y ensilada durante 15 días antes de ser usada. El análisis porcentual mostró los siguientes resultados (g/100): 12 a 15 de Nitrógeno x 6.25; 0.5 a 1.0 de grasa; 61 a 62 de hidratos de carbono (solubles); 14 a 15 de fibra cruda; 11 a 12 de cenizas; y 23 a 25 de humedad. (Véase el diagrama del proceso en la figura 4).

Las características energéticas fueron: TND = 69.5, ED = 3.08 Mcal/Kg, EM = 2.53 Mcal/Kg, EN_T = 1.62 Mcal/Kg, NE_G = 1.15 Mcal/Kg, NE_L = 1.60 Mcal/Kg. (TND = Total de Nutrientes Digeribles; ED = Energía Digerible; EM = Energía Metabolizable; EN_T = Energía Neta Total; EN_G = Energía Neta para producción de Grasa; EN_L = Energía Neta para producción de Leche). Por lo tanto, el producto puede ser clasificado como un pienso concentrado en energía, útil para la producción intensiva de carne o leche.

El análisis microbiológico indicó la presencia de lactobacilos, en número de 10^6 a 10^9, unidades formadoras de colonias por kg y la presencia de 1 a 2% de ácido láctico. Este producto sólido, diluido al 10% (w/w) con saliva artificial produjo en 24 hrs a 40° C, cerca de 130 mmoles de ácido láctico por litro (12 g/L) y solamente 60 mM de AGV, principalmente acético.

Las dietas del experimento crucial, para probar la efectividad del proceso, fueron iso-calóricas e iso-nitrogenadas. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Indican que la dieta rica en Biofermel, pero enriquecida con 50 g de harina de semilla de algodón, produjo una ganancia diaria de 0.95 kg, y fue igual o mejor al de la dieta rica en granos (0.89 kg). Aunque los dos lotes de animales no presentaron diferencias estadísticas significativas, si tuvieron grandes diferencias en el costo de los alimentos, porque, la unidad energética de melaza es más barata que la unidad energética del maíz.

Tabla 3
PATRONES FERMENTATIVOS DEL RUMEN DE LOS ANIMALES ALIMENTADOS CON MAÍZ O BIOFERMEL*

Alimentación	*No. Animales*	*P = Acét./Prop.*	*R=Prop./But.*	*Ganancia diaria (kg)*
Maíz	10	3.91 ± 0.29	2.33 ± 0.30	0.951
Biofermel	7	4.14 ± 0.46	2.67 ± 0.94	0.890

* Datos de Álvarez *et al.* (1979).

Los patrones fermentativos del rumen de animales alimentados con ambas dietas fueron estadísticamente similares (tabla 3). También se demostró que las heces bovinas frescas o intemperizadas en el establo, servían igualmente como inóculo para producir el Biofermel (20, 21). Este resultado simplificó notablemente el manejo de las materias primas en la fábrica de Biofermel, porque no fue necesario recolectar heces frescas para mantener la calidad del producto.

Cabe hacer notar que el lote de animales alimentados con Biofermel inicialmente no ganó peso, pero que después de la adición de 50 g diarios, *per caput*, de harina de semilla de algodón, se comportó en forma muy similar al lote de animales alimentado con maíz. Esta observación sugiere que para corregir la intoxicación por melaza no es suficiente la corrección de las relaciones entre los AGV, para hacerlas similares con los patrones de fermentación de animales alimentados con maíz. Rowe y colaboradores (22) y Lora y colaboradores (23) observaron que la velocidad de asimilación de glucosa y la glucemia no estaban afectados en los animales intoxicados por melaza. Por lo anterior, sugirieron que pudiera haber factores vitamínicos (deficiencia de tiamina) que afectaran el consumo de la glucosa en el cerebro. Cualquiera que sea la explicación bioquímica de este trastorno metabólico, el proceso Biofermel, operado en un volumen industrial, resolvía ese problema, siempre que hubiese la citada suplementación de proteína en la dieta. A partir de la experiencia demostrativa de Álvarez y colaboradores (20) se desarrollaron engordas comerciales con esta alimentación en la Ganadería Pastejé, S. de R. L. (Ixtlahuaca, Edo. de Méx.). Éstas duraron más de diez años y siempre con resultados satisfactorios, y claramente diferentes a los problemas iniciales tenidos en Tecámac y Mexicali, los cuales motivaron esta invención.

Como resultado de esa experiencia piloto en Ganadería Pastejé S. de R. L., se celebró un convenio entre esa empresa y la UNAM, en el cual se licenció la tecnología con pagos de regalía a la UNAM por el uso de la invención. Se estableció una fábrica para alimentar a casi mil novillos y se creó un centro experimental, junto a la fábrica situada en Ixtlahuaca, para mejorar y vigilar la calidad del proceso. De esa forma, los investigadores de la UNAM, con la supervisión del José Pablo Pérez-Gavilán, formaron un equipo de investigación *in situ*, que después dio lugar a la creación de un Centro de Capacitación de Técnicos Agropecuarios, adscritos al Colegio de Ciencias y Humanidades de la UNAM.

El proceso Biofermel fue explotado comercialmente en Pastejé hasta la muerte del señor Eugenio Peralta, quien era la persona más interesada

en el desarrollo tecnológico de esa ganadería. Después se revirtió el proceso hacia una ganadería convencional alimentada con pastizales y grano, como lo había sido anteriormente. Sin embargo, este proceso permitió que esta empresa pudiera sortear bien las inclemencias climáticas cuando había escasez de grano o de pastos, o cuando hubo errores técnicos en el proceso de ensilaje de los pastos. Además, también se demostró que mientras la melaza mantuviese un precio más bajo por unidad de energía que los granos de cereales, este proceso era adecuado para la engorda industrial de ganado bovino de alto rendimiento.

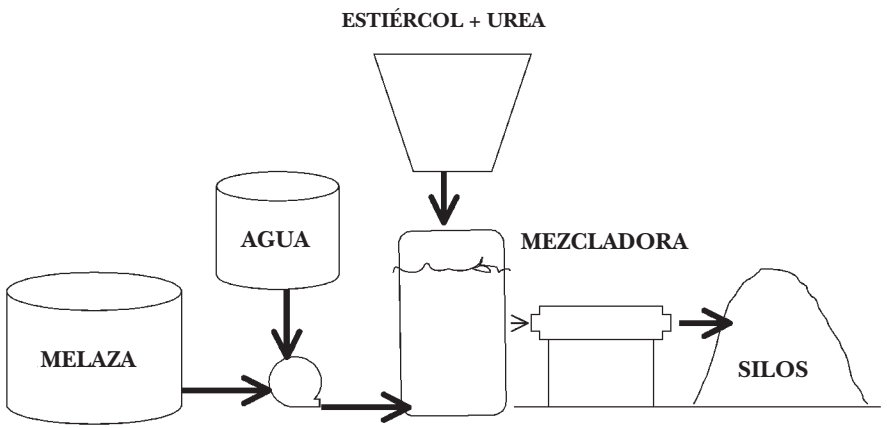


Figura 3

DIAGRAMA DE BLOQUES DEL PROCESO BIOFERMEL

La melaza se diluye con agua de 80 Bx a menos de 20 Bx y se mezcla, mediante recirculación con una bomba, con urea y estiércol. El rompimiento microbiano de la urea, produce amoníaco y bióxido de carbono, que amortiguan la producción de ácido láctico por las bacterias del estiércol. Por selección natural ($4 < pH < 7$) predominan las bacterias lácticas. Al final de la fermentación, se mezcla el mosto fermentado, con más melaza y rastrojo, para que madure lentamente (2 a 4 semanas) en silos, trincheras o sacos de plástico. El producto final se suministra, complementado con un poco de grano o de concentrado rico en proteína.

Desarrollo comercial del proceso Biofermel

Los buenos resultados obtenidos en Ganadería Pastejé, llevaron al grupo del Instituto de Investigaciones Biomédicas dirigido desde 1977 por Pérez-Gavilán a promover una mayor difusión de la tecnología, con

la asesoría del doctor José Luis Solleiro del Centro de Innovación Tecnológica de la UNAM. El primer caso de esta nueva etapa fue la formación en 1983 de una empresa llamada El Novillo, situada en Cotija, Michoacán, y propiedad de uno de los co-inventores del proceso: Rubén Álvarez Barajas. Esta empresa ha funcionado por más de 10 años con la licencia de este proceso y con nuevos desarrollos orientados al uso de la caña de azúcar como materia prima sustitutiva de la melaza (Álvarez Barajas, comunicación personal).

Más adelante, se negoció una transferencia de tecnología con el ingenio azucarero Cantarranas del Departamento de Morazán, en la República de Honduras. Esta negociación involucró la celebración de un convenio firmado por el Rector de la UNAM, y fue una primicia de la exportación de conocimiento biotecnológico en el área ganadera (24).

Además de esos convenios, se celebró otro con una cooperativa de Acámbaro, Gto., y uno más con la Sociedad Cooperativa Sinaloíta, de Culiacán, Sin. Todas ellas siguiendo el mismo modelo del proceso desarrollado en Pastejé (Pérez-Gavilán, comunicación personal 2002).

Para principios de los años noventa, se producían cerca de 45 000 toneladas de melaza fermentada con esta tecnología en las diversas empresas antes mencionadas (Pérez-Gavilán, www.biomedicas.unam.mx).

Si se toma en cuenta la escasa producción de innovaciones registradas en México a nombre de mexicanos, este proceso resultó un éxito importante, porque a fines de 1980 no se había registrado una sola innovación biotecnológica que se licenciara a más empresas que Biofermel. Sin embargo, si se toman en cuenta las magnitudes de las necesidades de la ganadería nacional, el resultado fue muy modesto, pues abarcó menos de 10% del mercado potencial de la melaza usada en México en la ganadería. Veinte años después de su implementación, el proceso ha dejado de ser una tecnología importante, por los cambios que ha sufrido la economía agropecuaria. Principalmente, por las serias dificultades que tienen los engordadores de ganado bovino para comprar melaza a precios bajos, como lo indica un artículo publicado en Internet en el que se denuncian las prácticas monopólicas de los ingenios, las cuales dificultan la colocación en México de cerca de 330 mil toneladas excedentes, porque se mantiene en forma artificialmente alta a los precios de esa materia prima en nuestro país.

Si se analiza en forma amplia el mercado de la melaza y los alimentos balanceados, se puede estimar que esta materia prima puede formar

parte de los ingredientes para sustituir parcialmente a los granos de maíz en la engorda de bovinos (18). Tomando como base la disponibilidad potencial de un millón de toneladas de melaza y usando la relación 3:1 (melaza: rastrojo), derivada de esta experiencia, se tendría un volumen potencial de 1.3 millones de toneladas de alimento para engordar novillos 90 días de 350 a 450 kg. Por lo tanto, se tiene un potencial comercial para engordar a más de un millón de novillos durante la época seca que es aproximadamente del orden de 20% del consumo de carne del país, producido precisamente en el trimestre en el que hay más escasez de pasturas y cuando se usan en forma más intensa los piensos concentrados ricos en granos de cereales. Según se indicó al principio de este artículo, el precio actual del maíz en EUA, es de aproximadamente 90 dólares por tonelada métrica. Se trata, por tanto, de sustituir cerca de 90 millones de dólares de importaciones, con un precio menor a 75 millones de dólares de melaza, a precios del mercado de Nueva Orleans, con la diferencia que el valor agregado de la engorda de ganado y de su venta y transformación en cortes de carne, representa un mercado entre 7 y 10 mil millones de pesos, habida cuenta de que un novillo rinde 40% de su peso en carne y que la carne alcanza el precio de 40 a 60 pesos por kg.

Sin embargo, el obstáculo más importante que se ha tenido para la difusión de este tipo de tecnologías es la ausencia de una estrategia integrada por el gobierno federal para la negociación conjunta de las importaciones y exportaciones del sector primario, la cual debería tomar en cuenta las conversiones que se tienen entre los productos y los subproductos, en este caso, entre los granos de cereal, el azúcar, la melaza, las pajas y los rastrojos. Esta carencia estratégica de la economía mexicana es evidente por las grandes deficiencias que se tienen para asociar las importaciones de granos con las exportaciones de los derivados de la industria azucarera y de la agricultura tradicional. Más aún, esta vulnerabilidad nacional se acentuará conforme se desarrollen más procesos de bio-conversión de los azúcares en productos de alto valor agregado, y al mismo tiempo se mantenga el rezago tecnológico de nuestro país. Idealmente, el destino de la melaza y de los forrajes bastos (rastrojos, pajas y bagazo de caña) deberían ser, en una elevada proporción, para la alimentación de los rumiantes. Así se compensarían las deficiencias estacionales de nuestra agricultura y ganadería, que tiene periodos acentuados de lluvia y sequía. Ésta sería la adaptación nacional de la tecnología tradicional europea de guardar forrajes y concentrados para alimen-

tar el ganado en el invierno. Sin embargo, en la práctica, la engorda de ganado y el uso pecuario de la melaza han tenido grandes fluctuaciones, por lo errático de la estrategia gubernamental para fomentar el desarrollo del sector.

Oportunidades futuras para otras fermentaciones ganaderas

El proceso Biofermel inició el interés de diversos investigadores latinoamericanos para estudiar las fermentaciones llamadas "ensilajes", por las cuales se pueden conservar muchos productos que se usarán en la alimentación de los bovinos, pero que no sería rentable secarlos ni cocerlos.

Así se han desarrollado procesos de fermentación láctica de los residuos domésticos (15), del camarón (25), la caña de azúcar fresca (26) y de muchas otras materias más (27).

Sin embargo, el aspecto más interesante por desarrollarse es el estudio fundamental de la ecología microbiana usando las técnicas de marcaje del DNA. Por ejemplo, el uso de sondas específicas para detectar y cuantificar bacterias de ciertos grupos o con ciertos genes, para correlacionar su presencia con el proceso de adaptación alimentaria de los rumiantes. Las figuras 1 y 2 muestran un esquema bioquímico, pero se carece de un mapa ecológico de la participación de los microorganismos en cada una de las vías metabólicas, principalmente porque ha sido imposible cultivar, en forma controlada y aislada, la gran mayoría de los microorganismos ruminales que forman parte de un gran consorcio en el rumen. Sin embargo, la biología molecular ofrece técnicas para detectar la presencia de organismos, sin necesidad de aislarlos ni cultivarlos.

Es probable que las reglas de composición de la microbiota del rumen sean similares a las de composición de las comunidades biológicas macroscópicas. Por ejemplo, los organismos sacarolíticos y los celulolíticos serían transformadores primarios que producirían ácidos acético, láctico y etanol, y serían los transformadores secundarios y terciarios los que convertirían esos compuestos en ácidos propiónico, butírico, bióxido de carbono y metano. Sin embargo, esa división bioquímica implica cierto grado de especialización funcional y genética. En un sistema complejo y estable, deberán de ocurrir multitud de fenómenos de selección natural y de complementación ecológica que faciliten la emergencia de especialistas en cada etapa del proceso. Es muy posible que el uso de esas

nuevas técnicas permitirá formular nuevas ideas para optimizar y orientar la fermentación ruminal hacia productos cada vez más ventajosos como los ácidos acético y propiónico y muchos factores vitamínicos de importancia para la nutrición animal.

Reflexiones sobre la estrategia de innovación y transferencia de la tecnología

La experiencia de investigación y promoción del proceso Biofermel, ayuda a reflexionar sobre la estrategia de innovación y transferencia de tecnología. Para que el conocimiento científico tenga un efecto positivo en nuestra economía, no es suficiente que se produzcan invenciones, que éstas se demuestren a escala industrial y que estén orientadas a resolver necesidades importantes de nuestro mercado. Se requiere, además, que el país cuente con una estrategia comercial e industrial que favorezca y requiera el desarrollo de dichas invenciones. Pero, infelizmente, desde hace muchos años, México carece de dicha estrategia.

El ejemplo del Biofermel muestra que estas relaciones óptimas no se pueden dar en forma independiente, pues se requiere de procesos de carácter asociativo que no se dan en los mercados completamente libres y desregulados. Por ejemplo, el uso óptimo de la melaza, los granos y los forrajes en la ganadería no se puede dar sin que existan instituciones de fomento y apoyo financiero para que se construyan las cadenas de suministro de insumos, tecnología e infraestructura.

Este tipo de problemáticas complejas han sido revisado con cuidado por analistas de las economías asiáticas (28, 29) y se le ha llamado las deficiencias de los mercados inmaduros. Aparentemente el mecanismo óptimo de la llamada "mano invisible" propuesta por Adam Smith no funciona en un vacío institucional. Según Ashton (30), para que la Revolución Industrial funcionara eficientemente en Inglaterra y Escocia, a principios del siglo XIX, se requirieron los siguientes factores:

a) Un mercado financiero con bajas tasas de interés y perspectivas de lago plazo.

b) Una infraestructura adecuada de comunicaciones y transportes.

c) La existencia de un mercado pujante que requiriese un aumento de la productividad. Por ejemplo: la demanda mundial de telas y tejidos.

d) La existencia de inventores y asesores científicos de calidad. Por ejemplo: los inventores de máquinas y herramientas que utilizaron los conocimientos básicos de las universidades e institutos de Glasgow, Edimburgo y Manchester.

e) Las ventajas estratégicas de un país o una región que pudiesen aprovechar esas innovaciones. Por ejemplo, la posición ventajosa de Inglaterra en el mercado textil.

f) La reglamentación y apoyo gubernamental para que los inventores e inversionistas tuviesen certidumbre y estímulo para sus desarrollos.

En esta experiencia del Biofermel se dieron parte de esos requisitos, pero solamente en forma incipiente e incompleta. El resultado fue un desarrollo novedoso pero modesto, que veinte años después, perdió su impacto. Ojalá que las autoridades y empresarios tomen en cuenta esta experiencia para repensar una estrategia que permita lanzar nuevos productos y procesos biotecnológicos con mejores resultados para nuestra sociedad.

Bibliografía

1. Nova-González A., Peña-Castellanos L. *El mercado internacional del azúcar, edulcorantes, alcohol y melaza.* Cuba Siglo XXI. Economía *(http://www.nodo50.org/cubasigloXXI/economia)* (2002).
2. Verdura T., Zamora I. Cerebro cortical necrosis in beef cattle fed high levels of molasses in Cuba. *Rev. Cub. Cienc. Agri.* (English ed.) 4: 209 (1970).
3. Losada H., Preston T.R. Molasses toxicity and cerebro cortical necrosis. *Rev. Cub. Cienc. Agri.* (English ed.) 7: 169 (1973).
4. Preston T.R. Molasses as an energy source for cattle. *World Rev. Nutr. and Diet.* 17: 1 (1972).
5. Virtanen A.I., Milk production in cows in protein-free feed. *Science* 153: 1603 (1966).
6. Vázquez-Duhalt, R. *Termodinámica Biológica.* AGT Editor, México, D.F. (2002)
7. Stouthamer A.H., Bettenhausen C. Energy for growth and maintenance in continuous cultures and batch cultures of microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 301: 53 (1973).
8. Chalupa W., Baile C.A., McLaughlin C.L., Brand J.G. Effect of introduction of urea on feeding behavior of Holstein heifers. *J. Dairy Sci.* 62(8): 1278-1284 (1979).
9. Ferguson, J. D., Chalupa. W. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72: 746 (1989).

10. Kohn R.A., Boston R.C. The role of thermodynamics in controlling rumen metabolism. Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals (J.P. McNamara, J. France y D.E. Beever, eds). CAB International Publishing, pp. 11-24 (2000).
11. Pérez-Gavilán E.J.P., Viniegra-González G. Potencial del uso del estiércol en la alimentación de los bovinos. *Ciencia Veterinaria* (Compilado por E. Moreno Chan) Prensa Universitaria UNAM 1: 241-261 (1976).
12. Gaytán T., Zamora F., Shimada, A.S. 1977. Glycerol a protective agent against molasses intoxication in beef cattle. *Cub. J. Agr. Sci.* 11: 29-37 (1976).
13. Peschard E., Pacheco, V., Viniegra-González, G. 1979. Tecnología fermentativa del proceso Biofermel. *Rev. Soc. Mex. Química* 23(1): 28-32 (1976).
14. Gómez G., Viniegra G. Orientation of Sugar fermentation inoculated with heterogeneous microbial population from cow-dung. *Advances in Biotech.* 2: 627-632 (1981).
15. Saucedo-Castañeda G., González-B. P., Revah-M. S., Viniegra-G. G., Raimbault M. The effect of lactobacilli inoculation on cassava silage: fermentation pattern and kinetic analysis. *J. Sci. Food Agric.* 50: 467-477 (1990).
16. Cervantes-Ruiz J., Fernández-Linares L.C., Saucedo-Castañeda G., Viniegra-González, G. Producción de inoculantes de lactobacilos para ensilaje. *Tec. Aliment.* (Méx.) 26(1): 14-22 (1991).
17. Pérez-Gavilán E.J.P., Cardoso M., Viniegra-González G. Ecological constraints of anaerobic fermentation of cane molasses with rumen inocula. *Cuban J. Agriculture Science* 10: 63-68 (1976).
18. Viniegra G., Ramírez G., Munguía A. Animal production with organic residues. *Industry and Environment* 3(1): 11-14 (1980).
19. Viniegra G., Gómez J. Lactic acid production by pure and mixed bacterial cultures. *Bioconversions* (compilado por D. Wise) pp. 17-39. CRC Press, Boca Ratón Florida, EUA (1984).
20. Álvarez R., Pacheco V., Pouso I., Pérez-Gavilán E.J.P., Viniegra-González G. Sustitución de maíz por Biofermel (melaza/estiércol fermentados) en dietas de bovinos, *Rev. Cubana Ciencia Agrícola* 13: 83 (1979).
21. Pérez-Gavilán E.J.P. *www.biomedicas.unam.mx.*
22. Rowe J.B., Bobadilla M., Fernandez A., Encarnación J.C., Preston T.R. Molasses toxicity in cattle: rumen fermentation and blood glucose entry rates associated with this condition. *Trop. Anim. Prod.* 4: 1 (1977).
23. Lora J., Ravelo G., Minor S., Preston T.R., Leng R.A. Glucose metabolism in cattle on malasses based diets: studies on molasses toxicity. *Trop. Anim. Prod.* 3: 1 (1977).
24. Solleiro J.L., Almanza, S., González, R.L. Industrias Técnico Agropecuarias El Novillo (ITANSA). *IICA Estrategias empresariales en agrobiotecnología* 21 Estudios de Caso. San José, Costa Rica, CA (editado por R. Jaffé) (1993).

25. Cira L.A., Huerta S., Hall G.M., Shirai K. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochem.* 37: 1359-1366 (2002).
26. Ali D.A., Samaroo N., Shah L.A. *Sugarcane fish silage fermentation.* United Nations Industrial Development Organ., Vienna (Austria) UNIDO/ID/WG. 431/13, V-85-24794 (1985).
27. Preston T., Viniegra-González, G. Producción de carne y leche. *Ciencia y Desarrollo* 1(8): 12-21 (1976).
28. Amsden A.H. *Asia's next giant. South Korea and late industrialization.* Oxford University Press. New York, USA (1989).
29. Aoki M., Kim H.-K., Okuno-Fujiwara M. *The role of government in East Asian economic development.* Clarendon Press, Oxford. U.K. (1996).
30. Ashton T.S. *La Revolución Industrial.* Fondo de Cultura Económica. México, D.F. (1950).

UNA EXPERIENCIA EN EL DESARROLLO DE TECNOLOGÍA BIOLÓGICA PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

A. Noyola Robles

Introducción

Entre los campos de aplicación de la biotecnología para la satisfacción de las necesidades humanas, el medio ambiente tiene la particularidad de presentar un potencial inmediato en México. Esta característica se debe al evidente descuido con que hemos abordado, como sociedad y gobierno, las acciones para el control de la contaminación ambiental. Es así que en forma sistemática se ha recurrido al "subsidio ecológico" proporcionado por la naturaleza, con el consecuente deterioro de los recursos naturales y de nuestro entorno, alcanzando niveles alarmantes en muchos casos.

Ante tal situación, la biotecnología ambiental puede proporcionar diversos procesos para controlar la contaminación por residuos (líquidos, sólidos o gaseosos) o bien recuperar sitios contaminados, que respondan a los requerimientos de economía y confiabilidad, además de cumplir con criterios de sustentabilidad, ya que se trata de una herramienta proporcionada por la naturaleza.

La aplicación de la vía biotecnológica para el control de la contaminación ambiental y el aprovechamiento de los recursos naturales en el contexto mexicano ya se ha presentado en detalle (1). En esta contribución se desarrolla el tema del tratamiento de aguas por medios biotecnológicos y se presenta una breve descripción de la situación actual del país en materia de infraestructura de tratamiento de aguas residuales, con objeto de sentar las bases para la presentación de un caso exitoso de desarrollo y transferencia de una tecnología nacional.

El agua, al ser utilizada, incorpora diversas sustancias en forma suspendida, coloidal o disuelta que contaminan y degradan su calidad o pureza. Un agua contaminada necesariamente tendrá restricciones en cuanto a sus posibles usos y podrá implicar riesgos a la salud y cambios en el equilibrio ecológico del cuerpo receptor. Por ello, es necesario eliminar, por medio de un proceso de tratamiento, las sustancias que la contaminan y la hacen inadecuada para su descarga en el ambiente o para su reuso.

Para el tratamiento de aguas residuales o contaminadas existen diversos procesos y operaciones unitarios que con una adecuada selección y combinación, pueden resolver la mayoría de las necesidades de disposición final o reaprovechamiento. En términos muy generales, existen procesos fisicoquímicos y procesos biológicos. Los primeros hacen uso de las diferencias en ciertas propiedades entre el contaminante y el agua (operaciones de sedimentación y flotación, por ejemplo) o —mediante la adición de reactivos— cambian la forma del contaminante a una más fácil de separar del agua, o bien inofensiva. Por su parte, los segundos utilizan microorganismos que se alimentan de la materia orgánica contaminante y con ello, la eliminan del agua en forma de nuevas células o de gases, que pueden separarse más fácilmente del agua en tratamiento. Se puede considerar que las reacciones bioquímicas que se llevan a cabo en estos procesos son las mismas que se realizan en el medio natural (río, lago, suelo, etc.), sólo que en forma controlada dentro de tanques o reactores y a velocidades de reacciones mayores.

Por cuestiones técnicas y económicas, los procesos fisicoquímicos se aplican predominantemente en el tratamiento de aguas con contaminantes inorgánicos, materia orgánica no biodegradable o compuestos tóxicos para los microorganismos. Por su parte, los procesos biológicos se emplean cuando los principales contaminantes son orgánicos biodegradables, así como algunos aniones inorgánicos (nitratos, nitritos, sulfatos, sulfuros, fosfatos). De esta manera, salvo muy contadas excepciones, los desechos líquidos de la industria alimentaria, la agroindustria, algún tipo de petroquímica y farmacéutica, así como las aguas negras municipales, son tratados por vía biológica. El hecho de utilizar una herramienta disponible en la naturaleza —los microorganismos— hace que, técnica, económica y ecológicamente, los procesos biotecnológicos sean más adecuados para manejar este tipo de desechos.

La aplicación de procesos biológicos en el tratamiento de desechos orgánicos se remonta al siglo XIX, cuando sistemas rústicos como la fosa séptica comenzaron a ser utilizados para el control de la contaminación y de los riesgos sanitarios asociados. Posteriormente, en los inicios del siglo XX, nuevos procesos fueron desarrollados sobre bases puramente empíricas, como el sistema conocido de "lodos activados". Es hasta mediados del pasado siglo que las bases teóricas comenzaron a ser planteadas, al utilizarse los resultados de investigaciones sobre crecimiento bacteriano y fermentaciones. Hoy en día, el avance en el conocimiento de los fundamentos y en la aplicación de los procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos orgánicos es considerable. A ello ha contribuido el auge de la biotecnología en general y la necesidad de ejercer cada vez un control más estricto sobre los procesos de tratamiento, ante una legislación más severa sobre la descarga de efluentes contaminantes, ya sean municipales o industriales.

La biotecnología ambiental aplicada al tratamiento de agua cuenta con un número importante de procesos, que pueden clasificarse en dos grandes grupos: aerobios y anaerobios. Esto se traduce en sistemas muy diferentes entre sí, tanto en su microbiología, como en sus aplicaciones, su ingeniería y su control. En la figura 1 se clasifican los diversos procesos biológicos existentes en función de la presencia o ausencia del oxígeno disuelto, así como de la forma en que se encuentran los microorganismos en el reactor biológico. El medio aerobio tiene oxígeno disuelto y el medio anaerobio no lo tiene. Existe un estado anóxico entre los dos anteriores, que se define como aquel en donde no hay presencia de oxígeno molecular disuelto, pero sí en forma combinada como nitratos y nitritos. El medio anóxico se presenta cuando se lleva a cabo el proceso de la desnitrificación con fines de remoción de nitrógeno de las aguas residuales.

Dado que los organismos vivos y en particular los microorganismos son los responsables de llevar a cabo un proceso biológico, sus características metabólicas determinarán el tipo de aplicación, las mejorías y desventajas del proceso en cuestión. Las principales características, con relación al aspecto energético, se esquematizan en la figura 2. La energía contenida en la materia orgánica contaminante utilizada por los microorganismos, medida como demanda química de oxígeno (DQO) o como demanda bioquímica de oxígeno (DBO), es transformada en diversos productos, dependiendo del metabolismo aerobio o anaerobio de la célula. Es así que una bacteria anaerobia utilizará 10% de la ener-

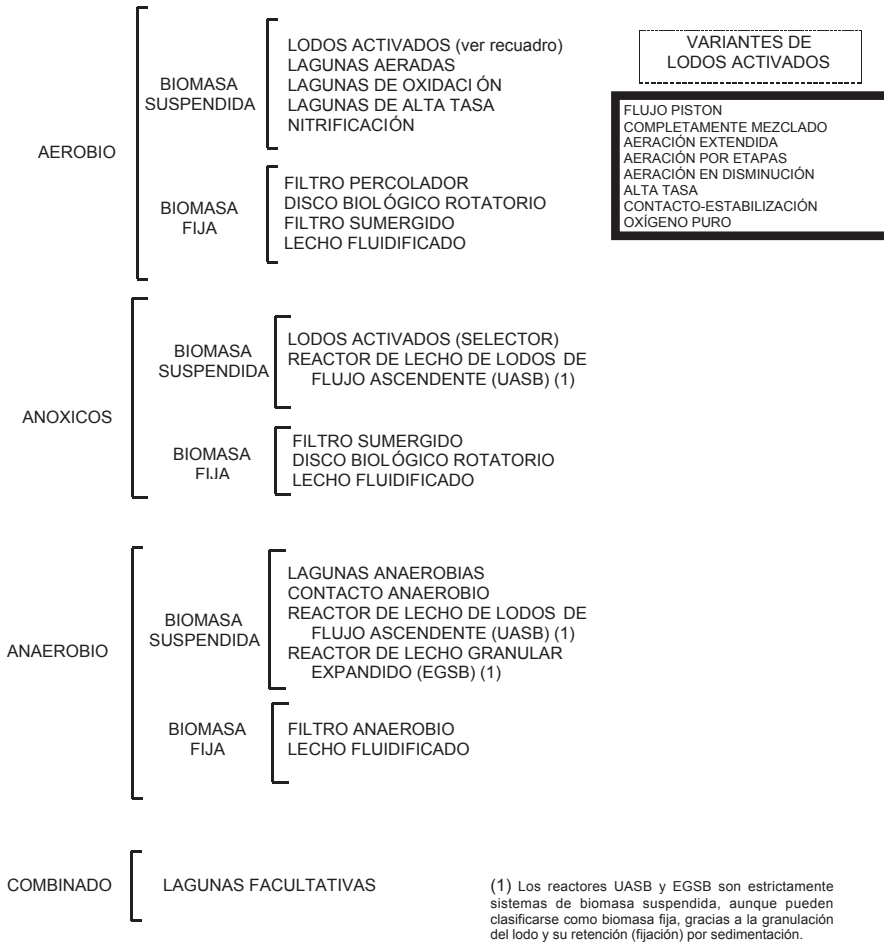


Figura 1
CLASIFICACIÓN DE LOS DIVERSOS PROCESOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN FUNCIÓN DE LA FORMA DE AGREGACIÓN DE LA BIOMASA (MICROORGANISMOS) Y DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE OXÍGENO EN EL MEDIO

gía contenida en su alimento o sustrato para funciones de reproducción, dando origen a nuevas células; el 90% restante la "perderá" en forma de gas metano. Por su parte, la bacteria aerobia empleará, en presencia de oxígeno, 65% de la energía del sustrato en la síntesis de nuevas células, mientras la fracción restante será utilizada para llevar a cabo ésas y otras funciones metabólicas y finalmente será disipada en forma de calor.

Las implicaciones ingenieriles son muy importantes. Por un lado, la vía anaerobia produce pocos lodos (células), mientras que la aerobia genera una cantidad aproximadamente cinco veces mayor, con los consecuentes costos de tratamiento y disposición de lodos de purga. Por otro lado, la energía contenida en el metano puede ser utilizada como energía calorífica directamente o transformada a mecánica o eléctrica según las necesidades existentes en el sitio. Otro punto es que el proceso aerobio requiere el suministro de oxígeno, lo que representa un costo energético importante. Es así que mientras el proceso anaerobio es un productor neto de energía, el proceso aerobio la consume. Esta tendencia se acentúa en los casos en que los lodos de purga de la planta aerobia son digeridos aeróbicamente, lo que implica un nuevo costo energético. Por lo tanto, se puede considerar la vía anaerobia como altamente eficiente en la conservación de energía, mientras que en la aerobia integral (agua y lodos) el dispendio energético es considerable.

Las características anteriores se manifiestan en forma más marcada cuando se aplican ambos tipos de procesos biológicos al tratamiento de aguas residuales concentradas en materia orgánica, como es el caso de la mayoría de los desechos de la industria alimentaria. Las cargas orgánicas que pueden recibir los reactores anaerobios fluctúan entre 10 y 20 kg_{DQO}/m^3d, mientras que en los aerobios son de 5 a 10 veces menores, en función de la variante aplicada. Esto significa que para un agua residual con elevada DQO (superior a 4 g/L), el volumen del reactor anaerobio será menor que el del reactor aerobio en esas mismas proporciones. Además, en tales condiciones, la cantidad de energía necesaria para transferir el oxígeno requerido por los microorganismos es muy grande; en contraste, el volumen de metano producido por el reactor es considerable. Sin duda, un análisis de costos de energía proporciona elementos suficientes para seleccionar el proceso anaerobio para tratar aguas residuales industriales de mediana y alta concentración de materia orgánica biodegradable.

Cabe mencionar las desventajas de los procesos anaerobios en relación con los aerobios. Los efluentes tratados por vía anaerobia pueden requerir un postratamiento, ya que conservan aún cierto contenido de materia orgánica y no tiene oxígeno disuelto. La necesidad de realizar el postratamiento estará determinada por las condiciones particulares de descarga que le hayan sido fijadas a la empresa o municipio. En la mayoría de los casos, el postratamiento será aerobio, dando por resultado un proceso combinado altamente eficiente en la remoción de los con-

taminantes, con cierto grado de autosuficiencia energética si se aprovecha el biogás y a costos de inversión, operación y mantenimiento menores que los de un proceso totalmente aerobio.

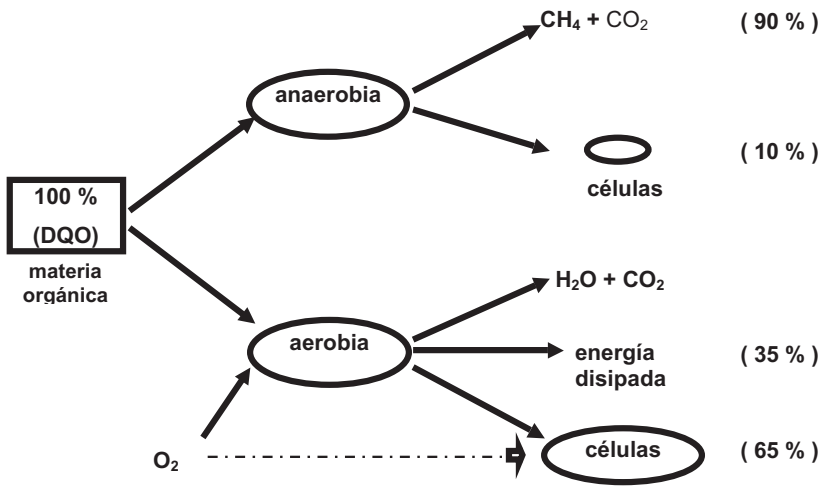


Figura 2
REPRESENTACIÓN DEL FLUJO DE ENERGÍA EN LOS PROCESOS BIOLÓGICOS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES
La energía proporcionada por el alimento (medida como demanda química de oxígeno, DQO) es transformada a nuevas células y subproductos en función del metabolismo anaerobio o aerobio de la célula.

Procesos anaerobios para el tratamiento de aguas residuales

Se conoce como digestión anaerobia a la transformación bacteriana, en ausencia de oxígeno, de residuos orgánicos, líquidos o semisólidos, a metano. Esta transformación se lleva a cabo mediante la hidrólisis y la conversión de sustancias de naturaleza orgánica en productos intermedios para llegar finalmente a la mezcla gaseosa llamada biogás, compuesta por metano y dióxido de carbono, principalmente. Ciertas características de la digestión anaerobia la hacen particularmente atractiva en el contexto actual, donde el uso eficiente de recursos y la necesidad de integrar mejor los flujos de materia y energía, son elementos importantes del llamado desarrollo sustentable (2).

Como se ha señalado, los procesos anaerobios tienen bajos requerimientos energéticos e inclusive pueden generar energía por medio del aprovechamiento del biogás, producen pocos lodos de purga y estabilizan la materia orgánica manteniendo los nutrimentos fertilizantes, lo que la transforma en un mejorador de suelos.

La digestión anaerobia se ha aplicado básicamente en el manejo de residuos orgánicos rurales (animales y agrícolas), lodos de purga de plantas de tratamiento de aguas residuales, y más recientemente, en el tratamiento de aguas residuales, tanto industriales como domésticas. Las tecnologías desarrolladas para cada aplicación son diferentes, pudiéndose agrupar en dos tipos: los reactores de baja y de alta tasa.

Los reactores de baja tasa se han aplicado desde hace más de un siglo. Son procesos rústicos generalmente sin agitación, con altos tiempos de retención hidráulica, operados en régimen semicontinuo o por lotes (*batch*). Se utilizan para tratar efluentes líquidos (fosa séptica, tanque imhoff, lagunas anaerobias) o lodos (digestores de lodos de purga, digestores rurales de estiércoles y residuos agrícolas). Dentro de los procesos anaerobios, estos últimos son los más utilizados en el mundo, en unidades pequeñas operadas en forma individual por los mismos generadores del residuo o desecho. Ni y Nyns (3) informan de la existencia de más de seis millones de digestores de desechos rurales en el mundo, donde China y la India tienen el liderazgo (4.7 y 1.2 millones, respectivamente). Estas instalaciones comúnmente se integran en un sistema de manejo y recuperación de residuos, lo que explica el éxito de su aplicación en esos países.

Por su parte, los reactores de alta tasa fueron desarrollados durante la década de 1970, pero sus aplicaciones industriales iniciaron realmente diez años más tarde. Son procesos más avanzados tecnológicamente, que incorporan el concepto de biomasa fija, ya sea sobre soportes inertes o mediante la formación de flóculos densos que se retienen por sedimentación. Su principal campo de aplicación han sido las aguas residuales de la industria alimentaria, aunque en algunos países de clima subtropical y tropical se ha iniciado su uso en aguas residuales municipales.

Las ventajas de la digestión anaerobia frente a procesos aerobios convencionales se hacen más claras conforme la concentración de materia orgánica aumenta, y las desventajas tradicionales han sido limitadas por los avances tecnológicos en estos reactores, hechos que explican su aplicación actual y crecimiento futuro. Hoy en día, la selección más adecuada para tratar un agua residual biodegradable mediana o altamente con-

centrada es la unión del proceso anaerobio seguido de un pulimento aerobio.

Los sistemas anaerobios han sido clasificados en tres generaciones. La primera, son los procesos de baja tasa, engloba aquellos caracterizados por tener la biomasa mayormente sedimentada y sin contacto con el agua residual en tratamiento —fosa séptica, tanque imhoff, laguna anaerobia— así como reactores más avanzados, con mezcla y biomasa en suspensión. El sistema conocido como contacto anaerobio —versión anaerobia de los lodos activados— constituye un proceso de transición entre la primera y segunda generaciones, al incorporar un reactor mezclado, un sedimentador y la recirculación de lodos. En los de segunda generación, los microorganismos son retenidos en el reactor por medio de una biopelícula adherida a un soporte (empaque), o bien, por medio de su sedimentación en forma de agregados (flóculos o granos) densos. En estos sistemas se ha separado el tiempo de retención hidráulica del celular y se ha mejorado considerablemente el sistema de distribución de agua en su interior. Por último, los reactores de tercera generación también poseen los microorganismos en biopelícula o grano compacto y denso, con la particularidad que el soporte se expande o fluidifica con altas velocidades de flujo. Los resultados más importantes obtenidos durante el desarrollo tecnológico a través de las generaciones de reactores son la disminución del tiempo de retención hidráulica de días a horas, la creación de instalaciones compactas así como el incremento de su estabilidad y de las eficiencias del tratamiento del agua residual a temperaturas por abajo de la óptima (35°C). Una representación esquemática de los reactores anaerobios se presenta en la figura 3.

A continuación se hace una breve descripción de los diferentes sistemas anaerobios existentes:

Fosa séptica y tanque Imhoff. La fosa séptica puede considerarse como un digestor convencional a escala reducida. Su uso se ha limitado a tratar las aguas de desecho de casas habitación, escuelas, etc. generalmente en zonas rurales en donde no existe el servicio de drenaje. Por su parte, el tanque Imhoff es un sistema un poco más elaborado y de mayor escala que el anterior, en donde se crean dos compartimientos distintos, el de decantación y el de digestión. Esto impide que el biogás formado en la cámara de digestión altere las condiciones hidráulicas de la cámara de decantación, logrando de esta forma un incremento en la eficiencia de operación. En ambos sistemas, el tratamiento del agua se limita a la hidrólisis de la materia orgánica en suspensión y a la digestión del lodo (4).

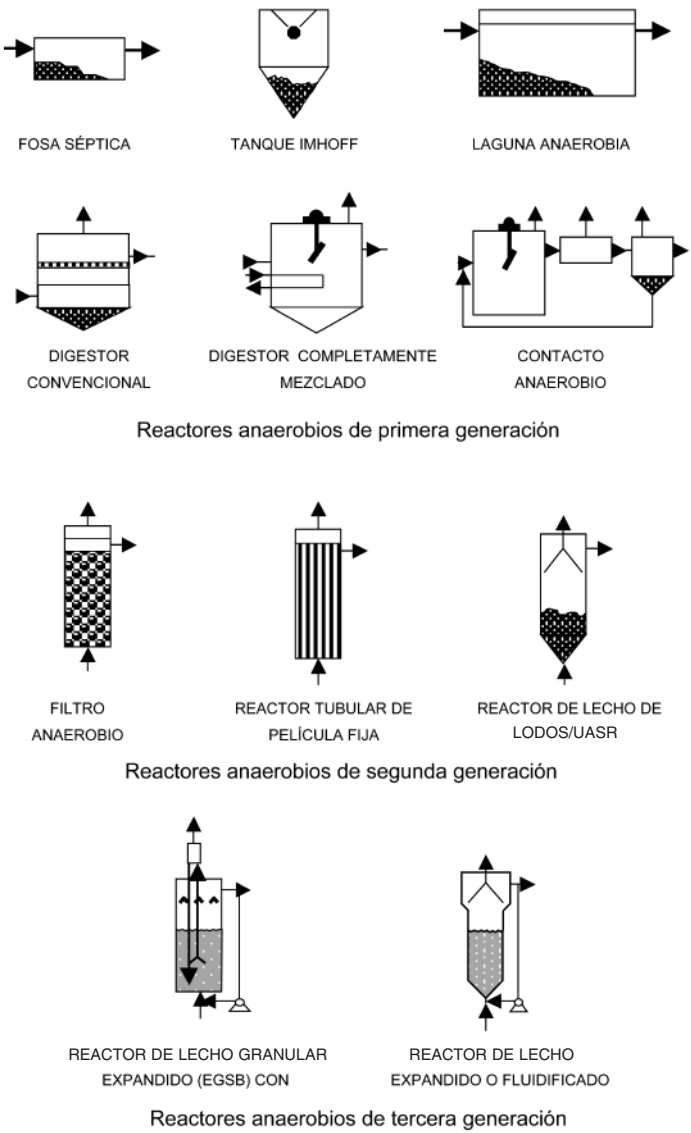


Figura 3
ESQUEMAS DE LOS PRINCIPALES REACTORES ANAEROBIOS CLASIFICADOS EN FUNCIÓN DE LA GENERACIÓN DE TECNOLOGÍAS

Los reactores Contacto Anaerobio y Lecho Granular Expandido (EGSB) deben considerarse como tecnologías de transición. El primero entre la primera y segunda generaciones y el segundo, entre la segunda y tercera generaciones.

Lagunas anaerobias. Este es otro proceso rústico empleado en aguas de desecho industriales evacuadas a temperatura mayor a la del ambiente y con cierto contenido de sólidos suspendidos sedimentables. Consiste en tanques profundos (hasta 10 m) en donde las condiciones anaerobias prevalecen. Un punto particularmente problemático son los malos olores asociados con estos sistemas. Los tiempos de retención hidráulica reportados en la literatura son muy variables, en general mayores a siete días. Las lagunas anaerobias también se utilizan para tratar aguas residuales municipales, como primer elemento de dos o tres lagunas en serie (5).

Digestor anaerobio convencional. Este sistema se ha aplicado principalmente para la estabilización de estiércoles y de los lodos de desecho provenientes del proceso de lodos activados. Consiste de un tanque cerrado sin agitación y sin calentamiento, en donde el desecho a tratar se estratifica en zonas definidas. La zona microbiana activa ocupa cerca de 30% del volumen total del tanque. Posee tiempos de retención hidráulica mayores a 30 días (5).

Digestor anaerobio mezclado. La adición de mezclado y calentamiento, utilizando el biogás producido durante el proceso, da lugar al digestor de lodos con mezcla completa, también llamado de alta tasa. Estos sistemas se utilizan para digerir los lodos de purga de plantas de tratamiento de aguas residuales. Los tiempos de residencia son del orden de 12 a 20 días, operados comúnmente a 35ºC, aunque ya existen sistemas que trabajan en nivel termofílico (55ºC). La figura 4 presenta una instalación de digestores de este tipo, con forma de huevo, la última tecnología en estos sistemas, que favorece el mezclado y evita problemas de azolves en el interior del digestor.

Reactor de contacto anaerobio. Consiste básicamente en un reactor completamente mezclado acoplado a un decantador que separa la biomasa para que sea recirculada al reactor. Es el equivalente anaerobio de los lodos activados. El punto problemático en este sistema lo constituye la separación de los lodos anaerobios en el decantador, pues tienen tendencia a flotar, debido a las burbujas de biogás atrapadas en el flóculo. Esto se puede solucionar colocando un sistema de desgasificación entre el reactor y el decantador. Los tiempos de retención hidráulicos son del orden de cinco días y el tiempo de residencia celular varía entre 15 y 30 días. Este sistema se ha aplicado en el tratamiento de aguas residuales concentradas y con sólidos en suspensión (6).

Filtro anaerobio. Este sistema consiste en un reactor de flujo ascendente o descendente empacado con soportes plásticos o piedras de tres

Figura 4

DIGESTORES DE LODOS DE PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES MUNICIPALES

Los tanques están mezclados y calentados a 35°C por medio del biogás producido. La forma de huevo favorece el mezclado y reduce el mantenimiento al evitar azolves en el fondo del tanque. Al frente, el quemador de exceso de biogás.

a cinco cm de diámetro promedio. La biomasa se desarrolla en forma de biopelícula adherida al soporte, además de retenerse en los intersticios del empaque. Con este arreglo, se aumenta en forma importante el tiempo de retención celular (TRC) sobre el tiempo de retención hidráulica (TRH) lo que hace posible operar el sistema con reducidos TRH y volúmenes de reactor limitados, conservando buenas eficiencias en la remoción de materia orgánica, además de una mayor estabilidad en su operación. El coeficiente de vacío del material de empaque debe ser grande para evitar el taponamiento, lo que en caso de utilizar piedra, se traduce en un área específica inferior a 100 m^2/m^3. Este sistema puede soportar en la práctica cargas hasta 15 kg DQO/m^3d (7). La figura 5 presenta una instalación de un filtro anaerobio de flujo descendente en una industria química.

Figura 5
FILTRO ANAEROBIO DE FLUJO DESCENDENTE INSTALADO
EN UNA INDUSTRIA DE PRODUCTOS QUÍMICOS

Reactor anaerobio de lecho de lodos con flujo ascendente. El reactor anaerobio de lecho de lodos UASB *(upflow anaerobic sludge blanket)* está constituido por una cama de lodos (biomasa anaerobia granular) localizada en el fondo del reactor con un volumen aproximado de 1/4 a 1/3 del volumen total de éste. La particularidad de un reactor UASB radica en el hecho de retener dentro del reactor los microorganismos en forma de partículas o agregados densos, ya sea como granos o flóculos. Con esto, se "fija" la biomasa dentro del reactor y se logran las ventajas mencionadas arriba, pero con el ahorro que representa el no requerir medio de empaque.

El reactor anaerobio de lecho de lodos al tener flujo ascendente permite una selección de microorganismos, y favorece la formación de un lodo con buenas propiedades de floculación y sedimentación, que da como resultado una cama de lodos en la parte inferior del reactor; a este fenómeno se le conoce como granulación. En el reactor UASB se procura eliminar las necesidades de agitación mecánica y la formación de zonas muertas y cortos circuitos hidráulicos mediante una adecuada distribución de las entradas de agua en la base del reactor. Por otro lado, posee en la

parte superior un colector de gas que asegura una buena separación líquido-gas sólido. La zona ubicada entre la cama de lodos y las campanas colectoras de biogás se denomina lecho de lodos o zona de expansión de lodo. En ella se aloja el lodo expandido por la acción del biogás.

El aspecto fundamental del proceso UASB lo constituyen los lodos granulares, necesarios para un correcto funcionamiento. Al arrancar un reactor UASB, lo ideal es inocularlo con un volumen suficiente de este tipo de material. En ciertos casos, un arranque sin inóculo es también posible desarrollarlo dada la capacidad de algunas aguas residuales, pero el tiempo para alcanzar los niveles de operación deseados sería alrededor de seis meses. Un reactor de UASB puede recibir cargas orgánicas hasta 15 kg_{DQO}/m^3d (8). Un reactor de este tipo se presenta en la figura 6.

Reactor de lecho granular expandido (EGSB). Este reactor puede considerarse una evolución a partir del reactor UASB, y se encuentra entre este último y los reactores de lecho fluidificado. El concepto EGSB (*expanded granular sludge bed*) aprovecha las características únicas del grano anaero-

Figura 6

REACTOR ANAEROBIO DE LECHO DE LODOS (UASB)
EN UNA INDUSTRIA CERVECERA

En primer plano, el tanque de homogeneización, elemento de proceso previo al reactor anaerobio, en segundo plano.

bio, en lo que respecta a sus altas sedimentabilidad y actividad metanogénica, para llegar a un reactor esbelto (8 a 16 m) y compacto, capaz de tratar altas cargas orgánicas. Su principio se basa en la expansión del lecho de lodos granular, por medio de un flujo de recirculación y la propia ascensión del biogás. La velocidad ascendente en estos reactores varía entre 5 y 15 m/h, en función de la carga orgánica aplicada, lo que provoca una expansión de la cama del orden de 50% a 100% de su volumen sin expandir. La producción de gas por unidad de superficie del reactor (flux) contribuye en forma importante a esta expansión, pudiendo ser una limitante del sistema en caso de aplicársele altas cargas orgánicas. Este tipo de reactor puede alcanzar los 25 kg DQO/m^3d como carga orgánica (9).

Reactores de lecho expandido o fluidificado. Estos reactores se encuentran en la fase inicial de su aplicación comercial. Son también reactores de película fija pero el soporte utilizado es lo suficientemente pequeño y ligero para que pueda ser fluidificado con una recirculación del efluente. Los dos tipos de reactores, el reactor de lecho expandido y el reactor de lecho fluidificado, son semejantes entre sí, diferenciándose en el grado de expansión del soporte (20% para el lecho expandido, superior a 50% para el lecho fluidificado). Su avance consiste en tiempos de retención aún menores, inferiores a doce horas, ya que la superficie de soporte disponible es muy elevada (superior a 200 m^2/m^3) y la agitación en el lecho es vigorosa, lo que reduce los problemas de transferencia de sustrato. Otra ventaja es que no presentan problemas de taponamiento. Sin embargo, requieren energía para la recirculación y la fluidización del lecho; además, su operación y arranque son en extremo delicados. Las cargas aplicadas pueden sobrepasar los 40 kg DQO/m^3d (10). Una instalación de dos lechos fluidificados en serie se presenta en la figura 7.

Infraestructura de tratamiento de aguas residuales en México

Durante varios lustros, el país ha soportado la degradación de sus cuerpos de agua, la deforestación de sus campos y montañas, la acumulación de desechos sólidos y gaseosos en sus centros urbanos, entre otros fenómenos propios de un crecimiento económico poco respetuoso de la naturaleza y de sus recursos. Es hasta años recientes, la década de 1990, que México ha enfrentado con mayor rigor los problemas relacionados con el control de la contaminación ambiental y la preservación del

Figura 7
LECHOS ANAEROBIOS FLUIDIFICADOS INSTALADOS EN SERIE
EN UNA INDUSTRIA PAPELERA

ambiente, mediante una política ambiental, cuya aplicación, sin embargo, ha estado sujeta al desempeño de la economía nacional.

En materia de control de la contaminación del agua, la infraestructura para el tratamiento de aguas residuales con que cuenta el país es muy limitada, gran parte está por construirse. Como cifras de referencia, la Comisión Nacional del Agua (11) estimó que la generación de aguas residuales de origen municipal en 2000 fue de 260 metros cúbicos por segundo, de los cuales se captaron por sistemas de drenaje 76.2% (200 m^3/s) y el resto (60 m^3/s) se evacuaron directamente al ambiente, en las inmediaciones de las zonas habitadas. En ese año se contaba con 1 018 plantas municipales de tratamiento con una capacidad total de 75.9 metros cúbicos por segundo (29% del total generado). Sin embargo, esta capacidad instalada no estaba toda en operación y durante ese año sólo se trataron 45.9 metros cúbicos por segundo (60% de la capacidad instalada y 18% del caudal total generado). En el sector industrial y para el mismo 2000, las cifras son del orden de 170 metros cúbicos por segundo como caudal total, con 1479 plantas de tratamiento construidas con

capacidad total de 41.5 metros cúbicos por segundo (24% del total). De éstas, 1 399 plantas se reportan en operación, con un caudal de 25.3 metros cúbicos por segundo (15% de la descarga total y 60% de la capacidad instalada) aunque sólo 504 plantas (8.7 m^3/s) cumplieron con la calidad de agua tratada requerida por la autoridad ambiental.

En este contexto de grandes rezagos, el país adoptó una nueva actitud al final de la década de los ochenta, en buena parte por la firma del Tratado de Libre Comercio de Norteamérica y por una mayor conciencia y participación de la sociedad civil, que condujo al gobierno a adoptar una voluntad política para hacer cumplir las leyes y reglamentos en materia ambiental, que habían sido en gran medida letra muerta.

Este cambio en la política ambiental, que se vio acompañado de nuevas regulaciones, abrió un mercado importante para la aplicación de tecnologías de control de la contaminación. Éste es el marco en el que el proyecto aquí descrito se llevó a cabo.

Desarrollo y transferencia de una tecnología anaerobia nacional

Entre las tecnologías anaerobias actualmente disponibles en el mercado, sin duda las basadas en el concepto de lecho de lodos granulares, desarrollado por Lettinga en Holanda en los años setenta, son las más aplicadas (8). El concepto UASB (*upflow anaerobic sludge blanket*) tiene ventajas sobre otras tecnologías anaerobias ya que no requiere medio de soporte (como el filtro anaerobio) y puede recibir altas cargas orgánicas (a diferencia del reactor de contacto anaerobio); es así que este concepto es el más difundido en Europa y América Latina, México incluido, en lo que a reactores anaerobios se refiere (12, 13, 14).

Si bien los procesos anaerobios para la digestión de lodos de plantas de tratamiento existen desde hace más de medio siglo, en México no se contaba con ninguna experiencia. El único digestor había sido construido en 1956 en una planta de lodos activados, pero nunca fue puesto en marcha.

Durante el año de 1986, un grupo de investigación se estableció en la Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa (UAM-I) con la colaboración estrecha de la agencia francesa de cooperación internacional (ORSTOM ahora IRD). Un año después, se incorporó a este esfuerzo el Instituto de Ingeniería de la UNAM, lo cual vino a sumar un valioso ele-

mento institucional de experiencia en materia de vinculación con el sector productivo y gubernamental.

Pese a que cada una de las instituciones de investigación involucradas (ORSTOM, UAM y UNAM) desarrollaron y mantienen la línea de trabajo sobre el tratamiento anaerobio de aguas residuales desde un principio, para 1988 el proyecto conducido en la UNAM adquirió una dinámica propia dirigida hacia la implantación de sistemas de tratamiento de aguas residuales, apoyándose en el modelo que esta Universidad venía impulsando alrededor del concepto de innovación tecnológica (15).

Como resultado de esta etapa de colaboración institucional, se obtuvieron dos patentes mexicanas y se transfirió la tecnología del reactor anaerobio a nueve empresas consultoras mexicanas. En este grupo, el Instituto de Ingeniería dedicó un mayor esfuerzo a la documentación y transferencia de la tecnología, con apoyo del entonces Centro para la Innovación Tecnológica (CIT) de la UNAM.

A grandes rasgos, las etapas iniciales del proyecto pueden marcarse como se señala a continuación (16):

1986-87	Integración del grupo de investigación (II-UNAM, UAM-I, ORSTOM).
1989	Solicitud patente reactor anaerobio (otorgado en 1994).
1990	Solicitud patente producción de lodos anaerobio para inóculo (otorgado en 1994).
1990	Primer contrato de transferencia de tecnología y construcción reactor a nivel de demostración (50 m^3).
1991	Convenio UNAM-UAM para la explotación de la tecnología por vías independientes.
1991	Segundo contrato de transferencia de tecnología.
1992	Primer reactor industrial (maltería, 2 400 m^3).
1992	Tercero y cuarto contratos de transferencia de tecnología
1993	Quinto y sexto contratos de transferencia de tecnología.
1993	Segundo y tercero reactores industriales (cervecería, 4 800 m^3 y frituras de maíz, 300 m^3).

A la fecha se han construido más de veinte plantas de tratamiento de aguas residuales de muy diversos tamaños, tanto de origen municipal como industrial; las más representativas se detallan en la tabla 1. Las fuentes de financiamiento que se han integrado a este desarrollo, además de las propias de las instituciones involucradas, han provenido de fondos de investigación de la Organización de Estados Americanos (OEA) en dos bienios, 1985-1988; de la Comunidad Económica Europea, 1989-

1990, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y en mucho menor medida de los usuarios reales o potenciales.

Es de mencionar que la aceptación de la tecnología anaerobia en México ha sido difícil, ya que existen prejuicios y reticencias, algunos de ellos infundados, otros superados, pero que en un medio tradicional y poco innovador, como el de la ingeniería sanitaria mexicana, pesan aún mucho. En este contexto, para desarrollar una tecnología anaerobia nacional con credibilidad, había que enfrentar problemas técnicos pero también de percepción e ignorancia por parte del usuario potencial, labor en la que contribuyeron las empresas licenciatarias al darle el apoyo de promoción y venta necesario.

Las compañías licenciatarias de la tecnología universitaria son, con excepción de una, muy pequeñas y de reciente creación. Para ellas, la tecnología anaerobia nacional constituye un producto diferente, relativamente nuevo en el mercado nacional, en donde la competencia directa es tecnología extranjera de costo mayor. Este hecho les permite situarse en el mercado ambiental mexicano, lo que con tecnologías convencionales difícilmente lograrían, dada la existencia de compañías nacionales con años de experiencia en el campo del tratamiento de aguas. En contraste, las empresas grandes de ingeniería y construcción no se interesaron por la tecnología, a pesar de la promoción que realizó el grupo de investigación. Por lo general, estas empresas obtienen acuerdos de asistencia técnica y tecnológica con firmas de ingeniería y fabricantes de equipo del extranjero.

En el mismo sentido, la política de vinculación de la UNAM ha sido aprovechada por el grupo de investigación para formar una empresa de base tecnológica llamada IBTech S. A. de C. V., mediante el programa que llevó a cabo el Sistema Incubador de Empresas Científicas y Tecnológicas (SIECyT-UNAM), ahora suspendido.

Debe señalarse, sin embargo, que la situación del mercado ambiental mexicano, muy poco consolidado y sujeto a vaivenes políticos y económicos, ha llevado a algunas de las empresas licenciatarias a cerrar o bien a redirigir su línea de negocio. Aunado a lo anterior, los primeros contratos de transferencia tecnológica ya han vencido o están por hacerlo, dada su duración de diez años.

Destacan como resultado de la gestión tecnológica que llevó a cabo el CIT-UNAM, el manejo de la propiedad industrial que condujo a la elaboración, trámite y concesión de las siguientes patentes mexicanas y derechos de autor:

Tabla 1
PLANTAS DE TRATAMIENTO REPRESENTATIVAS INSTALADAS
CON TECNOLOGÍA ANAEROBIA UNAM/UAM

Cliente/Lugar	*Agua Residual*	*Volumen Reactor (m3)*	*Caudal (m3/d)*	*Licenciataria*	*Año*
UAM-I/D.F.	Municipal	50	150	DescontaminAcción	1990
Central de Malta/Puebla	Maltería	2 400	3 800	IMASA	1992
Cervecería Cuauhtémoc/ Toluca (Fig. 6)	Cervecera	4 800	9 072	IMASA	1993
Barcel/Toluca	Producción botanas	300	600	Energía y Ecología	1993
Cervecería Cuauhtémoc-Navojoa (Fig. 8)	Cervecera	1 800	5 400	IMASA	1994
Liconsa/Edo. de México	Rehidratación de leche	170	345	TACSA	1994
Xcaret/Quintana Roo	Doméstica	50	150	ECORED	1996
Ricolino/SLP	Producción dulces	400	173	IBTech	1997
Quechultenango/Guerrero	Municipal	380	1 300	IBTech	1997
Tereftalatos Mexicanos/ Cosoleacaque Veracruz	Ácido Tereftálico	17 000 (Adaptación)	5 520	IBTech	1997
Compañía Cervecerías Unidas/Temuco, Chile (Fig. 9)	Cervecera	1 300	3 500	IBTech	1999
Cervecería Santa Fe/ Santa Fe, Argentina	Cervecera	1 300	4 000	IBTech	2000
Barcel/Laguna Coah.	Producción de botanas	300	520	IBTech	2001

Figura 8
REACTOR ANAEROBIO DE LECHO DE LODOS (UASB) DE TECNOLOGÍA NACIONAL INSTALADO EN PLANTA CERVECERA

Patente Mexicana Nº 172965 concedida en enero de 1994: *Reactor de flujo ascendente para el tratamiento de aguas residuales por vía anaerobia o anóxica* (17).

Patente Mexicana Nº 173685 concedida en marzo de 1994:

Tecnología relativa al proceso de producción de lodos inóculos para reactor UASB (18).

Registro de Derecho de Autor de tres programas de cómputo para el diseño y arranque de reactores UASB: 18635/92, 18636/92 y 18637/92.

Asimismo, se registraron las siguientes marcas: BIODAAR® del 19 junio 1991 BIOIMA® del 16 de diciembre 1992, y BIODAN® del 22 octubre 1992. Las marcas referidas fueron licenciadas con un carácter exclusivo en virtud de que, por definición, una marca distingue un producto o servicio de otros semejantes, es decir, constituye una identificación de la calidad de los servicios provistos por la empresa licenciataria en particular.

En fechas recientes, el grupo del Instituto de Ingeniería de la UNAM ha desarrollado y patentado adicionalmente a lo antes expuesto, las siguientes tecnologías o equipos:

Patente Mexicana Nº 199659, concedida en noviembre 2000: *Remoción biológica de materia orgánica y nitrógeno por medio de un sistema anaerobio-anóxico-aerobio en tanques separados* (19).

Patente Mexicana No. 988995, concedida en octubre 2000: *Microplanta de tratamiento de aguas residuales para pequeños flujos*. Esta patente también cuenta con los siguientes registros: Patente Americana No. US 6,210,578 B1, concedida en abril de 2001 y Patente Canadiense No. 2,287,998, concedida en abril 2000 (20).

Impacto del proyecto

El desarrollo de esta investigación en la universidad, orientada a la atención de la demanda de tecnologías para el control de la contaminación del agua, ha logrado ya productos tangibles y un prestigio en el ámbito nacional. Sin duda, parte del éxito se debió a un entorno favorable, que a su vez fue creado por la decisión gubernamental de aplicar las leyes y reglamentos ambientales.

En un plano comercial, el desarrollo de tecnología y oferta nacionales ha generado competencia entre los representantes de las compañías extranjeras (holandesas principalmente) y las firmas licenciatarias de la tecnología universitaria. Con ello, la oferta extranjera ha ajustado sus precios, frente a ofertas nacionales más económicas, lo que ha favorecido al cliente y ha roto condiciones de monopolio y dependencia extranjera. Merece mención especial el hecho de que la tecnología ya se ha aplicado en el extranjero (Chile y Argentina), situación que se logró como resultado de un contrato a partir de un concurso convocado por el cliente, en el cual intervinieron las principales empresas proveedoras de esta tecnología en el mundo.

En la práctica, el factor promotor de la legislación para fomentar un mercado de servicios tecnológicos ambientales ha tenido un comportamiento variable, que puede atribuirse a los vaivenes en el entorno económico. Esta situación ha llevando a las empresas del país a responder irregularmente a los requerimientos previstos en la legislación ambiental y posponer las inversiones en este rubro. Si bien el monto de la inversión para montar la infraestructura ambiental en las empresas fue positiva hacia fines de los ochenta y principios de los noventa, a partir de 1995 se vio severamente afectada por la devaluación del peso mexicano, repuntando ligeramente sólo hasta dos años después.

Figura 9
PLANTA DE TRATAMIENTO DE EFLUENTES EN UNA INDUSTRIA CERVECERA EN CHILE CON TECNOLOGÍA MEXICANA
El tanque de homogeneización se encuentra al frente y el reactor anaerobio en el lado derecho.

En resumen, los factores que favorecieron el relativamente rápido proceso de desarrollo, transferencia y aplicación industrial de la tecnología anaerobia presentada son los siguientes (13):

— Voluntad política para hacer cumplir las regulaciones ambientales.

— Mercado amplio, donde gran parte de la infraestructura de tratamiento de aguas residuales está por construirse.

— Capacidad de investigación y desarrollo de la tecnología en México.

— Firmas de ingeniería, nacionales y extranjeras, capaces de llevar exitosamente proyectos de tratamiento anaerobio.

—Políticas de licenciamiento sin exclusividad.

La demanda de plantas anaerobias deberá seguir creciendo en el corto y mediano plazos, por lo que se prevé un mercado competido pero suficientemente amplio para que toda firma de ingeniería competente, nacional o extranjera, logre ubicarse en él. A su vez, estas firmas y los usuarios requerirán apoyo técnico y personal capacitado para su diseño y operación, lo cual constituye otro campo de vinculación universitaria con la industria.

Conclusiones

La biotecnología enfocada al control de la contaminación ambiental tiene un amplio campo de aplicación futura, cuyo impacto será cada vez más grande e integrado al modelo sustentable de desarrollo. Sin embargo, la demanda en el mercado ambiental estará supeditada a la voluntad política de hacer cumplir las leyes en la materia.

El desarrollo tecnológico presentado ha sido factor importante en la aceptación de la tecnología anaerobia para el tratamiento de aguas en México y ha contribuido a una regulación de los precios de las ofertas extranjeras que proponen el mismo tipo de procesos.

En el mercado ambiental mexicano, los grupos universitarios de investigación tienen la oportunidad de jugar un papel importante, tanto en el apoyo técnico, el desarrollo y adaptación de tecnologías, como en la formación de recursos humanos capacitados en las nuevas aplicaciones. El caso presentado demuestra lo anterior y prevé nuevas experiencias exitosas en un medio de oportunidades como es este mercado.

La colaboración de los grupos de investigación nacionales se identifica como una necesidad prioritaria para incrementar la capacidad tecnológica nacional en materia ambiental, con participación decidida, en recursos económicos y en riesgo, del sector productivo. El mercado ambiental crecerá significativamente en los próximos años, por lo que se presenta la oportunidad de desarrollar tecnologías ambientales plenamente al alcance de los grupos de investigación nacionales.

Bibliografía

1. Noyola Robles A., Quintero Ramírez R., Revah Moiseev S., Soberón Mainero X. Biotecnología, medio ambiente y biodiversidad. En: *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI: retos y oportunidades,* Bolívar F. Editor, Conacyt, México, 8: 185-208 (2001).
2. Noyola A. El tratamiento anaerobio de aguas residuales como tecnología sustentable. En: *Memorias Segundo Minisimposio Internacional sobre Eliminación de Contaminantes de Aguas y Suelos*, Instituto de Ingeniería-UNAM, México, 106-109, (1995).
3. Ni, J., Nyns E. *Biomethanation: a Developing Technology in Latin America,* Catholic University of Louvain and Bremen Overseas Research and Development Association, Alemania, 286 pp. (1993).
4. Salvato J. *Environmental Engineering and Sanitation,* John Wiley Interscience, Nueva York, 4a. edición, 1418 pp. (1992).

5. Metcalf and Eddy, Inc. *Wastewater Engineering: treatement, disposal, reuse,* McGraw Hill, NY, EUA, 3a. edición, 1334 pp. (1991).
6. Nahle C. The contact process for the anaerobic treatment of wastewater: technology, design and experiences, *Water Science and Technology* 24(8): 179-191 (1991).
7. Young J.C. Factors affecting the design and performance of upflow anaerobic filters *Water Science and Technology*, 24(8): 133-155 (1991).
8. Lettinga G., Hulshoff Pol L. UASB process design for various types of wastewaters, *Water Science and Technology*, 24(8): 87-107 (1991).
9. Kato M., Field J., Lettinga G. The anaerobic treatment of low strength wastewater in UASB and EGSB reactors, *Water Science and Technology* 36(6-7): 375-382 (1997).
10. Iza, J. Fluidized bed reactors for anaerobic wastewater treatment, *Water Science and Technology* 24(8): 109-132 (1991).
11. Comisión Nacional del Agua (CNA), *Programa Nacional Hidráulico 2001-2006,* México, 128 pp., (2001).
12. Borzacconi, L., López, I. Relevamiento de reactores anaerobios en América Latina, en *III Taller y Seminario Latinoamericano Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales.* Viñas M., Soubes M., Borzacconi L. y Muxi L. editoras, Universidad de la República, Uruguay, 263-279 (1994).
13. Noyola A., Monroy O. Experiencias y perspectivas del tratamiento anaerobio en México, en *III Taller y Seminario Latinoamericano Tratamiento Anaerobio de Aguas Residuales.* Viñas M., Soubes M., Borzacconi L. y Muxi L. editoras, Universidad de la República, Uruguay, 331-340 (1994).
14. Monroy O., Famá G., Meraz M., Montoya L., Macarie H. Anaerobic digestion for wastewater treatment in Mexico: state of the technology, *Water Research* 34(6): 1803-1816 (2000).
15. Galán A., Noyola A. Transferencia de tecnología en el mercado ambiental: Un caso de vinculación de la UNAM, en *Experiencias en biotecnología, empresas y centros de vinculación universidad-empresa en América Latina y el Caribe,* Aramendia R. y Ocando O., editores, COLCIENCIAS, Colombia, 49-60 (2001).
16. Noyola A. Desarrollo de tecnologías mexicanas en tratamiento de aguas residuales: una experiencia, *Interciencia* 24(3): 169-172, (1999).
17. Noyola A. Reactor de flujo ascendente para el tratamiento de aguas residuales por vía anaerobia o anóxica, Patente Mexicana 172965, propiedad UNAM-UAM (1994).
18. Noyola A., Moreno G., Monroy O. Guyot J.P. Tecnología relativa al proceso de producción de lodos inóculos para reactores UASB, Patente Mexicana 173685 propiedad UNAM-UAM-ORSTOM (1994).

19. Noyola A., Jiménez B. Morgan J.M. Remoción biológica de materia orgánica y nitrógeno por medio de un sistema anaerobio-anóxico-aerobio en tanques separados, Patente Mexicana No. 199659 propiedad UNAM (2000).
20. Noyola A., Morgan J. M. Microplanta de tratamiento de aguas residuales para pequeños flujos, Patente Mexicana No. 988995, Patente Americana No. US 6,210,578 B1, Patente Canadiense No. 2,287,998, Propiedad: propiedad UNAM (2000).

EL DESARROLLO DE BIOPROCESOS PARA EL TRATAMIENTO DE AIRE CONTAMINADO EMITIDO POR FUENTES FIJAS

S. Revah Moiseev
I. Ortiz López

Introducción

La atmósfera es una capa de gas de cientos de kilómetros que rodea a la Tierra. Su composición puede verse alterada localmente por causas naturales y como consecuencia de las actividades humanas. Entre las causas naturales se encuentran las erupciones volcánicas, los incendios, las fugas naturales de reservas de hidrocarburos, las emisiones en pantanos, etc. La contaminación antropogénica ha rebasado el ámbito local y ya tiene un impacto regional que se manifiesta en fenómenos como la lluvia ácida y a nivel global se resienten los efectos de la acumulación de gases de invernadero y del agujero de la capa de ozono. Como consecuencia de lo anterior, los países y organizaciones mundiales emiten leyes y acuerdos para controlar la contaminación a través de una regulación en las emisiones.

Entre las fuentes antropogénicas de emisiones a la atmósfera podemos distinguir dos tipos: las móviles y las estacionarias. Las fuentes móviles son las más importantes en las ciudades y su impacto principal es en la emisión de monóxido de carbón (CO), ciertos hidrocarburos y en las partículas suspendidas.

Entre las fuentes fijas se pueden mencionar dos tipos de emisiones: por un lado las derivadas de la combustión, (*i.e.* chimeneas), utilizada para la generación de energía y por otro lado las inherentes a cada actividad industrial y de servicios. Para el caso de las chimeneas, las emisiones dependen en buena medida de la calidad de los combustibles pero también de la eficiencia de los quemadores, del mantenimiento del equipo y de la presencia de equipo de tratamiento (filtros, precipitadores, lavadores, etc.). Los principales contaminantes asociados a la combus-

tión son partículas, SO_2, NO_X, CO e hidrocarburos. Entre el segundo grupo de emisiones se encuentra un gran número de contaminantes, de muy variado nivel de impacto en la salud.

Los contaminantes del aire pueden clasificarse en:

— Partículas: material líquido o sólido de pequeño tamaño (< 500 μm) que es dispersado por el aire. Son formadas por abrasión, condensación o combustión incompleta. Las partículas pequeñas (menores a 10 μm y llamadas PM_{10}) afectan seriamente las vías respiratorias.

— Gases y vapores, que incluyen a los compuestos volátiles orgánicos e inorgánicos (COVs y CIVs). Los COVs se han definido como compuestos con carbón e hidrógeno y con presión de vapor mayor a 2 mm Hg (0.27 kPa) a 25 °C excluyendo el metano. Los CIVs incluyen los gases de combustión (excluyendo el CO_2) y otros como el H_2S, CS_2, NO_X, amoniaco, etc. Entre los ejemplos que se pueden citar y que muestran la diversidad, se encuentran:

a) Malos olores (CIVs y COVs) producidos por plantas de alimentos, rastros, basureros, plantas de tratamiento de aguas, rellenos sanitarios, plantas de composteo, etc. Se caracterizan por estar formados por muchos compuestos en muy bajas concentraciones (< 1 ppm) que tienen muy bajos umbrales de detección olfativa.

b) Compuestos orgánicos volátiles producidos por unidades industriales y de servicios que en general comprenden fábricas, talleres de pinturas, tintorerías, imprentas, plantas de reciclado de aceite, lavado de componentes electrónicos, etc. Los COVs pueden incluir algunos compuestos identificados como peligrosos por sus efectos en la salud; emisiones de compuestos azufrados, nitrogenados o halogenados producidos por fundidoras, plantas de celofán y rayón, biogás, amoniaco, industrias de refrigeración y electrónicas, etc. Muchas de estas emisiones son reguladas en países desarrollados.

Como ejemplo del impacto de las emisiones se reporta la composición del aire de la ZMVM (zona metropolitana del valle de México), que refleja las emisiones, tanto naturales como antropogénicas, por diferentes fuentes (1). Se demuestra la presencia de un gran número de contaminantes cuyo origen se puede rastrear a fuentes móviles y a actividades tales como, plantas de producción de asfalto, talleres gráficos y de pintura, lavanderías, rellenos sanitarios, etc. (2). Entre los compuestos más abundantes reportados por Arriaga y col. (1), se encuentran, entre otros, propano, n-butano, tolueno*, i-butano, i-pentano, acetileno, etileno, xileno, 2-metil pentano, n-hexano, MTBE* y benceno* en concentracio-

nes entre 50 y 400 ppbC. Algunos de estos compuestos (*) son considerados como contaminantes peligrosos para la salud. Según Vega y col. (2), las actividades de mayor impacto en la generación de COVs en la atmósfera de la ciudad de México son, además de los automotores, las emisiones de gas LP, las fábricas de asfalto y los talleres de pintura.

El efecto de la presencia de contaminantes en la atmósfera sobre la salud se ha documentado de varias formas. Un estudio reciente realizado para la Unión Europea, reporta dicho impacto a través de la evaluación del costo del daño para la sociedad causado por la emisión de contaminantes (3). Se calcula el aumento en la concentración del contaminante por el incremento en la emisión y se estima el número de casos de enfermedades y daño físico y muerte. El daño resulta función de la densidad poblacional y del tipo de contaminante. Así se estima que los COVs pueden tener un costo promedio para la sociedad de ocho pesos por kg emitido aunque puede aumentar por un factor de dos cuando las condiciones son adversas (baja dispersión y alta densidad poblacional), como es el caso de la ZMVM. El mismo estudio da valores aproximados de $90 por kg de SO_2, $130 por kg de NO_2 y $130 por kg de PM_{10}.

Técnicas de tratamiento

Entre las técnicas de tratamiento de aire contaminado emitido por fuentes fijas se encuentran algunas que se han aplicado durante muchos años y de las cuales se tiene una amplia documentación (4, 5). En general, estas tecnologías pueden clasificarse en dos grupos dependiendo de las características de los contaminantes; aquellas para el control de contaminantes particulados (sólido o líquido) con diámetro en el orden de micras o menores (polvo, *smog*, humo, aerosoles) y las usadas para contaminantes gaseosos. Entre las tecnologías para el control de contaminantes particulados se encuentran los sedimentadores gravitacionales, los separadores centrífugos, incluyendo los ciclones, los filtro de tela, los lavadores líquidos y el precipitador electrostático.

Los sistemas de control para vapores y gases se basan en diferentes principios fisicoquímicos que se encuentran descritas en la tabla 1.

Entre los factores que son considerados para la selección de un equipo de tratamiento se encuentran (4, 5, 6, 7, 8):

a) Características del contaminante:

Toxicidad, corrosividad, combustibilidad, biodegradabilidad, presión de vapor, etcétera.

Tecnología	Principio
Adsorción	Las moléculas son retenidas sobre la superficie del ad electrostáticas. Se usa principalmente carbón activado. regenerado (in- situ o ex situ) una vez saturado.
Absorción	El contaminante es transferido del gas a un líquido ab gradiente de concentración. Las soluciones absorbent cáustica, aminas y algunos hidrocarburos. El absorben las características de solubilidad del COV a remover.
Lavadores químicos	Proceso de absorción con reacción. Se usa para contr contaminantes con hipoclorito u otro oxidante químí El oxidante se consume al reaccionar por lo que es ne continuamente.
Incineración (Oxidación térmica)	Los contaminantes son oxidados a CO_2 y H_2O en quem Se requiere generalmente una corriente de combusti emitirse además NO_X, CO, HCl y otros COVs potencialm
Oxidación catalítica	La oxidación es favorecida por un catalizador. Las tem encuentran entre los 300-450º C. Los catalizadores típi oxidación catalítica incluyen óxidos metálicos.
Condensación	Los contaminantes gaseosos son removidos por el cam separación de esta fase del gas. La condensación es ge la corriente de gas. La eficiencia depende principalm de la mezcla.
Membranas selectivas	El aire contaminado pasa a través de membranas selec selectivamente absorbidos y concentrados.
Oxidaciones avanzadas	Uso de oxidantes más potentes (UV, O_3) o catalizadores para oxidar los contaminantes del aire.
Sistemas biológicos	Los contaminantes son mineralizados (CO_2, H_2O, S, microorganismos que se encuentran inmovilizados o

sorbente por fuerzas débiles El adsorbente debe ser	La adsorción puede verse afectada por humedad, selectividad, tempertaura, presión, y presencia de partículas.
sorbente por un es incluyen agua, sosa te empleado dependerá de	La eficiencia depende de la solubilidad del contaminante, que a su vez depende de temperatura, presión y el pH. Pueden ser torres de aspersión o empacadas.
ol de olores oxidando los co. cesario agregarlo	Se pueden generar compuestos indeseables por la oxidación química parcial. Pueden ser torres de aspersión o empacadas.
adores entre 700 y 1000º C. ble suplementaria. Pueden ente peligrosos.	Se utiliza cuando la concentración de vapores orgánicos es generalmente 50% menor al límite inferior de explosividad,
peraturas de operación se camente utilizados en	Para concentración menor del 25% de su límite inferior de explosividad. Partículas y ciertos compuestos como H_2S, HCl, pueden desactivar el catalizador.
bio de fase a líquido y la neralmente inducida enfriando ente de la temperatura de rocío	Pueden ser condensadores convencionales, refrigerados o criogénicos. Frecuentemente utilizados para compuestos concentrados y capaces de ser reutilizados en el proceso.
tivas en dónde los COV son	Tecnología emergente, altos costos.
que los generan (TiO2)	Tecnologías emergentes, altos costos.
SO_4, NO_X, HCl) por medio de en suspensión.	Los sistemas más comunes son biolavadores, biolavadores de lecho escurrido y biofiltros.

b) Las características de la corriente contaminada:

Flujo, temperatura, humedad, composición (incluyendo partículas suspendidas), concentración de los contaminantes y masa total de los mismos.

c) La eficiencia de remoción requerida, de acuerdo con las normatividades existentes.

d) La necesidad de servicios especiales y la posible generación de desechos y subproductos.

e) La posibilidad de recuperar, reutilizar o reciclar el contaminante.

f) Los costos de inversión y operación.

En la figura 1, se muestran los rangos de concentración de contaminantes (compuestos volátiles orgánicos) y de flujos de aire en los cuales son más rentables algunas de las principales tecnologías de control.

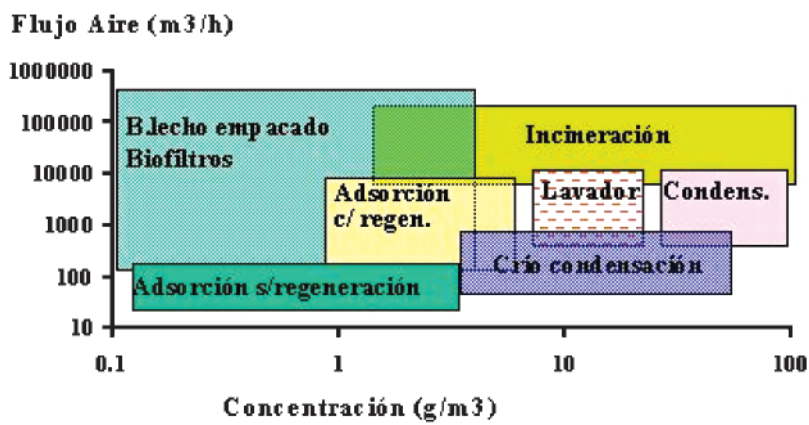


Figura 1
RANGO DE APLICACIÓN PARA TRATAMIENTO DE GASES (ADAPTADO DE 6 Y 7)

Métodos biotecnológicos

Estas tecnologías se basan en la degradación o transformación de los contaminantes en compuestos no dañinos. El límite de estos procesos es la biodegradabilidad de los contaminantes. Mientras que los compuestos

biogénicos (generados por procesos biológicos) son fácilmente biodegradables, los compuestos xenobióticos (aquellos que no son producto de una biosíntesis) pueden ser más recalcitrantes (6, 9). Los compuestos recalcitrantes son aquellos que resisten el ataque microbiano parcial o totalmente. La tabla 2 reporta compuestos que han sido eliminados por biofiltración.

Tabla 2
EJEMPLO DE COMPUESTOS VOLÁTILES TRATADOS
POR PROCESOS BIOLÓGICOS

Acetona	Tolueno	Acrilonitrilo	Ácido sulfhídrico
Metil Etil Cetona,	Benceno	Etil acetato	Bisulfuro de carbón
Metanol	Etil benceno	Cloruro metileno	Mercaptanos
Etanol	Xilenos	Acrilatos	Amoniaco
Isopropanol,	Estireno	Vapores gasolina	SO_2 y NO_X
Éter	Metil t- butil éter,	Cloruro vinilo	Olores orgánicos
Formaldehído	Etil t- butil éter,	Cloro- bencenos	
n- Alcanos			
(C1 a C6)	t- amil metil éter,	Pinenos	

Estos procesos son considerados tecnologías limpias por su menor uso en energía, que no adicionan sustancias peligrosas, que no requieren condiciones extremas de trabajo y que su costo de operación es reducido. Estos sistemas comparten con las oxidaciones (incineración y catalítica) el hecho que los contaminantes son destruidos y no transferido a otra fase como con otras tecnologías de control (*i.e.,* adsorción, absorción y condensación).

Las principales tecnologías biológicas son los filtros de escurrimiento y los biofiltros (6, 10, 11).

Filtros de escurrimiento (BLE)

En los filtros de escurrimiento los procesos de absorción de gases y regeneración de la fase líquida ocurren simultáneamente (figura 2). Generalmente consisten en columnas empacadas con material que permite el desarrollo de una película microbiana que favorece el aumento de la densidad celular volumétrica. Por lo general el área específica del empaque (área de contacto por unidad de volumen de columna) es relativamente baja (100 a 300 m^2/m^3) y se prefieren volúmenes vacíos altos

(90 a 95%) para minimizar la caída de presión en la columna y el riesgo de que el espacio vacío sea obstruido por el crecimiento microbiano. Los empaques son generalmente plásticos estructurados o aleatorios. En los filtros de escurrimiento se alcanzan valores de densidad de microorganismos de hasta 60 kg SST m^{-3} (sólidos suspendidos totales) lo que incrementa sensiblemente la eficiencia de remoción volumétrica.

Estos equipos son muy recomendados cuando los compuestos de oxidación no son volátiles y se acumulan en la fase líquida (6, 11). Éste es el caso de los sulfatos, nitratos y cloruros (generados, entre otros, por la oxidación de sulfuros, amoniaco y organoclorados) que, además de disminuir el pH durante la degradación, son inhibitorios para los microorganismos en concentraciones elevadas.

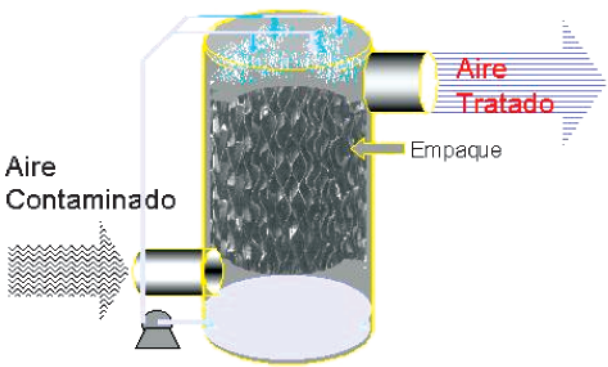


Figura 2
ESQUEMATIZACIÓN DE UN FILTRO DE ESCURRIMIENTO

Biofiltros

En los biofiltros, el gas contaminado pasa por un reactor empacado de material húmedo en donde se ha desarrollado una película de microorganismos sobre la superficie y los macroporos del soporte (figura 3).

El contaminante es transferido desde el gas a esta biopelícula húmeda en donde es transformado eventualmente en CO_2 y H_2O, siendo estos compuestos arrastrados a la salida. En estos equipos se pueden alcanzar tasas de degradación mayores a 200 g m^{-3}_{reactor} h^{-1} (11, 12, 13). Los materiales de empaque pueden ser tierra, diferentes tipos de compostas, desechos de madera, turba, bagazo de caña, cáscaras de cacahuate, etc. Estos

soportes normalmente contienen los suficientes minerales para sostener una población adecuada aunque la adición controlada de nutrientes y agua tiene un efecto estimulante (6, 12, 14). Se han estudiado además soportes inertes, como vermiculita, agrolita, materiales cerámicos, etc., en donde los nutrientes tienen que ser adicionados externamente (13, 15). Las características de los materiales naturales hacen necesario el cambio del soporte al cabo de periodos de tres a cinco años (7), aunque la operación y características de los materiales de empaque pueden reducir o aumentar este rango (16). La profundidad del lecho es de 50 a 120 cm dependiendo de las propiedades mecánicas del empaque las cuales pueden ser mejoradas mezclando materiales orgánicos tales como madera o cortezas así como plásticos inertes o cerámicos.

En estos equipos la película de líquido está estacionaria sobre el soporte lo que dificulta el control del microambiente en donde se encuentran los microorganismos (12, 14). Sin embargo, la adición intermitente de agua, medio nutritivo o neutralizante pueden resolver este problema manteniendo una humedad del lecho menor a la de su capacidad de campo y las condiciones apropiadas para la actividad biológica. Existen diversos ejemplos de sistemas de biofiltración en los que la película de líquido estacionaria puede ser controlada como lo demuestra un biofiltro industrial de 150 m^3 empacado con bagazo de caña recientemente instalado para tratar sulfuros gaseosos emitidos del tratamiento anaeróbico de vinazas (17).

En los inicios de la biofiltración éstos fueron usados principalmente para abatir los olores en las plantas de tratamiento de aguas residuales (18), en la industria alimentaria (rastros, café y cacao), en las de aromas y sabores y para los casos de COV derivados de las industrias de pinturas, fotografía, plásticos y síntesis química. Algunas otras aplicaciones son las emisiones de suelos contaminados, gasolineras, campanas de extracción, etcétera. (6, 19).

Otras configuraciones

Los biolavadores consisten de un compartimiento en donde se lleva a cabo la absorción y otro, el reactor biológico, de regeneración (figura 4). En el absorbedor los contaminantes se transfieren a un medio acuoso hasta condiciones cercanas a la saturación. El líquido se recircula al reactor biológico en donde se lleva a cabo la oxidación por microorganismos libres o inmovilizados. En casos en los que las concentraciones de conta-

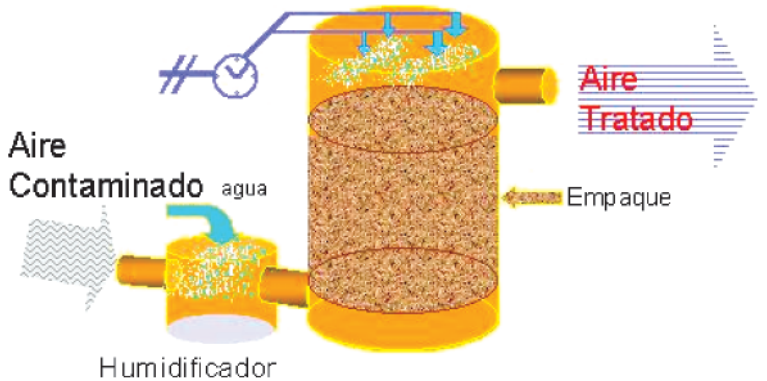


Figura 3

ESQUEMATIZACIÓN DE UN BIOFILTRO

minante son elevadas, se puede agregar aire no contaminado para completar la oxidación. Una vez reducida la concentración del contaminante en el líquido éste es reciclado al absorbedor. El líquido contiene nutrientes inorgánicos que sostienen una población microbiana estable. Las densidades celulares son menores que en los filtros de escurrimiento.

Entre las configuraciones innovadoras se encuentra el contactador biológico rotatorio (20). En este sistema el gas se alimenta en los espacios libres de discos rotatorios permitiendo el control de la biopelícula. En una variación se usan placas que se mueven en sentido perpendicular al flujo de gas, se sostiene que se mejora la transferencia (21).

Uno de los grandes retos de la biofiltración es el acoplamiento de diferentes tecnologías para poder hacer una eliminación eficiente de corrientes complejas. En un reporte reciente se diseñó un sistema combinado para el tratamiento de corrientes gaseosas de acrilonitrilo (22). En este proceso se combina un biofiltro, para eliminar el compuesto carbonado y la nitrificación y denitrificación para eliminar el amoniaco formado durante el primer paso. El equipo consiste en un biofiltro para la transformación del carbón en CO_2 y se produce amoniaco, en un segundo biofiltro el amoniaco es oxidado a nitrato y finalmente este compuesto es reducido a nitrógeno elemental en un tanque anaeróbico. Otros procesos combinados incluyen el uso de plantas como lo reportan para la limpieza del aire de interiores.

Con la disponibilidad de nuevos materiales se empieza a desarrollar una nueva familia de sistemas de tratamiento biológico basado en la separación selectiva de los contaminantes por membranas y su destruc-

ción por biopelículas que se formarían en el otro lado de la pared. En estos sistemas se podrían reducir algunos de los principales problemas de la biofiltración como son el taponamiento, el control de las condiciones microbianas, la formación de canales, etcétera. (23).

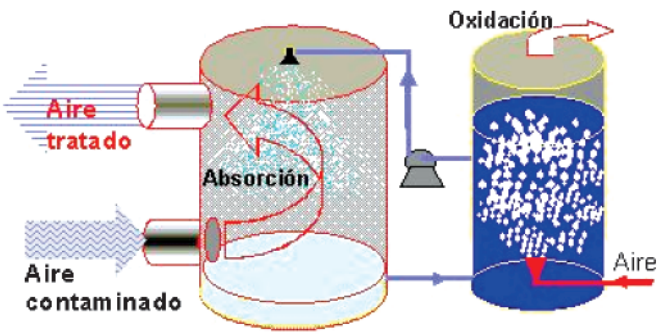


Figura 4

ESQUEMATIZACIÓN DE UN BIOLAVADOR

Fundamentos de los procesos de tratamiento de aire

Microbiología

La mineralización de los contaminantes (transformación en CO_2 y H_2O) se encuentra limitada por la recalcitrancia de la molécula al ataque biológico. Así, se pueden presentar casos en donde una porción de los contaminantes no es degradada, como el caso de las isoparafinas en los vapores de gasolina (19).

Los microorganismos involucrados en estos procesos dependen de las características de los contaminantes (6). Para el caso de compuestos o mezclas biogénicas es fácil encontrar, por su ubicuidad, microorganismos que degraden los contaminantes a partir de tierras, lodos activados, compostas, etc. Para el caso de compuestos más recalcitrantes es necesario realizar un proceso de selección para encontrar microorganismos eficientes para la oxidación de los contaminantes. Estudios con sistemas con cepas puras de microorganismos adaptados, han dado resultados que rebasan los obtenidos con poblaciones mixtas naturales. De esta forma, García y col. (24) reportaron una capacidad de eliminación de tolueno superior a 250 g $m^{-3}h^{-3}$; se obtuvo con un hongo filamentoso (*Scedospo-*

rium apiospermum) que fue aislado de un biofiltro adaptado para el consumo de tolueno. Este valor es un orden de magnitud superior al encontrado con biofiltros típicos de composta. Para el caso de ciertos compuestos altamente recalcitrantes se requiere la presencia de otros compuestos orgánicos para poder realizar la oxidación, este proceso se conoce como co- metabolismo. Éste es el caso del metil-butil éter (MTBE) en donde se encontró que otros componentes de la gasolina, principalmente los n-alcanos, coadyuvan en el inicio de la degradación cometabólica del MTBE. Los estudios fueron llevados a cabo en la UAM desde matraz hasta reactor (9, 15, 25). Otro ejemplo interesante es el reportado por Lee y col., (26) en donde la degradación cometabólica de xilenos se lleva a cabo en presencia de benceno, tolueno y etil benceno por una cepa pura (*Stenotrophomonas maltophilia*).

Proceso

La degradación de los contaminantes por los microorganismos no puede realizarse directamente de la fase gas sino requiere de un paso previo de transferencia a un medio líquido en donde se encuentran los microorganismos formando la biopelícula (figura 5). Este transporte se lleva a cabo debido a un gradiente de concentración entre las dos fases. Para que la biofiltración sea competitiva con los otros métodos de tratamiento este fenómeno de transferencia aire-líquido debe ser rápido, ya que típicamente los tiempos de residencia en los biofiltros son cortos. El transporte de los contaminantes al interior de la biopelícula se lleva a cabo por difusión. En la interfase gas-líquido, los contaminantes y el oxígeno se encuentran en equilibrio.

Para concentraciones bajas de sustrato (contaminante) los microorganismos activos en la parte exterior de la biopelícula consumen rápidamente el contaminante impidiendo que los microorganismos que se encuentran en el interior entren en contacto con el sustrato. Por otro lado, a altas concentraciones de un contaminante fácilmente degradable, se favorece el crecimiento excesivo de la biopelícula, el oxígeno presente será consumido en esta porción de la biopelícula permitiendo la formación de zonas anaerobias en la parte interior. En los filtros de escurrimiento la recirculación de la fase líquida provoca el desprendimiento de la biopelícula. Otros fenómenos, tales como la retro-difusión del CO_2 producido y la formación de algunos subproductos también suceden dentro de la biopelícula.

A nivel reactor el principal reto de proceso es el de mantener la humedad apropiada en el caso de biofiltración (6, 11, 27). Cuando la humedad es baja, debida al secado, disminuye sensiblemente la actividad biológica y por lo tanto el desempeño global del sistema. Por otro lado cuando se agrega demasiada agua se pueden provocar taponamiento y la formación de zonas anaeróbicas. El secado de biofiltros se encuentra determinado por la humedad del aire de entrada, el flujo y por el calor liberado por la reacción de oxidación. En un estudio reciente, Morales y col. (28), reportan el modelamiento de este proceso. Ellos encontraron que para un biofiltro con un tiempo de residencia de un minuto que recibe aire con una humedad de 90% y tiene una capacidad de eliminación (ver eq. 1) de tolueno de 100 $g/m^3_{reactor}/h$ pierde 27 litros de agua diarios por evaporación. La ausencia de control llevaría rápidamente a la pérdida de actividad en este sistema.

Los microorganismos utilizan el contaminante como fuente de carbón y energía (compuestos orgánicos) o sólo como fuente de energía (ciertos compuestos nitrogenados y azufrados) (figura 6). Además los microorganismos requieren de nutrientes inorgánicos que son tomados del sopor-

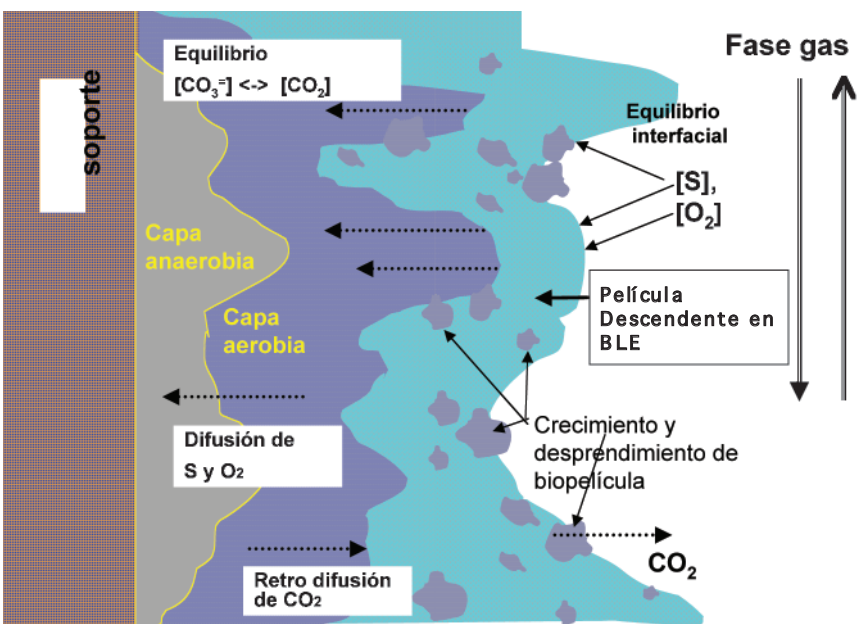


Figura 5

ASPECTOS FÍSICOS DE LA BIOFILTRACIÓN

te o adicionados, en el caso de soportes inertes. La utilización del contaminante implica producción de más biomasa y la oxidación parcial o total del contaminante. A su vez la biomasa, bajo ciertas condiciones, sufre una oxidación por respiración endógena reduciéndose la acumulación. Además de la biomasa activa, en la biopelícula pueden existir microorganismos inactivos, es decir, microorganismos que no son capaces de oxidar el contaminante o bien microorganismos depredadores. Una representación del ciclo de la población microbiana se muestra en la figura 6. Mediante la muerte y lisis de la población algunos nutrientes son reciclados. En los procesos biológicos de control de contaminación de aire no es posible considerar la esterilización del gas por motivos económicos. Por lo tanto, las poblaciones dentro de los equipos deben ser capaces de oxidar los contaminantes en condiciones altamente competitivas de no-esterilidad.

Modelos

El concepto de biopelícula se ha utilizado para la descripción matemática de los fenómenos que llevan a cabo durante la degradación bio-

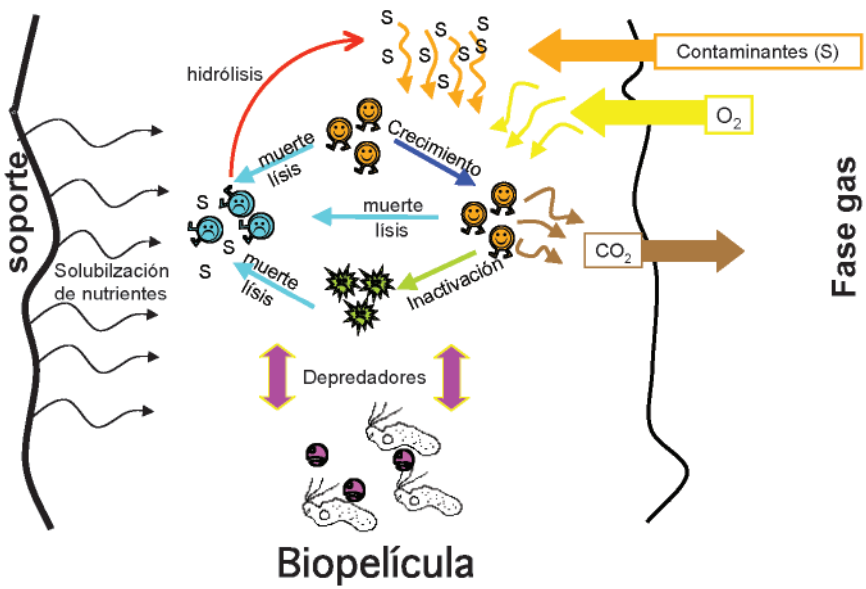


Figura 6

lógica en un biofiltro. Los modelos de biopelículas fueron desarrollados para tratamiento de agua contaminada y de ahí fueron adaptados para biofiltros. Estos modelos, a pesar de su simplicidad y limitaciones han sido aplicados exitosamente tanto en la predicción del comportamiento de biofiltros escala laboratorio como en biofiltros industriales. En 1983, Ottengraf y van Den Oever (29), propusieron el primer modelo matemático que a la fecha sigue siendo el mas comúnmente usado en biofiltración.

El principal índice de desempeño que caracteriza un biofiltro es la capacidad de eliminación, que se define como la masa eliminada de contaminante por volumen de reactor por unidad de tiempo. La capacidad de eliminación está dada por la siguiente expresión,

$$CE = \frac{(C_{G_e} - C_{G_s}) \cdot U}{V_l} \qquad (1)$$

donde, C_{G_e} es la concentración de entrada del contaminante en la fase gas; C_{G_s} es la concentración de salida del contaminante en la fase gas; U es la velocidad superficial del gas; V, es el volumen del lecho.

El modelo de Ottengraf y van Den Oever

Este modelo fue propuesto bajo las siguientes consideraciones:

a) El espesor de la biopelícula es significativamente pequeño con respecto al tamaño de partícula del soporte, por lo tanto podemos considerar una geometría plana.

b) El contaminante se transporta de la fase gaseosa a la fase líquida sin resistencia externa a la transferencia.

c) En la interfase entre la fase gas y la fase líquida, existe un equilibrio. La relación de concentraciones puede ser determinada por la Ley de Henry.

d) El contaminante se moverá en la biopelícula únicamente por difusión, descrita por el coeficiente de difusión efectiva, D_{ef}. La fuerza impulsora es el gradiente ocasionado por el consumo del contaminante por los microorganismos.

e) El espesor de la biopelícula, δ, es pequeño comparado con el diámetro de partícula del soporte, por lo tanto se puede asumir una geometría plana. El espesor de biopelícula es constante a lo largo del biofiltro.

f) La fase gaseosa se mueve convectivamente a lo largo del lecho en flujo pistón, es decir, no existen gradientes radiales de concentración.

g) La cinética de consumo del sustrato está dada por la ecuación de Michaelis-Menten

$$k = \frac{\mu_{max}}{Y} \frac{C_L}{K_M + C_L} X \qquad (2)$$

donde: k es la constante cinética de degradación, μ_{max} la constante máxima de crecimiento, C_L es la concentración en el líquido, K_M la constante de Michaelis-Menten y X es la concentración de microorganismos activos.

La ecuación diferencial para el estado estacionario es:

$$D_{ef}\left(\frac{d^2C_L}{dx^2}\right) = k \qquad (3)$$

Con las siguientes condiciones de frontera:

en $x = 0$ $\quad C_L = C_G/m$ (4)

en $x = \delta$ $\quad dC_L/dx = 0$ (5)

Donde, D_{ef} es la difusividad efectiva del contaminante en la biopelícula; C_L es la concentración del contaminante en la fase líquida; k es la constante cinética de degradación; C_G es la concentración del contaminante en la fase gas; x es la coordenada longitudinal de la biopelícula; δ es el espesor de la biopelícula; m es el coeficiente de partición líquido-gas (figura 7).

Cinéticas de reacción orden cero

En este caso $K_M << C_L$ y la ecuación (2) puede ser expresada como:

$$k_0 = \frac{\mu_{max}}{Y} X.$$

Bajo estas condiciones pueden existir dos regímenes de operación de un biofiltro, como lo muestra la figura 8.

1) Régimen controlado por reacción, en concentraciones mayores a la crítica, y

2) Régimen controlado por difusión, en concentraciones por debajo de la concentración crítica.

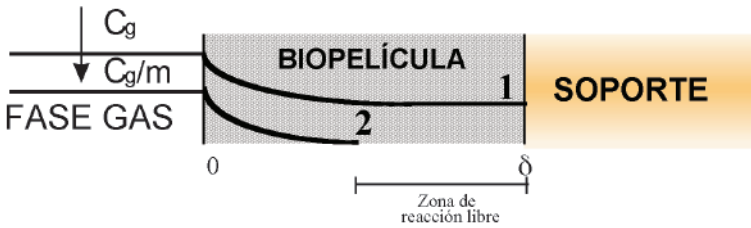


Figura 7

ESQUEMATIZACIÓN DE LA BIOPELÍCULA (29)

1. Régimen controlado por reacción. 2. Régimen controlado por difusión.

Las expresiones para las soluciones del modelo de Ottengraf y van Den Oever son:

1. Para el régimen controlado por reacción, concentraciones mayores a la crítica. La biopelícula se encuentra totalmente penetrada y la solución de la ecuación (3) es:

$$\frac{C_{G_S}}{C_{G_e}} = 1 - \left(\frac{H \cdot K_0}{C_{G_e} \cdot U}\right).$$

Donde: $K_0 = k_0 \cdot A_S \cdot \delta$ es la constante aparente de cinética de reacción; A_S es el área superficial de biopelícula por volumen de lecho; H es la altura del biofiltro; U es la velocidad superficial del gas.

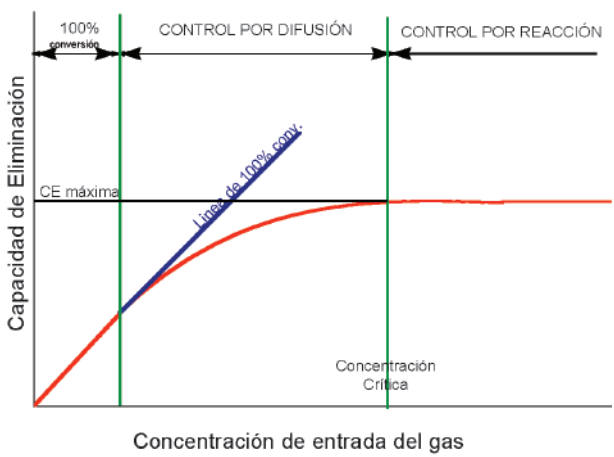


Figura 8

REGÍMENES DE CONTROL DEL PROCESO (30)

2. Para el régimen controlado por difusión, concentraciones menores a la crítica. La película se encuentra parcialmente penetrada a un valor de λ, expresado como.

$$\lambda = \sqrt{\frac{2 \cdot D_{ef} \cdot C_G}{k_0 \cdot m}}.$$ La solución de la ecuación (3) es:

$$\frac{C_G}{C_{G_e}} = \left[1 - \frac{H}{U}\sqrt{\frac{K_0 \cdot D_{ef} \cdot A_S}{2m \cdot C_{G_e} \cdot \delta}}\right]^2$$

Cinética reacción de primer orden

Para este caso $K_M >> C_L$ la cinética está dada por la expresión:

$$k_1 = \frac{\mu_{max}}{Y \cdot K_S} X$$

La solución de la ecuación es:

$$\frac{C_G}{C_{G_e}} = \exp\left[-\frac{H \cdot K_1}{m \cdot U}\right]$$

donde $K_1 = \frac{A_S \cdot H \cdot D_{ef}}{m \cdot U \cdot \delta}\ \phi_1 \tanh \phi_1$, es la constante aparente de cinética de reacción.

Los parámetros requeridos por este modelo, tales como el área superficial, espesor de biopelícula, la difusividad efectiva del compuesto dentro de la biopelícula y los parámetros cinéticos microbiológicos son difíciles de obtener debido a la heterogeneidad del sistema.

Algunas variaciones a este modelo han sido propuestas por van Lith y col. (27), Ergas y col. (31), y Baltzis y col (32). Algunos otros enfoques como realizar el balance de masa en un elemento de empaque representativo y no en un elemento diferencial de biopelícula o los modelos de relaciones cuantitativas actividad-estructura, QSARs (por sus siglas en inglés) son discutidos por Devinny *et al.* (1999),(6).

Aplicaciones diversas

Las biotecnologías para el tratamiento de aire contaminado por compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles son tecnologías que han sido probadas en diferentes aplicaciones industriales principalmente en países como Alemania, Holanda y Estados Unidos (6, 18). Su efectividad en el tratamiento de aire contaminado, características como bajo costo de

construcción y de operación hacen particularmente interesantes este tipo de tecnologías para su aplicación en países de Latinoamérica como lo demuestran los ejemplos en México (4, 12, 14, 16, 19, 33, 34, 35) y Colombia (17).

Las aplicaciones industriales de la biofiltración más relevantes están enumeradas en la tabla 3:

Tabla 3
APLICACIONES TÍPICAS DE LA BIOFILTRACIÓN

Adhesivos	Fundición	Plantas de asfalto
Almacenamiento químico	Industria de petróleo	Procesamiento alimentos
Aromas y perfumes		Producción de vehículos
Beneficiadoras desechos	Industria gráfica e imprentas	Pulpa y papel
Cámaras de pintura	Industria Química	Ranchos y granjas
Campanas de extracción	Industria recubrimientos	Rellenos sanitarios
Composteo	Madera/ muebles	Tratamiento de agua
Extracción vapores suelo	Petroquímica	Venteo Biorremediación

Un proyecto exitoso Universidad-Industria: El desarrollo de biolavadores para el tratamiento de efluentes gaseosos

Antecedentes

A principios de 1989 se planteó la necesidad por parte de la empresa Grupo CYDSA S A de C V de desarrollar e implementar un sistema para el tratamiento de los efluentes gaseosos producidos en su planta de fabricación de celofán y rayón en Monterrey, Nuevo León. El problema consistía en establecer la tecnología más adecuada para remover ácido sulfhídrico y bisulfuro de carbono (H_2S y CS_2), presentes en concentraciones relativamente elevadas en la corriente gaseosa efluente de dicho proceso.

Las fibras de rayón, las esponjas de celulosa y el celofán se fabrican a partir de pulpa de celulosa. Previo a la coagulación, la celulosa es convertida en xantagenato sódico de celulosa por la adición de NaOH y CS_2. La solución de xantogenato disuelto en el medio alcalino, conocida como *viscosa,* es forzada a pasar a través de una boquilla y precipitada en

una solución de H_2SO_4 y sulfato de sodio. El CS_2 y el H_2S son desprendidos durante el proceso de coagulación. El gas es eliminado por arrastre con aire. La eliminación del gas contaminado a la atmósfera provocaba el típico y desagradable olor en la vecindad de la planta. La tabla 4 muestra la magnitud del problema para el caso de la producción de rayón.

Tabla 4
PRODUCCIÓN DE EMISIONES CONTAMINANTES
EN LAS PLANTAS DE VISCOSA

Planta	*Volumen* m^3*/ton de producto*	*concentraciones* *Mg* H_2S */*m^3	*mg* CS_2 */*m^3
Rayón	400 000-700 000	60-130	300-800
Rayón fibra corta	50 000-90 000	700-1 800	2 300-4 000

La contaminación atmosférica por ácido sulfhídrico está asociada a fuentes naturales como el gas natural, la descomposición de materia orgánica natural, la degradación de heces en las unidades de producción ganadera intensiva, el tratamiento anaerobio y otras. El H_2S es un compuesto tóxico para la salud, corrosivo, detectable en el aire por su característico olor a "huevo podrido" aún a muy bajas concentraciones (0.002 mg/l). En la industria, el H_2S es producido como contaminante en fundidoras de mineral de hierro, tenerías, fabricas de pulpa y papel, refinerías de petróleo y plantas de producción de celofán y rayón a partir de viscosa. En solución acuosa el H_2S se encuentra protonado en función del pH. El pK_a para el equilibrio $H_2S \longleftrightarrow HS^-$ es de 7.04 (36) lo que permite que se aumente sensiblemente la solubilidad acuosa del sulfuro gaseoso a pH alto.

El CS_2 es un líquido incoloro, volátil y poco soluble en agua, con un tiempo de vida en la atmósfera de dos a ocho meses y de alta toxicidad. Es generado por fuentes naturales y antropogénicas; las primeras comprenden océanos, suelos, pantanos y volcanes y algunas plantas (entre ellas el roble). Las fuentes antropogénicas pueden ser automóviles, procesos de recuperación de azufre y las industrias químicas, dentro de las cuales destacan las de transformación de la viscosa. La figura 9 muestra las tecnologías generalmente usadas para tratar el H_2S y el CS_2.

Tradicionalmente el H_2S y el CS_2 habían sido diluidos en la atmósfera sin embargo, la necesidad de disminuir el riesgo por parte de la empresa impulsó que se busque reducir sensiblemente la cantidad de conta-

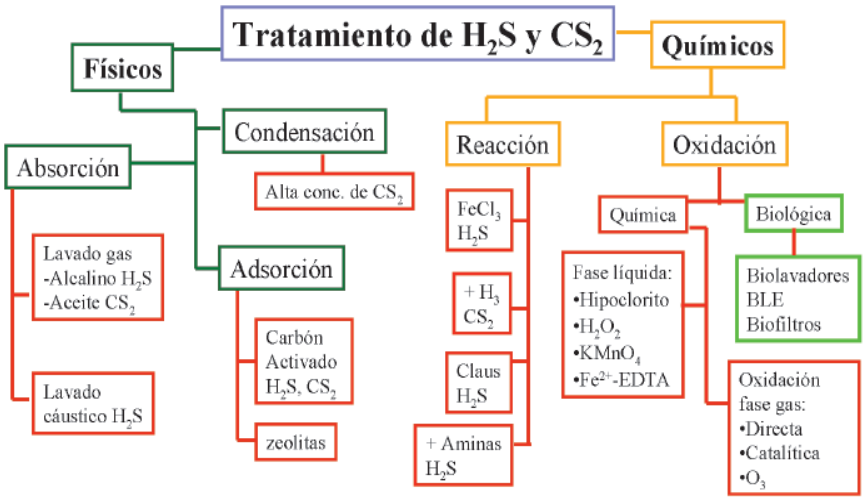


Figura 9

CLASIFICACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS PARA EL TRATAMIENTO DE H_2S Y CS_2, DE MORGAN Y COL (37)

minantes emitida. La inversión en tecnologías tradicionales es elevada y la operación generalmente costosa. Algunos indicios en la literatura apuntaban hacia la posibilidad de implementar sistemas biológicos.

Desarrollo de un proceso de purificación biológica

Con base en los antecedentes mencionados, se optó por desarrollar un proceso de purificación biológica en el marco de un convenio de colaboración entre el grupo de desarrollo de nuevas tecnologías de CYDSA y el Área de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

El desarrollo globalmente incluyó los siguientes pasos:

Estudios de microbiología: aislamiento de una bacteria o consorcio sulfóxidante capaz de degradar el H_2S y el CS_2. Crecimiento en fermentadores.

Estudios de planta piloto: montaje de planta piloto, determinación de factibilidad y de parámetros de proceso básicos y escalamiento.

Construcción de prototipo industrial en la industria: estudios de operación, control y costos. Documentación de operación, análisis, manejo de fallas, etcétera.

Escalamiento a nivel industrial y comercialización.

Adaptación tecnológica: uso del conocimiento acumulado para diseño de nuevos procesos para tratar diferentes corrientes contaminadas.

Estos temas serán tratados en detalle a continuación:

Estudios de microbiología

En el laboratorio de la Universidad se estudiaron los microorganismos con la capacidad de oxidar los compuestos azufrados indeseables. El estudio se centró en aquellas bacterias que tiene la capacidad de usar la energía obtenida de la oxidación de H_2S y CS_2 para fijar CO_2 y así minimizar los requerimientos nutricionales del medio de cultivo.

Las bacterias incoloras del azufre comprenden un vasto grupo de géneros de procariontes, con variable relación taxonómica, que tienen en común sólo su habilidad para oxidar compuestos reducidos de azufre. El metabolismo del carbono de las bacterias que oxidan compuestos de azufre va desde el autótrofo estricto hasta el heterótrofo, existiendo algunos casos de organismos facultativos. Los géneros que pertenecen a este grupo de bacteria incoloras del azufre son: *Thiobacillus, Thiovulum, Beggiatoa, Thiothrix, Thiospira, Thiomicrospira, Sulfolobus*, etc. De particular interés para este estudio son los microorganismos del género *Thiobacillae*, que son células pequeñas gram negativas en forma de bacilos (0.5 x 1.0-4.0 mm). Algunas especies presentan un flagelo que les da movilidad. No se conocen etapas de latencia. La energía necesaria para llevar a cabo sus funciones es derivada de la oxidación de uno o más compuestos de azufre reducido, incluyendo sulfuros, azufre elemental, tiosulfato, politionatos y tiocianatos. El sulfato es el principal producto final de la oxidación, aunque azufre elemental, sulfito y politionatos pueden acumularse transitoriamente en la mayoría de las especies.

Todas las especies del género son capaces de fijar el bióxido de carbono a través del ciclo de Benson-Calvin, permitiendo su crecimiento autótrofo. Algunas especies son quimiolitótrofas obligadas, mientras que otras son capaces de crecer quimioorganotróficamente. El género incluye microorganismos aerobios obligados y facultativos denitrificantes, y sus especies presentan pH óptimos de crecimiento en el rango de 2 a 8, con temperaturas óptimas en el intervalo de 20 a 43 ºC. La distribución de estos microorganismos en la naturaleza es muy amplia , tanto en ambientes marinos, como de agua dulce y terrestres. Se localizan principalmente

en lugares donde abundan los compuestos de azufre reducido: manantiales de aguas sulfurosas, depósitos de sulfuros minerales, depósitos de azufre, áreas de tratamiento biológico de efluentes, sedimentos de lodos anaerobios etcétera.

Se enriqueció un consorcio microbiano obtenido de diferentes fuentes que fue capaz de oxidar H_2S y CS_2. La hidrólisis inicial del CS_2 genera el sulfuro de carbonilo como intermediario que es posteriormente utilizado según las siguientes reacciones:

Disulfuro de carbono	$CS_2 + H_2O$	$\longrightarrow$	$COS + H_2S$
Sulfuro de carbonilo	$COS + H_2O$	$\longrightarrow$	$CO_2 + H_2S$
Ácido sulfhídrico	$2H_2S + O_2$	$\longrightarrow$	$2S^\circ + H_2O$
Azufre	$2S^\circ + 2H_2O + 3\ O_2$	$\longrightarrow$	$2H_2SO_4$

El consorcio mostró actividad entre 12 y 45 °C y pH de 3 a 7.5 y alta resistencia a la inhibición por H_2S, CS_2 y sulfatos como lo reportan Alcántara y col. (38). El consorcio es capaz de oxidar los sulfuros a tasas específicas de 13.8 mg $H_2S/g_{\text{proteína}}$ min y de 3.4 mg CS_2 /$g_{\text{proteína}}$ min a 30 °C y pH de 7.

Para identificar algunas de las especies microbianas que participan en el proceso de sulfoxidación en el reactor, se hicieron pruebas de aislamiento en diferentes medios de cultivo. El proceso no es trivial debido a que está ampliamente documentado que los organismos quimiolitotróficos difícilmente crecen aislados en medio sólido, ya que los agentes gelificantes comúnmente empleados se encuentran contaminados con trazas de compuestos orgánicos. Para evitar lo anterior se utilizó un medio mineral adicionado con tiosulfato de sodio y solidificado con goma gellan al 1%. Se logró identificar pequeñas colonias blancas rodeadas de azufre. En medios ricos se encontraron bacterias heterótrofas, levaduras y hongos. De los aislados se logró propagar una cepa que tenía características de oxidación de sulfuros similares a la del consorcio.

Como un primer acercamiento a la identificación del microorganismo aislado, se hizo una tinción de Gram, la cual demostró que se trata de un bacilo Gram negativo (figura 10).

La identificación del microorganismo se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del gen ribosomal 16S, utilizando los oligonucleótidos 8f y 1510r (39) y DNA genómico como molde. El producto obtenido se clonó, secuenció y comparó mediante un análisis tipo FASTA *(http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.html)*

y también con la base de datos del Ribosomal Database Project *(http://rdp.cme.msu.edu)*. Los resultados (tabla 5) muestran que se trata de un *Thiobacillus*, muy parecido a *Halothiobacillus neapolitanus* (96.8% de similitud), a *Thiobacillus* W5 (94.1%) y a otras especies del género *Halothiobacillus*. La bacteria aislada se designó *Thiobacillus* sp. UAMI.

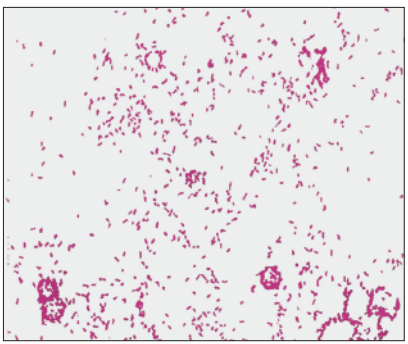


Figura 10
TINCIÓN DE GRAM PARA EL MICROORGANISMO AISLADO
La fotografía muestra un aumento de 100X.

Tabla 5
PORCENTAJE DE SIMILITUD DE LA SECUENCIA DEL GEN RIBOSOMAL 16S DE LA BACTERIA AISLADA (THIOBACILLUS SP. UAMI) CON LOS MICROORGANISMOS MÁS PARECIDOS SEGÚN LA BASE DE DATOS (RIBOSOMAL DATABASE PROJECT)

	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
1. *Thiobacillus* sp. UAMI	—					
2. *Halothiobacillus neapolitanus*	96.8	—				
3. *Thiobacillus* sp W5	94.1	96.5	—			
4. *H. kelly*i	91.1	88.9	88.4	—		
5. *H. hydrothermalis*	90.3	87.8	86.3	92.4	—	
6. *H. halophilus*	90	87.6	86.4	92.1	98.6	—

Estudios de planta piloto

Un biofiltro de escurrimiento como el mencionado previamente fue la opción de tratamiento biológico seleccionada. Con base en la información obtenida en el laboratorio, se diseño y construyó en la Universi-

dad un reactor a nivel planta piloto. El reactor, de 120 litros, (figura 11), se empacó con un soporte plástico de elevada área volumétrica (240 m^2/m^3), donde se inmovilizaron por recirculación continua los microorganismos previamente seleccionados. Para la estabilización del sistema es necesario que se desarrolle la biopelícula lo cual es un proceso lento en estos microorganismos que tienen bajo rendimiento. El tiempo aproximado es cercano a seis semanas. Los estudios hidrodinámicos, de transferencia de masa y los cinéticos se llevaron a cabo inicialmente con aire contaminado con H_2S y CS_2 en concentraciones de hasta 800 ppmv de cada uno a fin de establecer los parámetros de escalamiento más relevantes. La operación del reactor piloto se llevó a cabo por varios meses manteniendo el pH controlado y adicionando nutrientes suficientes para poblar el soporte y mantener una actividad alta. En el equipo operando en régimen estacionario la mayor proporción (>90%) de los sulfuros es eliminada por la biopelícula mientras que el restante se elimina por la parte líquida.

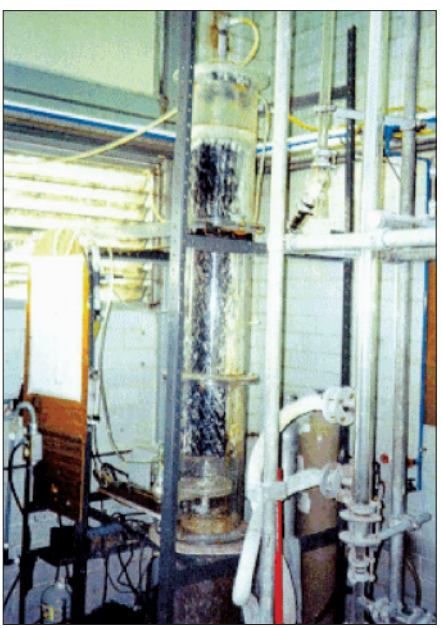


Figura 11

FOTOGRAFÍA DEL REACTOR PILOTO

El proceso seleccionado permite la eliminación de los compuestos de azufre presentes en la fase gaseosa con un alto rendimiento, transformándolos parcialmente en azufre elemental, compuesto que puede ser recuperado y aprovechado.

En una segunda parte del trabajo se estudió la eliminación de CS_2 por haberse demostrado que es el contaminante más recalcitrante. La figura 12 muestra el desempeño del biofiltro ante cargas variables de CS_2. Se demostró que el reactor piloto alcanzaba capacidades de eliminación mayores a 250 g CS_2/m^3 h.

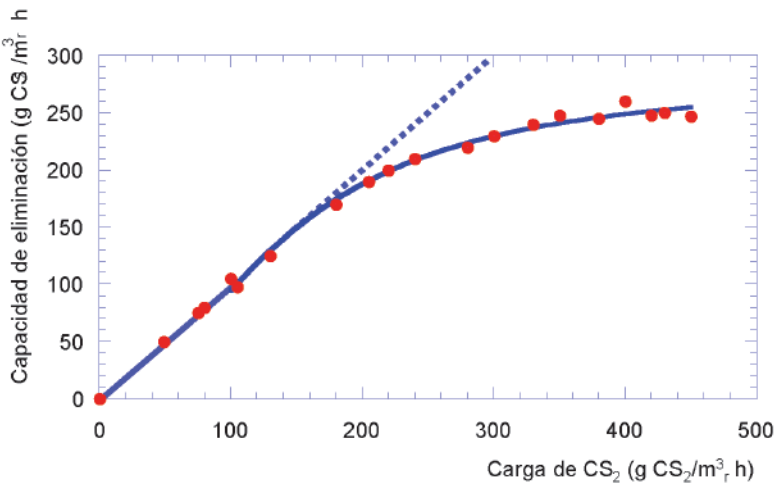


Figura 12
CAPACIDADES DE ELIMINACIÓN EN FUNCIÓN DE LA CARGA

Construcción de prototipo industrial

La información obtenida, tanto en laboratorio como en planta piloto, permitió el diseño y construcción de una planta piloto, referido como Biocyd-I, a escala semi-industrial en las instalaciones de la empresa (figura 13). Este reactor, de 7 m^3 de volumen, ha sido operado con flujos de gas de hasta 56 m^3/min con concentraciones de 800 ppm de CS_2 y de más de 1 200 ppm de H_2S , permitiendo obtener remociones superiores a 90% y 98% respectivamente; la patente descrita por Torres y col. (40), describe los detalles del prototipo.

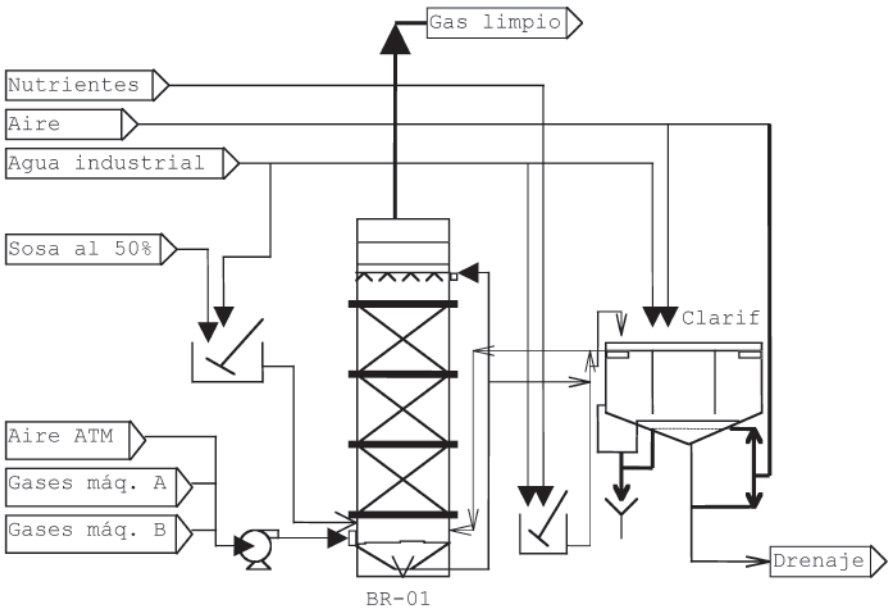


Figura 13

PROTOTIPO DE BIORREACTOR DE LECHO ESCURRIDO

La instalación permite la succión de aire contaminado desde tres fuentes diferentes, cuyas concentraciones tanto en CS_2 como en H_2S son variables. Proveniente de la máquina A se tiene aire con niveles bajos de contaminante, mientras que el aire proveniente de la máquina B tiene niveles altos. La introducción de aire atmosférico permite preparar mezclas de una concentración determinada. Es posible obtener mezclas conteniendo desde cinco hasta 7000 ppmv de H_2S y desde cinco hasta 3000 ppmv de CS_2.

El fondo de la columna está provisto de un colector que permite mantener un nivel determinado de biolicor. Esta solución pasa a través del lecho empacado a contracorriente con el aire contaminado y se acumula en el colector, donde se lleva a cabo el ajuste del pH (entre 5 y 9). La neutralización se efectúa añadiendo una solución de sosa cáustica u otro neutralizante como potasa, amoniaco, lechada de cal o hidróxido de calcio. El biolicor, con el pH regulado, es bombeado a la parte superior de la columna en donde es atomizado de manera homogénea sobre el empaque. De esta manera, no sólo se mantiene una humedad elevada sobre la población microbiana inmovilizada sobre el soporte, sino que se previenen posibles inhibiciones al arrastrar eficientemente los metabolitos secundarios y subproductos generados durante la biodegradación.

Por encima del distribuidor se encuentra instalado un eliminador de niebla que impide la expulsión de partículas o rocío a la atmósfera. Arriba del eliminador una pequeña chimenea permite la salida del aire purificado a la atmósfera.

El funcionamiento óptimo de la columna se logra con valores másicos para la relación líquido/gas (L/G) entre 3 y 7. La caída de presión en la columna es despreciable, dadas las características del empaque utilizado.

Como se puede observar en la tabla 6, el aire purificado sale esencialmente libre de H_2S y de CS_2 para las condiciones estudiadas.

Tabla 6
RESULTADOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN LA ELIMINACIÓN DE ÁCIDO SULFHÍDRICO Y DISULFURO DE CARBONO EN PLANTA PILOTO INDUSTRIAL

Gas residual	*concentración (ppmv)*					
	Entrada		*Salida*		*%remoción*	
(m^3/h)	H_2S	CS_2	H_2S	CS_2	H_2S	CS_2
500	1 700	300	n.d.	27	100	91
750	1 500	300	n.d.	15	100	95
1 000	1 600	400	n.d.	20	100	95
1 250	1 100	200	n.d.	–	100	100
1 500	1 500	250	n.d.	10	100	96
1 750	1 200	350	n.d.	18	100	95
2 000	1 050	250	n.d.	–	100	100
2 500	1 700	200	n.d.	20	100	90
3 000	1 100	300	n.d.	40	100	93

Como resultado del metabolismo de las bacterias sulfooxidantes presentes en la columna se genera azufre elemental además del sulfato. El azufre suspendido es acarreado por el flujo descendente formando parte del biolicor que se acumula en el colector. Aunque la mayor parte de esta corriente se recircula hacia el domo de la columna, una parte se envía hacia el clarificador. En este equipo se sedimenta y recupera el azufre elemental con un tiempo de residencia de 15 a 120 minutos y está provisto de un rebosadero, donde se obtiene líquido libre de sólidos suspendidos, que se recircula a la columna.

Se logran remociones constantes de hasta 5.1 g H_2S $m^{-3}_{reactor}$ min^{-1} y de 3.0 g CS_2 $m^{-3}_{reactor}$ min^{-1}. A lo largo de un año típico se eliminan al menos 16 toneladas de H_2S y CS_2 de los gases efluentes de esta planta.

Escalamiento a nivel industrial

A partir de los datos obtenidos en el reactor Biocyd I se construyeron varios reactores para el tratamiento de las emisiones del procesamiento de viscosa. Destacan el reactor para la planta de Rayón de 49 m^3 y que trata 300 m^3/min. Posteriormente se construyó otro reactor de 70 m^3 para la planta de celofán con capacidad de tratar hasta 750 m^3/min de gas. Este equipo removió 70 000 kg/año de azufre de los cuales 60% proviene CS_2 y 40% de H_2S. En 1997 se construyó un sistema para tratar altas concentraciones de CS_2 para una planta de esponjas en Estados Unidos. El sistema consistió en dos reactores en serie y los principales resultados se encuentran reportados por Hugler y col. (33).

Adaptación tecnológica

A la fecha, las investigaciones se han extendido hacia otros compuestos gaseosos contaminantes. Se diseñó un reactor de 15 m^3 para emisiones de solventes de una imprenta en Monterrey NL Que remueve 18 ton/año de una mezcla con 12% de acetato de etilo, 53% de tolueno y 35% de isopropanol. Otros reactores que se han construido permiten la eliminación de olores de plantas de tratamiento de agua y las emisiones de cloruro de vinilo por una fábrica productora de PVC. (41, 42).

Relevancia de la investigación en biofiltración

Los equipos de tratamiento biológico han sido reconocidos como la mejor tecnología disponible para el tratamiento de ciertas corrientes de aire contaminado. En este momento la biofiltración resulta la mejor elección para el tratamiento de olores de origen orgánico y moléculas altamente biodegradables que se encuentran diluidas y a condiciones ambientales "suaves". Los sistemas biológicos tienen costos de inversión y operación bajos, son fáciles de operar y energéticamente eficientes.

La mejora de estos sistemas requiere un enfoque que reconozca la complejidad de los fenómenos involucrados. El desempeño de los equipos puede ser analizado a varias escalas como se presenta a continuación (tabla 7). En cada escala operan fenómenos de transporte y reacción que determinan el comportamiento global de los reactores. Además estos eventos se ven distribuidos en diferentes dominios de tiempo, desde los

minutos necesarios para establecer un equilibrio del contaminante entre las fases gas y líquido hasta la lenta evolución de las poblaciones microbianas o las posibles mutaciones que se van imponiendo. Los aspectos biológicos, susceptibles de ser mejorados por la biotecnología, tienen que ser analizados desde un punto de vista sistémico.

Tabla 7
ASPECTOS A CONSIDERAR EN EL DISEÑO Y OPERACIÓN DE EQUIPOS BIOLÓGICOS DE TRATAMIENTO
Adaptado de Noyola y col. (43)

Escala Reactor ⟷	*Meso- escala* ⟷	*Micro-escala*
Flujo de gas y líquido	Transferencia de masa y calor	Tasas de crecimiento, rendimiento, mantenimiento, respiración endógena.
Distribución de gas y líquido	Equilibrio físico- químico	
Caída de presión	Condiciones locales de humedad, pH, presencia de inhibidores, disponibilidad de nutrientes y O_2	Inhibición
Capacidad de eliminación		Rutas de degradación: catabolismo, co- sustrato, cometabolismo.
% de eliminación	Adsorción en soporte	
Consumo de energía	Estado de la película:	Tasas de lisis, actividad de depredadores y recambio de población
Heterogeneidad en el medio (humedad, pH, población, caída de presión)	Cantidad	
	Actividad local	
Selección de empaque	Material extracelular	Actividades enzimáticas
Compactación del medio y macro canales	Microcanales	Mutaciones y otros fenómenos estocásticos
Inóculo		

La demanda se ha visto limitada por factores externos al desempeño como son la situación económica y la falta de legislación eficiente y efectiva. Pero además, estas biotecnologías no han sido suficientemente divulgadas y no han sido adoptadas por los ingenieros sanitarios y ambientales que resuelven los problemas de las empresas.

Los tratamientos tendrán mayor demanda y difusión en la medida en que:

— Existan reglamentos y normas basados en tecnologías de costo razonable.

— Existan equipos demostrativos en varios “modelos” dependiendo del nivel tecnológico del usuario (desde usuario final llave en mano hasta industria que participa en el desarrollo). Documentación de las experiencias (por ejemplo 41, 44).

— La disponibilidad de una ingeniería apropiada para el usuario potencial.

— Integración a trenes de tratamiento (por ejemplo enfriamiento ⟶ remoción de partículas ⟶ biofiltración).

— Para biofiltros: mejora de eficiencia basados en la comprensión de los mecanismos fundamentales. Ampliación de rango de uso tanto en flujos, concentración, tipo de contaminante, operación intermitente y condiciones del influente.

— Para filtros de escurrimiento: mejora de la estabilidad (control de arranque, de biomasa) nuevos soportes. Mejora en conocimientos básicos incluyendo tipos alternativos de metabolismo. Ampliar el rango de aplicación tanto en tipo de flujos, concentración, tipo de compuestos, condiciones del influente, forma de operación, ahorro de energía.

Conclusiones

Los procesos biotecnológicos son tecnologías avanzadas para complementar los métodos disponibles actualmente para el tratamiento de aire contaminado. Estos procesos, considerados como tecnologías limpias, son poco intensivos en energía, no trabajan con substancias peligrosas, requieren condiciones cercanas a las ambientales y son generalmente de costo reducido. Entre los retos de las biotecnologías para el tratamiento de aire contaminado, se encuentran aspectos microbiológicos, aquellos relacionados con el material filtrante, el diseño de reactores, así como nuevas aplicaciones.

Bibliografía

1. Arriaga J.L., Martínez G., Escalona S., Martínez H., Seila R., *Compuestos orgánicos volátiles en la atmósfera de la ZMCM.* El Colegio Nacional, México D.F., 23-38 (1996).
2. Vega E., Mugica V., Carmona R., Valencia E. Hydrocarbon source apportionment in México City using the chemical mass balance receptor model. *Atmosph. Environ.* 34: 4121- 4129 (2000).
3. Spadaro J., Rabl A., Air pollution damage estimates: the cost per kg of pollutant. *Int. J. Environ. Technol. Management.* (2000).
4. Dullien F.A.L. *Introduction to Industrial Gas Cleaning,* Academic Press, E.U., (1989).

5. Rafson, H.J. *Odor y VOC control Handbook,* Mc Graw Hill, E.U.A. (1998).
6. Devinny, J.S., M.A. Deshusses, T.S. Webster. *Biofiltration for Air Pollution Control.* CRC Lewis Publishers, 300 páginas (1999).
7. Van Groenestijn J.W., Hesselink P.G. Biotechniques for air pollution control *Biodegradation* 4: 281 (1993).
8. Kennes C., Veiga C., Prado O. Non biological treatment technologies. En *Bioreactors for Waste Gas Treatment.* Kennes C. y Veiga M. C. Editores. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 17-46 (2001).
9. Garnier P., Auria R., Augur C., Revah S. Cometabolic biodegradation of Methyl t-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 498 (1999).
10. Kennes C. Thalasso F. Waste gas biotreatment technology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 72: 303-319 (1998).
11. Kennes C., Veiga C. Bioreactors for Waste Gas Treatment. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 311 páginas (2001).
12. Auria R., Frere G., Morales M., Acuña M. E., Revah S. Influence of mixing and water addition on the removal rate of toluene vapors in a biofilter. *Biotechnol.Bioeng.* 68: 448- 451 (2000).
13. Ortiz I., Revah S., Auria R. Effects of packing material on the biofiltration of Benzene, Toluene and Xylene (BTX) vapors. *Environ. Technol.* (en prensa) (2003).
14. Morales M., Revah S., Auria R. Start up and gaseous ammonia addition on a biofilter for elimination of toluene vapors. *Biotechnol. Bioeng.* 60(4): 483-491 (1998).
15. Dupasquier P., Revah S., Auria R. Biofiltration of Methyl tert-Butyl Ether (MTBE) vapors by cometabolism with pentane: modeling and experimental approach *Environ. Sci. Technol.* 36(2): 247-253 (2002).
16. Cárdenas-González B., Ergas S., Switzenbaum M., Phillibert, N. Experiences with a Full-Scale Biofilter: Evaluation of Performance and Media Characterization. *Memorias de la USC-TRG Conference on Biofiltration,* Los Angeles, California, E.U., pp. 61-70 (1998).
17. Corporación Bistec, Cali Colombia; comunicación personal, (2001).
18. Leson G., Winer A.M. Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 41: 1045-1054 (1991).
19. Cárdenas B., Hernández S., Auria R., Revah S. Performance of two pilot scale biofilters for non-continuous VOCs emissions treatment. 93st. Annual meeting & exhibition of the Air and Waste Management Association, Salk Lake, Utah, E.U., paper # 733 (2000).
20. Vinage I., Wegman A., von Rohr P. Novel reactor for waste gas purification: modified rotating biological contactor. Memorias del 94th annual meeting

and exhibition of the Air & Waste Management Association. Orlando Fl. E.U., paper #196 (2001).
21. Higuchi T, Okazawa S., Kinoshita H., Sakamoto T. A new design for biological treatment of gaseous pollutants: biofiltration of H_2S using moving biosheets. Memorias del 94th. Annual meeting and exhibition of the Air & Waste Management Association. Orlando Fl. E.U., Paper # 217 (2001).
22. Yamashita S., Kitagawa M. New biofiltration system for emission control of waste gas containing acrylonitrile. Memorias del 94th annual meeting and exhibition of the Air & Waste Management Association. Orlando Fl. E.U., paper # 193 (2001).
23. Fitch M., Sauer S., Zhang B. Membrane biofilters: material choices and diurnal loading effects. Memorias de la USC-TRG Conference on biofiltration. Los Angeles California, E.U., pp. 83-90 (2000).
24. García I., Hernández S, Favela E., Auria R., Revah S. Biofiltration of toluene by the fungus *Scedosporium apiospermum*. *Biotechnol. Bioeng.* 76(1): 61-69 (2001).
25. Garnier P., Auria R., Augur C., Revah S. Cometabolic biodegradation of methyl tert- butyl ether by a soil consurtium: Effect of components present in gasoline. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46(2): 89-94 (2000).
26. Lee E., Jun Y., Cho K., Ryu H. Degradation characteristics of BTEX by *Stenotrophomonas maltophila* T3-c. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 52: 401-406 (2002).
27. Van Lith C., David S.L., Marsh R. Design criteria for biofilters, *Trans IChem E.* 68: 127-138 (1990).
28. Morales M., Hernández S., Cornabé T., Revah S., Auria R. Effect of drying on biofilter performance: modeling and experimental approach. *Environm. Sci. Technol.* (en prensa) (2003).
29. Ottengraf S.P.P. Van Den Oever A.H.C. Kinetics of organic compound removal form waste gases with biological filter. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 25, 12: 3089-3102 (1983).
30. Ottengraf S.P.P. Diks R.M.M. Biological purification of waste gases. *Chimicaoggi* 41-45 (1990).
31. Ergas J.S., Schroeder E. D., Chang D.P.Y. Control of air emissions of dichloromethane and toluene by biofiltration. Memorias del 86th Annual Meeting & Exhibition of Air and Waste Management Association, Denver, Colorado, E.U. (1993).
32. Baltzis B.C., Shareedfeen Z. Biofiltration of VOC mixtures modeling and pilot scale experimental verification. Memorias del 87th Annual meeting & exhibition of the Air and Waste Management Association, Cincinnati, Ohio, E.U., paper # A907 (1994).
33. Hugler W., Acosta C. Revah S. Biological removal of Carbon Disulfide from waste air streams. *Environ. Progress (AICHE)* 18(3): 173-177 (1999).

34. Cárdenas, B., Hernández, S., Munguía, J.L., Revah S. Operación de un biofiltro para COVs: intermitente y continua. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Veracruz, México (2001).
35. Hernández, A.L., Cárdenas, B., Hernández S., Auria, R., Revah S. Control de vapores de gasolina utilizando un biofiltro a escala piloto. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Veracruz, México (2001).
36. Steudel R. The chemical sulfur cycle. En: *Environmental technologies to treat sulfur pollution*, Lens P. N. L. y Hulshoff Pol L. editores. IWA Publishing. Londres, Inglaterra. pp 1-32 (2000).
37. Morgan J.M., Revah S., Noyola A. Algunas tecnologías para la remoción de H_2S por vía fisicoquímica y microbiológica. *Revista del IMIQ* Vol. 9, 12: 207-215 (2001).
38. Alcántara S., Estrada I., Vásquez M. S., Revah S. Carbon Disulfide Oxidation by a Microbial Consortium from a Trickling Filter. *Biotechnol. Lett.* 21: 815-819 (1999).
39. Lane, D.J. 16S/23S rDNA sequencing. En: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. E. Stackebrandt, M. Goodfellow (eds.) pp. 115-175. J. Wiley and Sons. Chichester (1991).
40. Torres M., Revah S., Hinojosa A, Paez F., Morales, US Patent 5, 236, 677 Biological Process for the Elimination of Sulphur Compounds present in a Gas Mixtures (Aug. 17, 1993).
41. Revah S., Hinojosa A., Morales V. Air Biodesulphurisation in Process Plants. En: *Bioremediation: the Tokyo '94 Workshop, OECD Documents,* Paris France, pp. 569-576 (1994).
42. Marroquín E., Morales V., Revah S. Air Pollution: Biotreatment Strategies and Environmental Impact. OECD Workshop on Wider application and Diffusion of Bioremediation Technologies. Amsterdam, Holanda. Noviembre, pp. 19-22 (1995).
43. Noyola A., Quintero R., Revah S., Soberón J. Biotecnología, medio ambiente y biodiversidad. En *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el Siglo XXI: Retos y oportunidades*. F. Bolívar y otros, Eds. Conacyt, pp. 187-210 (2001).
44. Allen J. Lessons learned in piloting low cost biofilters for industrial facilities. Memorias del 94th Annual meeting & exhibition of the Air and Waste Management Association. Orlando Fl. E.U., paper # 1093 (2001).

PECES TRANSGÉNICOS EN ACUACULTURA
EL CASO DEL SUPERSALMÓN

A. Gracia Gasca

Introducción

Los productos de origen acuático, provenientes tanto de las pesquerías como de la acuacultura, constituyen una fuente importante de alimentación y de recursos económicos para la sociedad. Aun a pesar de las fluctuaciones por causas naturales y antropogénicas que se presentan en la producción de estos alimentos, su relevancia como actividad primaria se mantiene y, por otro lado, también genera preocupación con respecto a su futuro.

La evolución de la actividad pesquera en el siglo pasado mostró un incremento sostenido en la captura a partir de la década de 1950, de aproximadamente 6% por año, con lo cual aumentó de alrededor de 18 millones de toneladas hasta cerca de 56 millones a finales de la década de 1960. En el periodo de 1970-1980 la tasa de incremento disminuyó y finalmente se acercó a cero en el decenio de 1990. En este último periodo las cifras registradas por la FAO señalan que la captura total, tanto de origen marino como de agua dulce, alcanzó alrededor de 90 millones de toneladas con tendencia a la baja. La producción proveniente de la acuacultura, por el contrario, ha mostrado un incremento constante y su contribución a la producción total se ha incrementado de 5% en 1950 a cerca de 25% en la última década.

A pesar de que varios autores mencionan que la producción global de las pesquerías se mantiene en un estado estable, con variaciones ligeras alrededor de su nivel, el número de especies que se encuentran en estado de sobre-explotación continúa en aumento. Por otro lado, el porcentaje de especies que pudieran tener posibilidad de incrementar su explotación es relativamente bajo, mientras que otros autores señalan una clara tendencia negativa (1). Esta situación ha generado gran preocupación a nivel mundial en cuanto a la posibilidad real de que las poblaciones sobre-explotadas logren recuperar sus niveles originales (2).

Adicionalmente la explotación de recursos pesqueros ha pasado de una situación de la que prácticamente la actividad era ignorada, a un estado de escrutinio constante por la sociedad civil. Cada vez es mayor el interés por el impacto sobre los daños que se puedan ocasionar, tanto por las actividades de pesca como de la acuacultura, a los mismos recursos pesqueros y al ecosistema acuático.

Esta consideración ha sido tratada en reuniones internacionales, y recientemente en la Cumbre Mundial sobre Desarrollo Sustentable llevada a cabo en Johannesburgo, Sudáfrica, ha merecido acuerdos internacionales que buscan la recuperación de las poblaciones de recursos pesqueros y también minimizar los impactos al ecosistema (3). En este nuevo contexto, el futuro de la pesca y la acuacultura requiere de una revisión cuidadosa en cuanto a las estrategias de manejo.

Por otro lado, el auge de la acuacultura permite vislumbrar un panorama en el que el peso relativo de ciertos productos acuáticos cultivados se incremente en la producción mundial, de tal manera que pueda inclusive sobrepasar a la de origen silvestre. De esta forma la obtención de productos pesqueros, ya sea de origen silvestre o de acuacultura, se enfrenta a un panorama complejo, donde se deben balancear distintos factores que permitan su vigencia en la producción de alimentos, en la generación de satisfactores para la sociedad y en general en su contribución a la seguridad alimenticia.

Sin embargo, la producción de la acuacultura aún depende en muchos sentidos de los ecosistemas o suministros de origen natural, lo cual ha causado controversias de si la acuacultura aumenta la producción pesquera o si contribuye al agotamiento de los recursos pesqueros. Esta paradoja implica que tanto los organismos acuáticos cultivados como los silvestres, normalmente dependen de los mismos recursos tanto de alimento como hábitat y comparten muchos otros factores, como la consideración sobre la diversidad genética en los sistemas de cultivo, industria y el valor de los productos en el mercado.

Potencial de la biotecnología para el desarrollo de la acuacultura

El uso responsable de la biotecnología es una opción adecuada para propiciar la explotación sustentable de los recursos acuáticos, incrementar la producción de alimentos de origen marino, obtener nuevos com-

puestos útiles para la industria, así como para prevenir y solucionar muchos de los crecientes problemas de contaminación en los ecosistemas marinos. Entre los diversos problemas que enfrenta el desarrollo sostenido de la acuacultura, destacan primariamente, la limitación del área física para su desarrollo, la contaminación y el impacto de sus derivados y desechos en el medio ambiente. La biotecnología constituye una excelente opción para contender con ellos, mediante el incremento de la producción por unidad de área, propiciar una industria acuícola más limpia, eficaz y todo esto en armonía con los recursos naturales y los ecosistemas (4).

Un punto de trascendental importancia tal y como se ha señalado en capítulos anteriores, es que los avances en el conocimiento de la estructura del material genético y de los métodos de aislamiento, síntesis y expresión de los genes, han permitido que se aíslen, modifiquen y se desarrollen genes específicos que pueden ser transferidos al genoma de microorganismos, plantas o animales (5). Cuando estos genes se integran en el genoma del huésped, y por ello se heredan y se expresan en las siguientes generaciones, se obtienen los llamados organismos transgénicos o genéticamente modificados. Como se ha señalado, estos organismos adquieren nuevas características que dependen del gene introducido y éstos se expresan tanto en el genotipo como en el fenotipo.

El uso de la ingeniería genética permite seleccionar y expresar en forma más rápida y eficiente los rasgos benéficos o de utilidad en comparación con los métodos tradicionales de selección y cruzamiento. Mediante estas técnicas, es posible insertar copias múltiples de genes provenientes de organismos de diferentes especies o de la misma, en el genoma de los organismos receptores. Con base en esta metodología la producción de animales y plantas con propiedades específicas se constituye en una alternativa revolucionaria en la industria biotecnológica y en particular en la acuacultura.

En la acuacultura los peces modificados genéticamente por ingeniería genética, representan una opción muy importante para la producción de organismos que propicien un desarrollo más relevante de esta industria en un ambiente de mayor respeto a la naturaleza. Las técnicas de la ingeniería genética pueden ser empleadas para: 1) mejoramiento de las tasas de crecimiento; 2) incremento de las tasas de supervivencia transfiriendo mecanismos y desarrollando nuevas drogas para contender e incrementar la resistencia a enfermedades y organismos patógenos; 3) control de la reproducción, maduración, diferenciación sexual y esterilidad; 4) adaptación a diferentes condiciones ambientales, tales como

resistencia a bajas temperaturas o diferentes salinidades; 5) incremento de la calidad nutricional de los peces; 6) mejoramiento de la eficiencia de conversión de alimento.

Producción de animales acuáticos transgénicos

Desde 1985 se ha generado una gran variedad de peces transgénicos (6, 7). El procedimiento general para producir estos organismos transgénicos consta de varias etapas esenciales. Primero, es necesaria la selección, el diseño y la construcción de genes específicos para un genotipo determinado. Al gene seleccionado normalmente se le incorpora información que permite su expresión en una forma específica y temporal. Una vez que se obtiene el gene modificado para estos propósitos, se integra al genoma del organismo receptor mediante el uso de vehículos moleculares adecuados, siendo los huevecillos o embriones de los peces los blancos preferidos. Una vez llevada a cabo la transgénesis, se procede a cultivar los productos, con el fin de que los genes se integren de manera estable a cada célula. Por ello, y en alguna etapa de desarrollo de los organismos receptores (embriones, alevines, adultos) se extrae el DNA y se analiza con el fin de confirmar la presencia del gene. Esto último es importante ya que las eficiencias de transmisión entre el gene es variable por lo cual resulta necesaria la identificación de los verdaderos peces transgénicos. Estos peces son los organismos transgénicos fundadores de la generación parental (Po) que son multiplicados para conservar el rasgo genético.

La integración estable del gene en los organismos transgénicos es un requisito indispensable para asegurar su transmisión a las generaciones y de esta forma generar una línea transgénica estable. Para ello se realizan cruzas entre los organismos transgénicos y organismos silvestres, y la generación F1 se analiza posteriormente para comprobar la presencia del gene y se usa para llevar a cabo cruzas genéticas adicionales.

La investigación sobre transgénesis en organismos acuáticos se ha realizado en un gran número de especies de peces de agua dulce y marinos, crustáceos, moluscos y erizos de mar (tabla 1). Algunos de estos organismos se han escogido por la facilidad que presentan para la experimentación por sus ciclos de vida corto y los huevos transparentes que facilitan la microinyección. Otros peces tales como el salmón y moluscos se han utilizado por su valor comercial.

Tabla 1
ESPECIES ACUÁTICAS EMPLEADAS EN INVESTIGACIÓN
DE ORGANISMOS TRANSGÉNICOS

Peces	
Tilapia	*Oreochromis niloticus*
Bagre de canal	*Ictalurus punctatus*
Bagre africano	*Clarias gariepinus*
Locha	*Misgurnus anguillicaudatus*
Pez dorado	*Carassius auratus*
Carpa común	*Cyprinus carpio*
Carpa roja	*Carassius carassius auratus*
Lucio	*Essox lucius*
Pez cebra	*Danio rerio*
Medaka japonés	*Oryzias latipes*
Trucha café	*Salmo trutta*
Salmón del Atlántico	*Salmo salar*
Salmón coho	*Oncorhynchus kisutch*
Salmón Chinook	*Oncorhynchus tshawytscha*
Trucha arcoiris	*Oncorhynchus mykiss*
Brema	*Acanthopagrus schlegeli*
Equinodermos	
Erizos de mar	*Arbacia lixula*
	Hemicentrotus pulcherrimus
	Paracentrotus lividus
	Strongylocentrus purpuratus
	Temnopleurus toreumaticus
Moluscos	
Abulón	*Haliotis rufescens*
	Haliotis iris
	Mulinia lateralis
Crustáceos	
Artemia	*Artemia franciscana*

Los peces en particular son sujetos de estudio utilizando las técnicas de la ingeniería genética y la transgenosis debido a que muchos de ellos tienen huevos grandes, transparentes y de fertilización externa, el desarrollo embriónico puede ser observado relativamente fácil, además de que pueden tener un valor comercial más alto. Estas características los

hacen muy atractivos como sujetos de estudio. Los peces que se han empleado para este tipo de experimentación pertenecen a varias especies, entre ellas destacan el bagre, el salmón, las carpas común y dorada, la tilapia y el pez cebra (8).

Selección y construcción de genes recombinantes y métodos de transferencia génica para la producción de peces transgénicos

La producción de peces transgénicos como se mencionó, se basa en la incorporación de un gene recombinante que producirá las características deseadas, en el tiempo deseado, con fines de aplicación biotecnológica o de investigación básica.

En la literatura se ha mencionado que los genes utilizados en transgénesis de peces se pueden dividir en diferentes grupos (9). El primero comprende a los llamados genes "informativos o descriptores" que son útiles para identificar y medir el éxito de la transferencia de genes y sus vectores. Los genes de cloranfenicol acetiltransferansa, β-galactosidasa y luciferasa bacterianas pertenecen a este conjunto (10, 11).

Un segundo grupo lo integran los genes de mejoramiento de funciones que son aquellos que se diseñan principalmente para aumentar o añadir nuevas funciones en los organismos genéticamente modificados. Ejemplos de estos genes son los que codifican para las hormonas de crecimiento (GH) de mamíferos y peces y el factor de crecimiento tipo insulina (12, 13). Estos genes se usan para incrementar el potencial endocrino de los peces y por lo general su expresión resulta en mejoramiento de las tasas de crecimiento. Otros genes relevantes son los que codifican para la lisosima que incrementa la resistencia a enfermedades, y las hormonas de tipo prolactina que estimulan el desove, osmorregulación, comportamiento y el metabolismo en general.

Un siguiente grupo de genes son aquellos que tienen regiones regulatorias interesantes, y que codifican para proteínas con propiedades y características particulares de los peces. Entre ellos se encuentran los que codifican para las siguientes proteínas: la metalothioneína de salmón y trucha (14, 15), la actina B de carpa (16), la histona de salmón (15), la protamina (17) y particularmente los genes que codifican para las proteínas anticongelantes PAC (AFP por sus siglas en inglés), aislados de diferentes especies de peces. Estas últimas son glicoproteínas que pue-

den interactuar con los cristales de hielo y reducir el punto de congelación en la sangre de los peces (18). La intención de introducir estos genes en peces es incrementar los límites de tolerancia al frío de especies en cultivo, tales como el salmón, para establecer una industria acuacultural en regiones subárticas.

Un cuarto grupo de genes comprende aquellos que interfieren con la expresión de genes del organismo objeto. Estos genes pueden generar un RNA catalítico con capacidad de digerir RNA específicos y obstruir la traducción normal de un determinado RNA mensajero. Este tipo de genes que inciden en la pérdida de funciones no ha sido probado en peces; sin embargo, potencialmente pueden ser empleados en la generación de líneas resistentes a enfermedades de importancia estratégica para la acuacultura (19).

Una vez seleccionado y construido el gene recombinante que se desea incorporar, el siguiente paso es introducirlo en el genoma del organismo blanco. Para ello, tal y como se ha señalado en capítulos previos, existe una gran variedad de métodos que se emplean para la transferencia de genes a animales, y en particular para lograr esta transferencia a los huevos de peces. Entre éstos se encuentran la ruptura de membranas por microinyección, formación de poros en la membrana celular por exposición a corrientes de alto voltaje (electroporación), perforación múltiple de membranas por microproyectiles o interacción de cargas entre membranas DNA/lípidos (lipofección) y uso de retrovirus.

El método más común que se emplea en peces desde 1985 es la microinyección por la cual se transfiere el DNA a los huevos individuales o a los embriones recién fertilizados. Generalmente los huevos y el esperma de los peces son recolectados por separado y se lleva a cabo la fertilización combinando ambos en recipientes con agua y algunos medios mecánicos simples para asegurar la fertilización. Los huevos se inyectan en las primeras horas una vez que ocurrió la fertilización. El equipo que se utiliza para inyectar el DNA consiste de un microscopio de disección estereoscópico y dos micromanipuladores, uno con una aguja microscópica de cristal y el otro con una micropipeta para sujetar el huevo fertilizado. La cantidad de DNA que se inyecta a los huevos de peces depende del tamaño de éste y generalmente es cerca de 10^6 a 10^8 moléculas del gene (12).

En los embriones de peces el DNA se inyecta en el citoplasma, ya que los pronúcleos de los huevos fertilizados son invisibles y los huevos opacos en la mayoría de las especies de peces. Un problema particular en algunas especies es el corión duro de algunas especies de peces que hace

Tabla 2
ORGANISMOS TRANSGÉNICOS EN EXPERIMENTACIÓN EN ACUACULTURA

Especie	*Gene*	*Efecto deseado*
Salmón del Atlántico	PAC	Resistencia a congelación
	PAC y HC de salmón	Incremento de las tasas de crecimiento y eficiencia de conversión de alimentos
Salmón chinook	PAC y HC de salmón	Incremento de crecimiento y de eficiencia en la conversión de alimentos
Salmón coho	HC + PAC de Salmón chinook	Incremento de tasas de crecimiento
Trucha arcoiris	PAC + HC de salmón	Incremento de tasas de crecimiento y eficiencia de conversión de alimento
Trucha café	PAC + HC de Salmón chinook	Incremento de tasa de crecimiento
Tilapia	HC de Tilapia	Incremento de tasa de crecimiento y eficiencia de conversión de alimento
Tilapia	Gene modificado de Tilapia productor de insulina	Producción de insulina humana
Salmón	Gene lisosoma de trucha Gene pleurocidina de lenguado	Resistencia a enfermedades
Lobina rayada	Genes de insectos	Resistencia a enfermedades
Locha	HC de crecimiento y gene promotor de ratón + locha	Incremento de las tasas de crecimiento y conversión de alimentos
Bagre de canal	HC	Incremento de crecimiento
Carpa	HC de salmón y humana	Incremento de crecimiento, resistencia a enfermedades, tolerancia a niveles de O_2 bajos
Abulón	HC de salmón coho y otros promotores	Incremento de tasas de crecimiento
Ostión	HC de salmón coho y otros promotores	Incremento de tasas de crecimiento

HC: hormona de crecimiento, PAC: proteína anticongelante

más difícil la microinyección. Para facilitar el proceso se utilizan varias técnicas como: 1) retirar el corión de los huevos por medios enzimáticos o mecánicos; 2) efectuar una abertura en el corión por microcirugía; 3) inyección del DNA a través del micrópilo; 4) evitar el endurecimiento de la membrana agregando sustancias químicas; y 5) inyección de los huevos antes de la fertilización.

La microinyección es un método muy laborioso por lo cual se han examinado otras técnicas más rápidas que permitan el tratamiento de un gran número de peces; no obstante, la eficiencia de éstos es variable. La tasa de sobrevivencia de los embriones de peces depende según la especie en estudio; sin embargo, varía de 35 a 80%, mientras que la integración del DNA fluctúa entre 10 a 70% en los organismos cultivados (6, 7).

Los estudios realizados en varias especies de peces sugieren que los genes inyectados a los embriones se mantienen como una unidad extracromosomal en las primeras etapas. En etapas de desarrollo posteriores algunos de los genes se integran aparentemente al azar en el genoma de los organismos objeto, mientras que otros se degradan.

Construcción del "supersalmón" transgénico

Como se ha mencionado, uno de los principales intereses de los acuacultores es obtener el máximo de biomasa con el menor costo posible. Es por ello que el desarrollo de peces transgénicos se ha dirigido particularmente a incrementar las tasas de crecimiento y mejorar las tasas de conversión de alimentos, con el fin de reducir los ciclos de producción.

El trabajo realizado por Palmiter y colaboradores (20) para crear lo que se conoció como el "super-ratón", con base en el diseño e introducción de un gene que permitió incrementar al doble el tamaño de los roedores empleados generó muchas expectativas para su aplicación en peces. Sin embargo, varios de los genes derivados de mamíferos no tuvieron el efecto deseado para incrementar las tasas de crecimiento en peces. Por otro lado, las posibles suspicacias y reticencias que generaría entre el público por la utilización de material genético distinto a los peces, propiciaron que se buscara la utilización de un diseño genético que incluyera material genético derivado de peces lo más cercano al DNA original. Uno de los casos más representativos es la serie de experimentos que condujeron a la creación de peces transgénicos conocidos, como "super-

salmones", por la velocidad de crecimiento y talla que alcanzan en cortos periodos.

Los experimentos que condujeron a la creación del salmón transgénico se originaron a partir del interés de resolver uno de los principales problemas que enfrenta la industria de la acuacultura en Canadá durante el invierno. En esta temporada, una gran parte de las zonas costeras el agua se congela o alcanza temperaturas muy bajas (-1.8°C), lo que reduce el área disponible para cultivar salmón, ya que dichas temperaturas son letales para estos peces. Algunos peces como los lenguados (*Pleuronectes americanus*) y el abadejo oceánico (*Macrozoarces americanus*) son capaces de producir un grupo de proteínas anticongelantes (PAC) que pueden interactuar con los cristales de hielo, de tal forma que se reduce la temperatura de congelación en estos organismos.

En el proceso de detección y transferencia del gene "anticongelante" se descubrió que éste tenía un gran potencial para contender con problemas que afectan el crecimiento. A partir del gene anticongelante del abadejo oceánico, se construyó un gene recombinante ligando la región promotora de este gene "anticongelante" y el gene estructural que codifica para la hormona del crecimiento del salmón del Atlántico. La idea de construir y utilizar un gene recombinante a partir del material genético natural de peces para generar organismos transgénicos productores de la hormona de crecimiento, es porque este producto en principio debe ser considerado como más seguro para el medio ambiente y para consumo humano, además de tener un mejor potencial de aceptación por el público. Desde este enfoque el uso de material genético derivado de peces, en teoría, encontraría menos reticencia que si se usan promotores y/o de origen viral o de otros mamíferos.

Los genes de la hormona de crecimiento normalmente se expresan en la glándula pituitaria bajo el control del sistema nervioso central, de tal forma que para que se expresen en varios tejidos, es necesario modificar los elementos de expresión específicos del gene. El acoplamiento de la región estructural del gene de la hormona de crecimiento con las regiones regulatorias de genes que codifican para proteínas anticongelantes del abadejo tienen esta función, ya que permiten que la hormona de crecimiento se exprese en forma continua en diferentes tejidos del salmón (21) a lo largo del año y no sólo en los meses cálidos.

Una vez que se diseñó y construyó este gene recombinante que codifica para esta hormona de crecimiento (HC/AC), se introdujo el material genético a huevos fertilizados de salmón del Atlántico por la técnica de

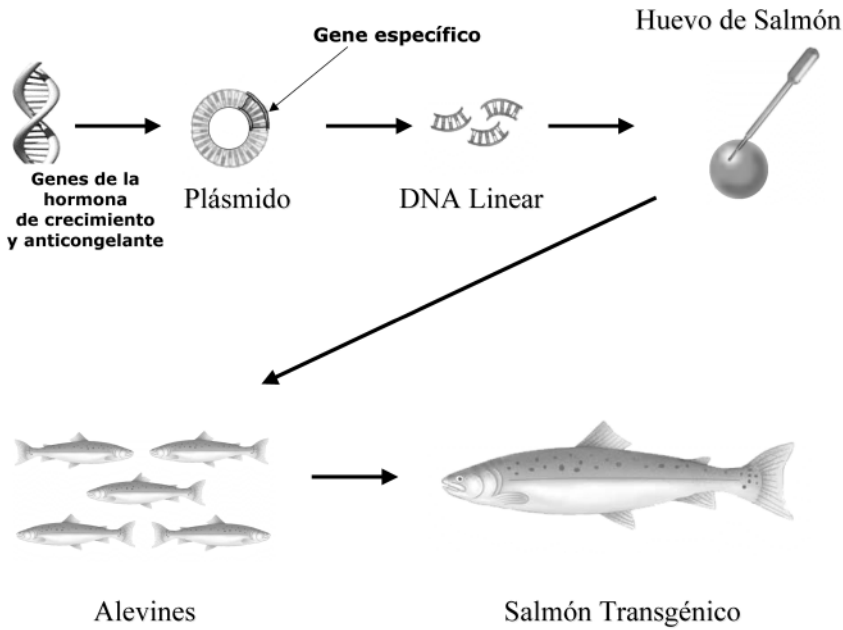


Figura 1

DIAGRAMA DE PRODUCCIÓN DE SALMÓN TRANSGÉNICO

Los genes específicos de la hormona de crecimiento de salmón y de la proteína anticongelante de la perca oceánica son aislados e insertados en el plásmido. El gene específico se multiplica en la bacteria y luego es separado y purificado para introducirlo en los huevos fertilizados del salmón. De los alevines genéticamente modificados se obtiene la línea de salmón transgénico mediante cruzas.

microinyección. Después de cruzar los organismos transgénicos con organismos silvestres se obtuvieron salmones que expresan la hormona de crecimiento y que crecen entre dos y seis veces más rápido que los salmones normales e incluso algunos con tasas individuales de crecimiento hasta trece veces mayor (figura 1) (12, 22).

El material genético diseñado y patentado por instituciones canadienses le confiere a los salmones la capacidad de crecer rápidamente durante el primer año y alcanzar una talla comercial (3-4 kg) un año antes de lo que ocurre en los organismos genéticamente no modificados de salmón del Atlántico (figura 2). Las expectativas para la acuacultura de estos organismos son muy atractivas ya que incluso muestran un incremento de 10-30% en la eficiencia de conversión de alimentos (23). No obstante, sigue presente una gran controversia con respecto

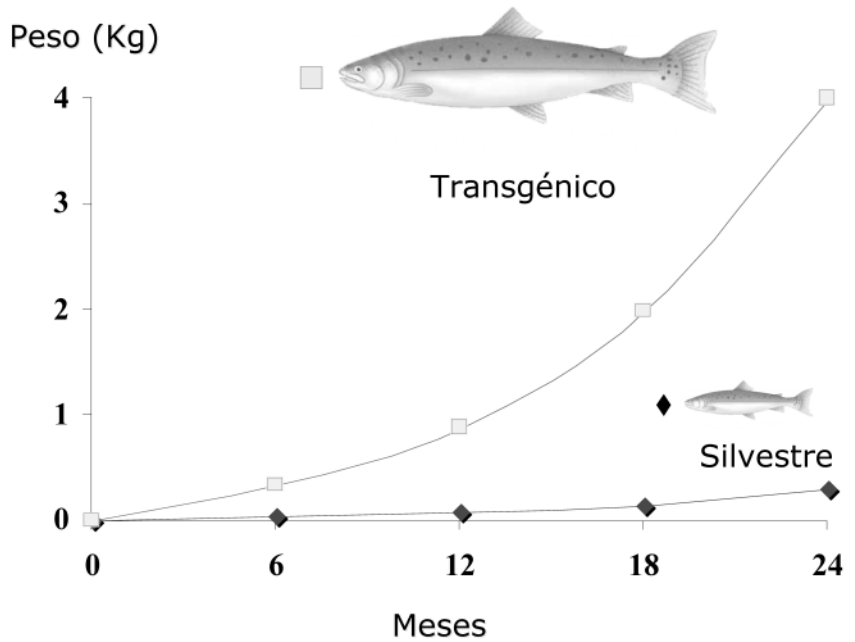


Figura 2

CRECIMIENTO COMPARATIVO DE SALMÓN
DEL ATLÁNTICO SILVESTRE Y TRANSGÉNICO

a la seguridad de utilizar esta tecnología para la producción comercial, por los posibles efectos que pudiera tener para el consumo humano y para el medio ambiente.

Las principales críticas al respecto son:

a) La talla más grande de los salmones transgénicos le confiere ventaja competitiva con los salmones silvestres para aparearse y para aprovechar espacio y alimento en el ambiente acuático.

b) El escape de salmones transgénicos a la naturaleza y su posible cruzamiento con organismos silvestres puede dañar las poblaciones silvestres y llevarlas a la extinción.

c) La esterilización de los salmones trasgénicos no es 100% efectiva.

d) Los salmones transgénicos son depredadores voraces por sus altas tasas de crecimiento y pueden consumir el alimento disponible en el ecosistema e incluso depredar a los salmones juveniles.

e) Los salmones contienen grandes cantidades de hormonas de crecimiento y proteínas anticongelantes.

Los contrargumentos que se han presentado son:

a) Los salmones transgénicos crecen más rápido que los silvestres, pero no alcanzan una talla mayor cuando llegan a la madurez. Por otro lado, se señala que estudios realizados de salmones escapados de las granjas se aparean sólo en 3% comparados con los salmones silvestres.

Respecto a la competencia por alimento se argumenta que los salmones transgénicos están acostumbrados a comer alimento artificial en forma de pelets, el cual buscarán en la naturaleza sin encontrarlo. Los salmones transgénicos por esta razón no están acostumbrados a la persecución de presas en el medio ambiente natural, lo cual los hace más vulnerables a los depredadores, por el alto gasto energético.

b) La aprobación del uso de salmones transgénicos requiere que éstos sean estériles con lo cual se evita el flujo genético a las poblaciones naturales.

c) La triploidia (tres cromosomas) produce una esterilización de 100% en hembras, ya que les impide el desarrollo de los ovarios y puede ser comprobada en las granjas por métodos científicos.

d) Los salmones transgénicos tienen más probabilidad de morir por inanición mientras aprenden a identificar el alimento natural y las tallas de escape son similares a las silvestres, por lo que no tienen ventajas sobre ellos. Por otro lado, se señala que los salmones transgénicos, dado que no se involucran en el comportamiento reproductivo, no regresan al reservorio de agua dulce donde se encuentran los juveniles y, por lo tanto, no los pueden depredar.

e) Los salmones transgénicos no producen proteínas anticongelantes (sólo se utiliza la región regulatoria del gene anticongelante) y producen la misma cantidad de hormonas de crecimiento que los salmones silvestres, sólo que la producen durante todo el año.

La controversia sobre la utilización de organismos transgénicos es amplia y a menudo se aducen argumentos de tipo emocional. Sin embargo, un punto importante es que la aceptación por parte de la sociedad dependerá de que se compruebe científicamente que los organismos genéticamente modificados producidos con técnicas acuaculturales son seguros para consumo humano y no afectan al ecosistema.

La evidencia que existe acumulada a la fecha, y así lo señala un reciente estudio sobre alimentos transgénicos publicado por la Organización Mundial de la Salud, es que los organismos transgénicos se han usado como alimento en muchos países y no han generado problemas relevantes a la salud humana. Ciertamente habrá que seguir desarrollando

técnicas adecuadas para el monitoreo y evaluación de los transgénicos y generando evidencia en cuanto a la inocuidad de los actuales y futuros alimentos transgénicos.

La importancia de la biotecnología aplicada a la acuacultura es innegable y representa una herramienta estratégica para ayudar a solventar las demandas crecientes de alimento de origen pesquero e incluso para cooperar en la preservación del medio ambiente acuático. El potencial de su aplicación para incrementar sustancialmente la producción de organismos por técnicas acuaculturales requiere que se esclarezcan las controversias con base en argumentos científicos, de tal forma que puedan ser empleados en beneficio de la humanidad.

Bibliografía

1. Watson, R., D. Pauly. Systematic distortion in world fisheries catch trends. *Nature* 414: 534-536 (2001).
2. Hutchings, J. Collapse and recovery of marine fishes. *Nature* 406: 882-885 (2000).
3. UNESCO. Un planeta, un océano – Desarrollo sostenible de los océanos y las zonas costeras: el compromiso de 129 Estados en Johannesburgo 2002. Colección de Documentos de Información de la COI No. 1172: 32, (2000).
4. Gracia, A. Biotecnología marina y acuacultura. Bolívar F. (Comp.). *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI. Retos y oportunidades.* SEP-Conacyt-Fondo de Cultura Económica: 211-222 (2001).
5. Bolívar, F., (Comp.) y colaboradores. *Biotecnología moderna para el desarrollo de México en el siglo XXI. Retos y oportunidades.* SEP-Conacyt-Fondo de Cultura Económica: 1-339 (2001).
6. Chen, T. T., D. A. Powers. Transgenic fish. *Trends Biotech.* 8: 209-215 (1990).
7. Fletcher, G. L., P. L. Davies. Transgenic fish for aquaculture. *Genet. Engineering* 13: 331-370 (1991).
8. Hacket, P. B. The molecular biology of transgenic fish. Hochachka, P., y T. Mommsen (Editores). *Biochemistry and molecular biology of fish.* Elsevier Science Pub. New York: 207-220, (1993).
9. Sin, F. Transgenic fish. *Reviews in fish biology and fisheries,* 7: 417-441, (1997).
10. Tewari, R., C. Michard-Vanhee, E. Parrot, D. Chourrout. Mendelian transmission, structure and expression of transgenes following their injection into the cytoplasm of trout eggs. *Transgenic Res.* 1: 250-260 (1992).
11. Iyengar, A., N. MaClean. Transgene concatemerisation and expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 4: 248-254 (1995).

12. Du, S. J., Z. Gong, G. L. Fletcher, M. A. Shears, M. J. King, D. R. Idler C. L. Hew. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Biotechniques* 10: 176-180 (1992).
13. Devlin, R. H., T. Y. Yesaki, C. A. Biagi, E. M. Donaldson, P. Swanson W. K. Chan, Extraordinary salmon growth. *Nature* 371: 209-210 (1994).
14. Zafarullah, M., K. Bonham L. Gedamu. Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-responsive region. *Mol. Cell. Biol.*, 8: 4469-4476, (1988).
15. Chan, K. W., R. H. Devlin. Polymerase chain reaction amplification and functional characterization of sockeye salmon histone H3, metallothionein-B, and protamine promoters. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 2: 308-318 (1993).
16. Liu, Z., B. Moav, A. J. Faras, K. S. Guise, A. R. Kapscinski P. B. Hackett. Development of expression vectors for transgenic fish. *Bio/Technology* 8: 1268-1272 (1990).
17. Jankowski, J. M., G. H. Dixon. The GC box as a silencer. *Biosci. Rep.* 7: 955-963 (1987).
18. Ewart, K. V., Q. Lin C. L. Hew. Structure, function and evolution of antifreeze proteins. *Cellular Molec. Life Sci.* 55: 271-283 (1999).
19. Chen, T. T., J. Lu, M. J. Shamblott, C. M. Cheng, C. Lin, J. C. Burns, R. Reimschuessel, N. Chatakondi R. A. Dunham. Transgenic fish: ideal models for basic research and biotechnological applications. *Zoological Studies* 34 (2): 214-234, (1995).
20. Palmiter, R. D., R. L. Brinster, R. E. Hammer, M. E. Trumbayer, M. G. Rosenfeld, N. C. Brinberg R. M. Evans. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 300: 611-615 (1982).
21. Tsukasa, M., R. H. Devlin. Transgene and host growth hormone gene expression in pituitary and nonpituitary tissues of normal and growth hormone transgenic salmon. *Molecular and Cellular Endocrinology* 149: 129-139 (1999).
22. Fletcher, G. L., P. L. Davies C. L. Hew. Genetic engineering of freeze-resistant Atlantic salmon. Hew, C. L. y G. L. Fletcher (editores). *Transgenic fish.* Singapore: World Scientific Publication Co.: 190-208 (1992).
23. Cook, J. T., M. A. McNiven, G. F. Richardson A. M. Sutterlin. "Growth rate, body composition and feed digestibility/conversion of growth-enhanced transgenic atlantic salmon (Salmo salar). *Aquaculture* 188: 15-32 (2000).

ANEXO
POR UN USO RESPONSABLE DE LOS ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Comité de Biotecnología
Academia Mexicana de Ciencias

Presentación

Este documento fue elaborado por los miembros del Comité de Biotecnología de la Academia Mexicana de Ciencias, con el propósito de señalar, por un lado, el impacto que han tenido los organismos genéticamente modificados (OGMs) o transgénicos, en diferentes sectores, para coadyuvar en la solución de diversos problemas. Asimismo, en el documento se presenta un conjunto de evidencias sustentadas científicamente que señalan la inocuidad y el bajo riesgo de los OGMs.

Finalmente, en el texto se presentan las recomendaciones para un uso responsable de los OGMs que en nuestro país está normado por el Protocolo de Cartagena y la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

I. Biotecnología y las justificaciones de la construcción y el uso de los organismos genéticamente modificados

La Biotecnología es una actividad multidisciplinaria, que usa el conocimiento generado en diversas disciplinas, para estudiar, modificar y utilizar los sistemas biológicos (microbios, plantas y animales). La biotecnología busca hacer uso responsable y sustentable de la biodiversidad, mediante el desarrollo de tecnología eficaz, limpia y competitiva para facilitar la solución de problemas importantes en los sectores de la salud, agropecuario, industrial y medio ambiente (Bolívar *et al.* 2002, Bolívar *et al.* 2004).

En 1973, gracias a la aparición de las técnicas de recombinación *in vitro* de ácido desoxirribonucleico (ADN), llamadas también de ADN recombinante, la biotecnología alcanza una nueva dimensión. Gracias a estas metodologías, es posible aislar genes específicos de un organismo y transferirlos a otro, generándose así los organismos transgénicos u organismos genéticamente modificados (OGMs).

Los transgénicos se diseñan y construyen con el propósito de generar una nueva capacidad del organismo receptor la cual reside en el material genético transferido. El objetivo de construir OGMs es el de ayudar en la solución de problemas en diferentes sectores, con la certeza de que estos organismos son seres vivos naturales y por ello, tienen un menor impacto en el medio ambiente, biodiversidad y en la salud humana y animal, que muchas otras tecnologías basadas en productos químicos (Watson *et al.* 1996, Daar *et al.* 2002, Bolívar *et al.* 2002, Bolívar *et al.* 2004).

Los transgénicos han sido utilizados comercialmente desde hace 25 años con el propósito de producir proteínas idénticas a las humanas. Existen en las farmacias, incluyendo las de México, medicamentos de origen transgénico o recombinante como la insulina, hormona de crecimiento, interferones y anticoagulantes de la sangre, anticuerpos humanizados entre otros productos, que se utilizan para contender con varias problemáticas de la salud humana y que se producen comercialmente con microorganismos transgénicos. Sin estos transgénicos no sería posible producir las cantidades requeridas por el mercado, ya que a partir de tejidos y fluidos humanos como la sangre, no se obtienen más que cantidades muy pequeñas. Así, los transgénicos que producen estas proteínas idénticas a las humanas, no pueden ser sustituidos por ninguna otra tecnología. Desde 1981, la utilización de las proteínas recombinantes transgénicas ha contribuido significativamente a mantener y mejorar la salud humana (Goeddel *et al.* 1979, Pennica *et al.* 1983, Watson *et al.* 1996, Winter y Milstein 1991, Daar *et al.* 2002, Ramírez y Uribe 2004).

En la producción de alimentos, el uso de proteínas recombinantes también ha tenido un impacto importante, como el uso de la quimosina recombinante en la producción de quesos (en Estados Unidos se utiliza para la elaboración de aproximadamente 70% de quesos); otras enzimas como las amilasas son utilizadas en la producción de jarabe, las pectinasas para la clarificación de jugos, las glucosa oxidasas y catalasas para la deshidratación de huevo, lipasas para la fabricación de aceites de pescado, glucosa isomerasas para producción de jarabes fructosados, glucanasas en producción de cerveza, entre las más importantes. Por otro lado, las

proteasas recombinantes son utilizadas en la elaboración de detergentes biodegradables (López Munguía, 2004, Por qué Biotecnología, 2006).

Las plantas transgénicas se comercializan desde 1996, y diez años después se siguen usando sin que hasta la fecha hayan ocasionado algún efecto nocivo a la salud humana o animal ni a la biodiversidad. Por el contrario, han permitido reducir el uso de pesticidas, lo que se ha traducido en un menor impacto en el ambiente, a diferencia de lo que ha sucedido con la aplicación de productos químicos, algunos de los cuales tienen efectos carcinogénicos. El maíz y la soya transgénicos se consumen en muchos países y cada vez es mayor el número de hectáreas que se cultivan con plantas transgénicas (Potrikus 1989, Ye *et al.* 2000, Purohit 2003, Green *et al.* 2004, Herrera-Estrella y Martínez 2004, Trigo y Capp 2007).

Los problemas que aquejan a la humanidad en los albores del siglo XXI son muy graves: pérdida de productividad agrícola; deterioro de los suelos; escasez de agua; agotamiento de las fuentes de energía; calentamiento global; contaminación; nuevas plagas y enfermedades; disminución de áreas verdes y biodiversidad, entre otros. La biotecnología representa una herramienta poderosa que permite plantear escenarios diferentes para contender con estas calamidades Organismos con nuevas propiedades permitirán a los países que están desarrollando biotecnología, contender con éstos y otros problemas locales y globales. Una reglamentación adecuada permitirá orientar el desarrollo de OGMs hacia aquellos que resuelvan la problemática de cada país sin comprometer su medio ambiente y sus recursos naturales. Bloquear la biotecnología, aislaría al país de la oportunidad que presenta la Ciencia para corregir el rumbo (The Biotech Revolution 1998, Bolívar *et al.* 2002).

Existe evidencia científica en la que se sustenta la inocuidad de los transgénicos comercializados hasta la fecha, y las razones para considerarlos además, como alternativa tecnológica más natural y de menor impacto al medio ambiente. Esta información generada en todo el mundo que se presenta a continuación, aporta elementos relevantes para la evaluación de los transgénicos que se pretendan utilizar. Es importante enfatizar que los OGMs que actualmente se comercializan, no han presentado hasta el momento efectos negativos ni a la salud ni al medio ambiente que sí presentan tecnologías alternativas.

- *La teoría de evolución de Darwin señala que todos los seres vivos derivamos de un mismo precursor común. Esta propuesta se ha ido reforzando y consolidando con la evidencia generada a partir de la secuenciación de los genomas que ha demostrado que todos los seres vivos compartimos material genético incluyendo muchos genes. De hecho, el genoma de la raza humana es similar en 98% al del chimpancé, 90% al del ratón, 40% al de la mosca, 30% al de las plantas y 20% al de la levadura. También compartimos genes bacterianos incluyendo los localizados en las mitocondrias de nuestras células (Margulis y Sagan, 1995, Watson* et al. *1996, Andersson* et al. *2001, Venter* et al. *2001 y Bolívar, 2004).*

- *El material genético (ADN) tiene la misma estructura general en todos los seres vivos y eso hace posible transferir e incorporar genes de un organismo a otro. La célula viva reconoce el material genético de otro origen que puede adquirir por diferentes vías (infección o transferencia horizontal), y en muchos casos lo incorpora y lo replica como propio (Watson* et al. *1996, Bolívar* et al. *2004).*

- *La transferencia horizontal de material genético es un fenómeno que ocurre diariamente en todas las especies y los virus son los principales responsables de este fenómeno. Este tipo de transferencia permite que ADN de una especie pueda ser transferido a otra. Cada día se acumula más evidencia que indica que este tipo de fenómeno ha jugado un papel importante, conjuntamente con otros mecanismos, en la evolución de las especies y en la estructuración y reorganización de los genomas.*

  El fenómeno de la transferencia horizontal de material genético se da permanentemente en el reino microbiano donde las bacterias reciben e incorporan material genético desnudo gracias al llamado "fenómeno de transformación". Este material genético puede provenir de cualquier origen de los diferentes organismos que habitan el suelo, incluyendo los que mueren (Margulis y Sagan, 1995, Watson et al. *1996, Madigan* et al. *2000 y Bolívar, 2004).*

  De hecho, se sabe que la bacteria S. pneumoniae *al ser sometida a tratamiento con antibióticos sufre un estrés, que a su vez induce un incremento en su capacidad de transformación por ADN. Probablemente a través de ello, incrementa su capacidad para adquirir genes de otros organismos para contender con los antibióticos que producen otros microorganismos. Esta información claramente señala que existen organismos que tienen mecanismos que incrementan su capacidad de transformación por ADN, lo cual habla de que la transformación con ADN lineal puede ser un fenómeno activo y no sólo pasivo (Prudhomme* et al. *2006).*

También se ha demostrado que existe transferencia horizontal de material genético de microorganismos a plantas como el caso de la bacteria Agrobacterium tumefaciens *y el tabaco (Herrera-Estrella* et al. *1983, Herrera-Estrella y Martínez, 2004).*

- *Hay evidencia de que el genoma de organismos superiores ha evolucionado incrementando parte de su material genético a través de infecciones virales, y probablemente de material genético proveniente de microorganismos que hayan infectado a nuestros antepasados; incorporándose así parte del material genético del organismo que infecta en el genoma de las células receptoras.*
  En este sentido es clara la información que sustenta la incorporación del material genético en etapas tempranas en la evolución de las células de los animales y plantas, a través de la infección por precursores de los actuales organelos celulares, que son similares a las bacterias, como pareciera ser el caso de la mitocondria (organelo celular responsable de la síntesis de energía biológica como ATP*) o del cloroplasto (responsable de la síntesis de clorofila en las plantas). Estos organelos cuentan con material genético propio circular como los cromosomas de las bacterias, además de contar con ribosomas en los que llevan a cabo la síntesis de proteínas, que son más parecidos a los de las bacterias. Es posible que los precursores de estos organelos se hayan incorporado a los precursores de las células superiores, a través de una infección y luego a través de una asociación permanente, por representar ventajas para ambos organismos originales. Además, en el caso de las plantas es importante señalar que los cromosomas vegetales contienen un gran número de genes provenientes de las bacterias fotosintéticas que dieron origen a los cloroplastos durante la evolución. Lo anterior quedó verificado de manera contundente con la secuenciación de los genomas de* Arabidopsis *y el arroz (Margulis y Sagan 1995, Watson* et al. *1996, Osusky* et al. *1997, Andersson* et al. *1998, Lengeler* et al. *2000, The Arabidopsis Genome Initiative, 2000, Andersson* et al. *2001, Venter* et al. *2001, Goff* et al. *2002 y Bolívar, 2004).*

- *En nuestro genoma y en el de todos los organismos vivos hay material genético repetido, probablemente de origen bacteriano, llamado "transposones" que representa al menos 30% del genoma humano. En el maíz se estima que los transposones constituyen 70% de su genoma. Los transposones son secuencias de* DNA *que pueden translocar su posición en el genoma, es decir pueden "brincar" de un lugar a otro, inclusive entre cromosomas, por lo que han jugado y siguen jugando un papel importante en la reorganización y evolución del genoma. En el maíz, los granos de colores diferentes en una mazorca son resultado de este tipo*

de fenómeno que ocurre en un mismo individuo (McClintock 1957, 1982, Federoff 1989, Berg y Howe 1989, Venter et al. *2001, Purugganhanaud y Wesler 1992, McDonald 1995, y Bolívar 2004).*

- *En este mismo sentido de la reorganización del genoma, hay evidencia de que en organismos genética y fisiológicamente cercanos, como los tripanosomas (parásitos importantes de organismos superiores), ha habido una gran reorganización de los genes y los cromosomas. En estos organismos los cromosomas se reorganizan, cambiando el número, tamaño y también la posición de los genes. Se modifica el número de cromosomas, pero se mantiene la mayor parte de los genes en diferentes posiciones.*
  La secuenciación del genoma de Arabidopsis*, una pequeña hierba que se usa como sistema modelo para el estudio de las plantas superiores, mostró que durante su evolución ocurrió una duplicación completa de su genoma seguido por la pérdida y duplicación de genes, como la presencia de fragmentos del genoma del cloroplasto en el núcleo. Esta evidencia, claramente indica que los genomas de las plantas son altamente dinámicos y que se modifican continuamente. Lo anterior y ejemplos en otros organismos indican la capacidad de reorganización del genoma de la célula viva, sin detrimento de su capacidad funcional como ser vivo (Hozim y Tonewaga, 1976, Lewin, 1994, Wolfe y Shields 1997, Lengeler* et al. *1999, The Arabidopsis Genome Initiative, 2002, Kellis* et al. *2004, El-Sayed* et al. *2005, Ivens* et al. *2005, Xing y Lee, 2006).*

- *Otro tipo de material repetido en nuestro genoma, es el "retroviral" (el retrovirus es un tipo de virus que tiene su genoma de* ARN*). Este tipo de material repetido probablemente se estabilizó en nuestro genoma y/o en el de nuestros precursores biológicos, mediante mecanismos de infección y posterior incorporación del genoma viral al nuestro o al de nuestros predecesores. Éste es otro tipo de transferencia horizontal que influye diariamente en la dinámica y reorganización del genoma (Griffith* et al. *1993, Voytas 1996, Watson* et al. *1996, Venter* et al. *2001, Bolívar* et al. *2004).*

- *Cuando se construye un transgénico se incorpora, a través del fenómeno de transferencia horizontal, el material genético específico (transgene) en algún cromosoma celular. Si en este evento, que es* de facto *una reorganización del genoma, se afectara una función del cromosoma que resulta vital, ese transgénico en particular no sobrevive. Sin embargo, lo mismo puede suceder por la infección de un retrovirus, como el SIDA, o por un transposón que cambia su posición y que pudiera insertar su material genético en un locus esencial y que por ello, la célu-*

la receptora no sobreviva. Esto no es un fenómeno que pudiera ocurrir sólo por el uso de genes aislados e incorporados por ingeniería genética (transgenes), sino que es un fenómeno que podría ser causado también por una infección viral y/o por transposiciones de ADN como las que ocurren frecuentemente en el maíz. Este fenómeno podría causar la muerte del individuo receptor, pero no una catástrofe ecológica. Luego, la incorporación y reorganización de material genético en un genoma es un proceso natural que ocurre diariamente en la naturaleza, independientemente de los transgénicos.

- *Dadas todas estas evidencias en favor de la plasticidad y capacidad de reorganización del genoma y de la transferencia horizontal de ADN como un fenómeno natural, resulta difícil entender la preocupación de que un gene bacteriano que codifica para la proteína "Bt" que es tóxica a ciertos insectos que haya sido incorporado por técnicas de ingeniería genética a una planta, tenga la posibilidad de generar una "catástrofe ecológica". Lo anterior se sustenta en el hecho de que los seres vivos han evolucionado y lo seguirán haciendo, a través de adquirir material genético por transferencia horizontal, mutando y reordenando sus genes y cromosomas, sin provocar catástrofes ecológicas. Los escenarios que preocupan por la presencia de un transgene en un organismo podrían darse diariamente por la transferencia horizontal y la reorganización del genoma al infectarse las plantas y/o animales por virus o bacterias.*
  Por lo anterior, resulta insostenible científica y bioéticamente, calificar esta capacidad humana de crear organismos transgénicos como "antinatural", cuando el material genético de todos los seres vivos tiene la misma estructura general y hay evidencia de que la transferencia horizontal y reorganización del genoma mediada por virus, bacterias y transposones, han ocurrido a lo largo de la evolución y siguen ocurriendo de manera permanente en plantas, animales y en el hombre. Así, la preocupación de que los OGMs vayan a ser responsables de transformar y degradar negativamente las especies existentes que se utilizan en la agricultura y las adicionales que conforman la biosfera, se minimiza porque hay evidencias cada vez más importantes de esta plasticidad del genoma y de que estos fenómenos de cambio y reorganización genética ocurren todos los días en la biosfera, independientemente de los transgénicos. Muchos de estos procesos de cambio en los genomas son generados, se insiste, mediante la transferencia horizontal de ADN el cual no es un fenómeno antinatural. De lo anterior, se concluye que los organismos transgénicos generados también por transferencia horizontal no son organismos antinaturales sino completamente naturales desde el punto de vista biológico.

- *La humanidad ha venido modificando genéticamente, a lo largo de cientos de años, las especies que utiliza para su alimentación, y hasta hace poco sin conocer la estructura del material genético, utilizando mutágenos que se sabe generan múltiples cambios en los genomas de los organismos. Sin embargo, estas técnicas originales de mutagénesis y los organismos generados, no se cuestionan como los transgénicos, cuando en el fondo hoy sabemos que los métodos usados previamente generan cambios mucho más amplios en el genoma de estos organismos. La razón de la falta de cuestionamiento es, probablemente, la ausencia de daño por estos organismos altamente modificados, desde el punto de vista genético.*
  Cabe enfatizar que la combinación de diferentes especies no surgió con los experimentos de ADN, sino con la generación de variedades vegetales. Los primeros registros sobre manipulación de plantas datan de 1919, fecha en la que se reportaron las primeras plantaciones con semillas híbridas, desarrolladas a partir de la selección y cruzamiento de dos plantas de maíz. Esta metodología permitió el aumento en 600% de la producción agrícola, en un período de aproximadamente 55 años (INIA, 2006). Por otro lado, las mutaciones genéticas para el mejoramiento de los cultivos agrícolas —realizadas en los últimos 70 años— con técnicas de mutagénesis, han generado más de 2 200 variedades vegetales, las cuales han sido poco estudiadas y hasta el momento, se insiste, no se han reportado efectos adversos. Es importante también señalar que la manipulación de las plantas comenzó de manera empírica hace cerca de 10 000 años cuando el hombre inició la domesticación de las plantas, actividad que permitió la obtención de lo que ahora conocemos como maíz, trigo, arroz y sorgo entre muchos otros, que no existían como tales en la naturaleza y que fueron la base para el establecimiento de la grandes culturas del planeta.

- *A la fecha, no hay evidencia de daño a la salud humana o animal o al medio ambiente y la biodiversidad por el uso de organismos transgénicos o sus productos. La OMS en su documento "20 Preguntas sobre los Alimentos Genéticamente Modificados" señala que a la fecha no se han generado problemas a la salud humana por su consumo (OMS 2006).*
  En muchos casos el producto final que llega al consumidor como son el aceite de soya o el almidón de maíz son químicamente idénticos a los productos convencionales y por lo tanto su efecto en la salud humana es indistinguible entre uno y otro, independientemente si éste se obtuvo de un organismo transgénico o una variedad convencional.
  Se ha demostrado que no hay riesgo para la salud por el consumo de genes naturales provenientes de uno o varios organismos vivos, que han sido translocados a otro organismo. Por el contrario, se sabe que pesticidas químicos, que dañan

muchos de ellos a la salud humana y animal, destruyen indiscriminadamente la biodiversidad en particular de los insectos, y contaminan el medio ambiente, ya que muchos de ellos no se biodegradan (Thomas y Fuchs 2002, Hammond 2002, Green et al. *2004, Herrera Estrella y Martínez 2004, Metcalfe 2005).*

III. Uso y aplicación responsables de los organismos genéticamente modificados

III.1) Consideraciones generales sobre el uso responsable del conocimiento científico y la biotecnología

Es indispensable que la utilización del conocimiento científico y de la tecnología se dé: i) de forma responsable y respetuosa de la salud humana y animal, y cuidando el medio ambiente; ii) de manera justa, tratando de reducir las diferencias sociales e inequidades; iii) respetando la riqueza cultural; iv) conforme a un marco jurídico adecuado; y v) tras un análisis detallado de las ventajas y los riesgos que representa el uso o no de una tecnología particular, para la solución de algún problema.

La Ciencia es una actividad humana intrínsecamente arraigada en su espíritu inquisitivo, que busca generar conocimiento científico sobre el Universo y la Naturaleza, incluido el ser humano y la Sociedad. El sustento de la originalidad del nuevo conocimiento científico debe darse a través de la evaluación por pares y su publicación en revistas y libros arbitrados. Es fundamental avalar la veracidad del conocimiento ya que la mentira destruye la credibilidad de la sociedad por el trabajo científico. El conocimiento científico puede utilizarse para el desarrollo de tecnología novedosa y competitiva, con el propósito de resolver problemas y generar satisfactores para la sociedad.

En particular y para el caso de la biotecnología, como ha sido señalado, a la fecha no hay evidencias de un impacto negativo mayor que el beneficio de su uso y aplicación. Sin embargo, como con cualquier tipo de tecnología, algunos transgénicos pudieran tener riesgos potenciales, por lo que es necesario evaluar su uso y en particular la liberación de OGMs al ambiente, caso por caso y con base en evidencia científica.

III.2) Acuerdos internacionales y regulación en México sobre el uso de los OGMs

La utilización y liberación al ambiente de los OGMs, ha despertado cuestionamientos, discusiones y procesos de revisión por expertos, creación de acuerdos internacionales y de legislaciones a nivel nacional. Uno de los acuerdos internacionales es el Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB), que entró en vigor en 1993. En este Convenio se encuentra el compromiso de establecer un acuerdo sobre la seguridad de la biotecnología, por lo que se estableció el Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología del CDB, que fue ratificado por México y que entró en vigor el 11 de septiembre de 2003.

Mediante el Protocolo de Cartagena, los países firmantes se comprometieron a establecer las regulaciones y medidas necesarias para evaluar los movimientos transfronterizos de los transgénicos que pudieran tener efectos adversos sobre la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica o sobre la salud humana (SCSDB 2000).

Los organismos internacionales que realizan trabajos de análisis y participan en la discusión y establecimiento de mecanismos de cooperación relacionados con la bioseguridad son, entre otros:

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), que cuenta con un área dedicada a la biotecnología y dentro de las aportaciones en materia de OGMs están la Conferencia de Edimburgo, que concluyó con la integración de un panel de consulta y discusión sobre OGMs. Los participantes (400 representantes de 40 países, incluyendo ONG's), identificaron aspectos relevantes como la necesidad de un debate más abierto, transparente e incluyente en los procesos de definición de políticas en la materia, así como el reconocimiento de la importancia del uso de los transgénicos y su demostrada inocuidad sobre la salud humana entre otros. Asimismo, la OCDE, en relación con la biotecnología, trabaja en la organización de reuniones, estudios y publicación de documentos entre los que destaca la versión revisada 2006 de "OCDE Guidance for the Designation of a Unique Identifier for Transgenic Plants" http://www2.oecd.org/biotech/ (OCDE 2006), mediante la cual se han establecido los lineamientos para la asignación de clave a los OGMs. También, se ha integrado una base de datos de acuerdo con lo establecido en el Protocolo de Cartagena, en la cual se encuentra una lista de OGMs utilizados http://bch.biodiv.org/about/default.shtml. Dentro de esta base de datos, en febrero de 2007, se encontraba información

sobre 35 especies OGMs registradas en México. Todos estos registros a nombre de tres grupos transnacionales (Monsanto y/o filiales Calgene; Bayer (Aventis, AgrEvo, Plant Genetic Systems), y Dow Agro Sciences). Esta base de datos permite a las autoridades de los países miembros, compartir información sobre los productos de la nueva biotecnología.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), coincide con el proceso de evaluación del riesgo de la liberación de OGMs y considera que: "Los diferentes organismos genéticamente modificados (GM) incluyen genes diferentes insertados en formas distintas. Esto significa que cada alimento GM y su inocuidad deben ser evaluados individualmente, y que no es posible hacer afirmaciones generales sobre la inocuidad de todos los alimentos GM. Los alimentos GM actualmente disponibles en el mercado internacional han pasado las evaluaciones de riesgo y no han generado daño, y es probable que no presenten riesgos para la salud humana. Además, no se han demostrado efectos sobre la salud humana como resultado del consumo de dichos alimentos por la población general en los países donde fueron aprobados. El uso continuo de evaluaciones de riesgo con base en los principios del Codex Alimentarius y, donde corresponda, incluyendo el monitoreo post comercialización, debe formar la base para evaluar la inocuidad de los alimentos GM". La FAO y la OMS han avalado protocolos para la pruebas de alimentos OGMs. (OMS, 2006, Codex Alimentarius 2006).

En México, el Congreso de la Unión con el apoyo del Comité de Biotecnología de la Academia Mexicana de Ciencias, en cumplimiento con compromisos internacionales adquiridos, después de un proceso de consulta, discusión y revisión que tuvo una duración de tres años, emitió la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM). Esta Ley tiene como objetivo garantizar la protección de la salud humana, del medio ambiente, la diversidad biológica y de la sanidad animal, vegetal y acuícola, de actividades con OGMs. Entre los elementos que contiene se encuentran la definición de los principios y política de bioseguridad, como la evaluación caso por caso y paso por paso, con base en conocimiento científico; la determinación de competencias de diferentes dependencias gubernamentales; el establecimiento de las bases para el funcionamiento de la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM); la definición de las bases de los procedimientos para evaluación y monitoreo caso por caso, de posibles riesgos del uso de OGMs; el establecimiento de regímenes para el manejo de OGMs (permisos, avisos y autorizacio-

nes), bases para el establecimiento del Sistema Nacional de Información sobre Bioseguridad y Registro Nacional de Bioseguridad de OGMs; la determinación de áreas geográficas libres de OGMs; la definición de las bases para establecimiento de normas en materia de bioseguridad; el establecimiento de las medidas de control y sanciones; la definición de los mecanismos para la participación pública, el acceso a la información y la participación social a través del Consejo Consultivo Mixto de la CIBIOGEM; y la definición de instrumentos de fomento a la investigación científica y tecnológica en materia de bioseguridad y biotecnología, entre los más importantes (Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados 2005).

III.3) Algunas recomendaciones y consideraciones para el uso y aplicación responsable de los transgénicos

Existe un consenso internacional sobre la necesidad de evaluar y dar seguimiento, caso por caso, con base en el conocimiento científico, a los OGMs que se deseen utilizar, incluyendo la liberación al medio ambiente. Es necesario además monitorear la presencia de los OGMs en diferentes nichos. En este análisis se debe considerar la comparación de los beneficios y posibles riesgos derivados del uso de un determinado OGM, así como los riesgos de no emplearlos, manteniendo los esquemas actuales de producción y de degradación (Thomas y Fuchs 2002, Bradford *et al.* 2005, Bainbridge 2005, Bertoni y Marzan 2005).

Hay consenso también en la importancia de realizar investigación interdisciplinaria sobre los transgénicos, a través de la aplicación de las ciencias "ómicas" (genómica, proteómica, etc.), y de la ecología y la bioinformática, entre otras. Lo anterior es importante ya que hay académicos que consideran que los transgenes pudieran generar respuestas no evidentes en el organismo receptor, aunque algunos otros pensamos que éste no sería el caso, ya que como se señaló, la transferencia horizontal del material genético y la reorganización del genoma son fenómenos que ocurren permanentemente en la naturaleza, y los transgénicos son creados por transferencia horizontal y reorganización del genoma y por ello son organismos naturales. Sin duda estos estudios generarán conocimientos más completos e integrales de los OGMs, que ayudarán a responder algunas de las preguntas en este asunto. Además, es importante incorporar también estudios sociales y económicos del uso de esta tec-

nología (es decir, impacto de las patentes en los países pobres, aspectos éticos y sociales, etc.). Por lo anterior, es indispensable la formación de recursos humanos de manera interdisciplinaria y el fortalecimiento de la infraestructura de investigación y de instancias con capacidad para evaluar integralmente los OGMs y su utilización. El establecimiento de los medios para la difusión de la información generada en la materia, es también estratégico (Hails 2000, Thomas y Fuchs 2002, *Why Silence is not an Option* 2006).

Hay consenso en la comunidad científica nacional en el hecho de que los transgénicos representan una herramienta que no podemos soslayar en el desarrollo de la agricultura nacional, y que debe mantenerse un riguroso control, como hasta ahora ha sido, sobre la evaluación de posibles riesgos que pudieran ocasionar las nuevas construcciones en la salud humana y a la biodiversidad. Sin embargo, existen diferencias de opinión sobre la pertinencia de liberar de inmediato las variedades de cultivares transgénicos en los que México es centro de origen como el maíz. Así, mientras que algunos ecólogos desearían que ningún maíz modificado llegara a suelo agrícola nacional, otros opinan que los permisos podrían otorgarse para siembra en determinadas regiones, una vez determinado en estudios de campo experimental, el nivel de riesgo y los controles necesarios para limitar el flujo de genes. De hecho, las consecuencias de un eventual flujo génico es también un tema polémico (Thomas y Fuchs 2002, Bolívar *et al.* 2004, Heinemann y Traavik 2004, Hopking 2006).

Otra preocupación importante y válida de los sectores que han expresado opiniones adversas a las plantas transgénicas, es que ciertas variedades transgénicas que actualmente comercializan las empresas multinacionales no son las adecuadas para la agricultura nacional, ya que las plagas en EUA son distintas a las mexicanas. Por lo anterior, resulta fundamental el apoyo a los grupos académicos para que las instituciones públicas del país puedan desarrollar las variedades que México requiere (Zhang *et al.* 2004).

Resulta fundamental organizar la participación de los sectores académicos, industria y gobierno para la integración de grupos multidisciplinarios que asesoren en la definición de estrategias y metodologías para la determinación de la seguridad de los transgénicos, para 1) la aprobación de su uso y/o liberación al ambiente; 2) procesos de verificación; y 3) de seguimiento. Para el primer caso se requiere de personal altamente calificado y certificado independiente que sea contratado por las

empresas o el gobierno. Para la verificación se requiere compromiso de las empresas que promueva el uso del conocimiento de frontera y metodologías con bases científicas que permitan una responsabilidad autoimpuesta para la elaboración de productos seguros, contando con evidencias de los riesgos, problemas probables y revisión cuidadosa. El tercer aspecto está relacionado con el establecimiento de un marco de medidas de seguridad comunes a varias industrias que incluyan la realización de auditorías permanentes (Thomas y Fuchs 2002, Jaffe 2003, Kapuscinski *et al.* 2003, *Why Silence is not an Option* 2006).

Es importante analizar la implantación, en su caso, de las estrategias de otros países para la regulación nacional y regional, dependiendo de las capacidades, características y necesidades de cada país. Quince miembros de la Unión Europea dentro de la evaluación del riesgo incluyen, entre otros, los siguientes aspectos: manera en que el gene introducido cambia a la planta modificada; la evidencia de toxicidad y alergenicidad; evaluación de los efectos en los organismos benéficos del entorno y consecuencias de la transferencia de genes (e. g. por polinización). Es preocupante que mientras que en muchos países se discute ya las condiciones para la coexistencia de cultivos OGMs y cultivos tradicionales, incluso en países ubicados dentro de la Unión Europea como España, en países como el nuestro aún se discuta si deben o no llevarse a cabo pruebas experimentales y se sugieran moratorias para éstas. (Royal Society y otras Academias de Ciencias 2000, Dale 2002, Thomas y Fuchs 2002, Schiemann, 2003, AEBC 2004, APBN 2004, Ponti 2005).

Se requiere que los legisladores y responsables de las áreas administrativas cuenten con información actualizada sobre el tema y con la asesoría de personal técnico. Es indispensable que las entidades gubernamentales responsables de la definición de las políticas para la liberación de transgénicos dispongan de los elementos adecuados para la emisión de las normas y reglamentos correspondientes, que definan los procedimientos administrativos para el uso de los OGMs, de acuerdo con la legislación nacional y los acuerdos internacionales (Thomas y Fuchs 2002, Dix *et al.* 2006, Singh *et al.* 2006). Es urgente contar ya con el Reglamento de la LBOGM.

III.4 Usos ilegales y cuestionables de ciertos OGMs

La LBOGM señala explícitamente, que ningún OGM podrá ser utilizado

como arma biológica. Es posible construir OGMs que pudieran tener impactos negativos en la salud humana, animal y vegetal. Estos OGMs no pueden ni deben siquiera construirse. Ejemplos de este tipo pudieran ser bacterias que normalmente viven en el intestino del humano a las que se incorporaran genes productores de toxinas que afectan la salud como la toxina del botulismo o del cólera. A nivel de las plantas, un ejemplo podría ser la utilización de genes terminadores o virales que impidan la germinación de las siguientes generaciones de semillas, ya que estos genes pudieran transmitirse a otras plantas generando daño.

Existe consenso en la comunidad científica nacional sobre el hecho de que ciertas plantas comestibles, y de manera específica el maíz, no debe modificarse genéticamente para que produzca sustancias de interés industrial, tales como plásticos, aunque fuesen de naturaleza biodegradable. En particular el uso de cultivares para la producción de compuestos farmacéuticos (vacunas, hormonas proteicas, anticuerpos, etc.) debe ser analizado casuística y exhaustivamente porque la posible ingesta de estas plantas que puedan producir medicamentos, puede tener efectos secundarios no previsibles relacionados con la dosis del medicamento que sea consumido con el cultivar transgénico. En principio, podrían utilizarse plantas como el tabaco para la producción de ciertos medicamentos y de compuestos que hoy se producen vía industria petrolera para reducir la contaminación, en virtud de que el tabaco no es una planta comestible.

El tema de la Biotecnología moderna aplicada a la agricultura tiene muchos elementos de discusión y de polémica; sin embargo, como se ha comentado, existen sectores donde sus aplicaciones avanzan de manera clara y contundente. Requerimos de una sociedad bien informada que pueda analizar todas y cada una de las opciones y de un decidido apoyo a la comunidad científica nacional para poder evaluarlas y aprovecharlas. La biodiversidad es una gran riqueza nacional. Debemos utilizarla responsable y sustentablemente, buscando incorporar un mayor valor agregado a nuestros productos de origen biológico, y la biotecnología puede ayudar en muchos aspectos. Se requiere para ello contar con información científicamente sustentada y no con supersticiones y prejuicios, para hacer un análisis objetivo de las ventajas y los riesgos de utilizar los OGMs así como de no utilizarlos.

"La biotecnología no es en forma innata buena o mala. Tiene un potencial para aligerar o agravar el impacto de la agricultura al medio ambiente. El reto es el desarrollar, proveer y manejar la biotecnología en beneficio del ser humano y el ambiente" (Dale 2001).

Dr. Carlos Arias Ortiz, Instituto de Biotecnología, UNAM
Ing. Elena Arriaga Arellano, Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Hugo Barrera Saldaña, Universidad Autónoma de Nuevo León
Dr. Francisco Gonzalo Bolívar Zapata (Coordinador),
Instituto de Biotecnología, UNAM
Lic. Pedro Bosch Guha, Grupo Plenus
Dra. Ma. Mayra de la Torre Martínez, Centro de Investigación
en Alimentación y Desarrollo
Dr. Enrique Galindo Fentanes, Instituto de Biotecnología, UNAM
Dra. Amanda Gálvez Mariscal, Facultad de Química, UNAM
Dr. Adolfo Gracia Gasca, Instituto de Ciencias del Mar
y Limnología, UNAM
Dr. Luis Herrera Estrella, Cinvestav-Irapuato
Dr. Alfonso Larqué Saavedra, Centro de Investigación Científica
de Yucatán
Dr. Agustín López-Munguía Canales, Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Adalberto Loyola Robles, Instituto de Ingeniería, UNAM
Lic. Roberto Ortega Lomelín, Pemex
Dr. Octavio Paredes López, Cintestav-Irapuato
Dr. Tonatiuh Ramírez Reivich, Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Sergio Revah Moiseev, UAM-Iztapalapa
Dr. Jorge Soberón Mainero, Universidad de Kansas, EEUU.
Dr. Xavier Soberón Mainero, Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Irineo Torres Pacheco, INIFAP-Bajío
Ing. Jaime Uribe de la Mora, Probiomed S. A. de C. V.
Dr. Gustavo Viniegra González, UAM-Iztapalapa.

Bibliografía

(AEBC) UK Agriculture and Environment Biotechnology Commission, AE-BC04/20A– Research agenda workteam: plant breeding case study (2004).

Andersson S., Zomorodippur A., Andersson J., *et al.,* The genome sequence of *Rickettsia prowazeki* and the origin of mithochondria, *Nature* 396, 133-140 (1998).

Andersson J., Doolittle W. and Nerbo C., Are there bugs in our genome? *Science* 292, 1848-1850 (2001).

(APBN), Green Light for GM Cotton Australia, Asia Pacific Biotech News 10/30/2004, 8(20), p1125-1125, 1/2p; (AN 14978402).

The Arabidopsis genome initiative, *Nature* 408, 796-813 (2002).

Bainbridge, J., Plant biotechnology, the regulator and the consumer, *Journal of Commercial Biotechnology,* II(3), 222-227 (2005).

Berg, D., and M. Howe Eds., Mobile DNA, American Society for Microbiology, USA (1989).

Bertoni, G., and Marsan, P. A., Safety risks for animals fed genetic modified (GM) plants, *Veterinary Research Communications* 29(2), 13-18 (2005).

The Biotech revolution. Analysis of future technologies and markets, Technical insights, John Wiley and Sons, Inc., USA (1998).

Bolívar F., *et al.*, *Biotecnología Moderna para el Desarrollo de México en el Siglo XXI. Retos y Oportunidades.* Francisco Bolívar Zapata (Coord. y Comp.), Conacyt, Fondo de Cultura Económica, México (2002).

Bolívar, F., Ciencia genómica, proteómica y bioinformática. En: *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna,* Francisco G. Bolívar Zapata Comp. y Ed., El Colegio Nacional, pp. 85-116 (2004).

Bolívar, F., *et al., Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna,* Francisco G. Bolívar Zapata Comp. y Ed., El Colegio Nacional, México (2004).

Bradford, K. J., Van Deynze A., Gutterson N., Parrott, W., and Strauss, S. H., Regulating transgenic crops sensibly: lessons from plant breeding, biotechnology and genomics, *Nature Biotechnology* 23, 439-444. (2005).

CODEX ALIMENTARIUS, **http://www.codexalimentarius.net/web /index es.jsp** (2006)**.**

Codex Alimentarius Commission, Report of the sixth session of the Codex ad hoc Intergovernmental Task Force on Foods Derived from Biotechnology (ALINORM 07/30/34) (2006).

Daar, A., Martin, D., Nast, S., Smith, A., Singer P., and Thorsdottir, H., Top ten biotechnologies for improving health in developing countries, *Nature Genetics* 32, 229-232 (2002).

Dale, P. J., The environmental impact of genetically modified (GM) crops: a review, *Journal of Agricultural Science* 138, 245-248 (2002).

Dix, D. J., Gallagher, K., Benson, W. H, Groskinsky, B. L, McClintock, J. T., Dearfield, K. L., and Farland, W. H., *Nature Biotechnology* 24, 1108-1111 (2006).

El-Sayed N. M., *et al.,* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa, *Science* 309, 404-409 (2005a).

El-Sayed N. M., *et al.,* The genome of the african trypanosome *Trypanosoma brucei*, *Science,* 309, 416-422 (2005b).

Federoff, N. V., About maize transposable elements and development, *Cell* 56, 181 (1989).

Goeddel, D., Kleid, D., Bolívar, F., Heyneker, A., Yansura, D., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura K., and Riggs., A. D., Expression of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci.,* USA 76, 106-110 (1979).

Goff J., *et al.,* The rice genome. *Science,* 296, 92-100 (2000).
Green, J. A., Aschengrau, W. McKelvey, R. A. Rudel, C. H. Swartz, and T. Kennedy, Breast cancer risk and historical exposure to pesticides from wide-area applications assessed with GIS. *Environmental Health Perspectives* 112(8), 889-897 (2004).
Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin R., and Gelbart W., *Genetic analysis*, W. H., Freeman and Co, USA (1993).
Hails, R., Genetically modified plants. The debate continues. *Trends in Environmental Ecology,* 15, 14-18 (2000).
Hammond J., Lower fumonism mycotoxin levels in the grain of Bt corn grown in the United States in 2000-2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 24, 211 (2002).
Heinemann, J., and Traavik, T., Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants, *Nature Biotechnology* 22, 1105-1109 (2004).
Herrera-Estrella, L., Depicker, A., van Montagu M., and Schell, J., Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector, *Nature* 303, 209-213 (1983).
Herrera-Estrella, L., y Martínez M., Plantas Transgénicas, en: *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna,* Francisco G. Bolívar Zapata Comp. y Ed., El Colegio Nacional, México, pp. 167-194 (2004).
Hopking, M., Escaped GM grass could spread bad news, *Nature* (2006).
Hozim, A., and Tonewaga, T., Evidence of somatic rearrangement of immunoglobin genes, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* USA 73: 3628 (1976).
INIA, En el desarrollo de plantas y otros organismos genéticamente modificados,http://72.14.203.104/search?q=cache:bCKbwz73GfQJ:www.inia.cl/biotecnologia/publicaciones/GMO_INIA.pdf+inia+trasng%C3%A9nicos&hl=es&gl=mx&ct=clnk&cd=1
Y en, http://www.inia.cl/biotecnologia/publicaciones/GMO_INIA.pdf (2006).
Ivens, K., *et al.,* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania mayor, Science* 309, 436-442 (2005).
Jaffe, J., Regulatory slowdown on GM crop decisions, *Nature Biotechnology* 24, 748-749 (2006).
Kapuscinski, A. R., Goodman, R. M., Hann, S. D., Jacobs, L. R., Pullins, E. E., Johnson, C. S., Kinsey, J. D., Krall, R. L., La Viña, A. G. M., Mellon, M. G., and Ruttan, V. W., Making 'safety first' a reality for biotechnology products, *Nature Biotechnology* 21, 599-601 (2003).
Kellis, H., *et al.,* Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *S. cerevisiae, Nature* 428, 617 (2004).
Lengeler, J., Drews G., and Schlegel, H., Biology of the prokaryotes, Blackwell *Science*, USA (1999).
Lewin, B., 1994, Genes V, Oxford University Press, USA.

Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM), México, http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf_/Ley_BOGM.pdf (2005).

López-Munguía Canales, A., Casos exitosos de la tecnología enzimática y la biocatálisis en México, en: *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna,* Francisco G. Bolívar Zapata Comp. y Ed., El Colegio Nacional, pp. 429-450 (2004).

Madigan, M., Martinko J., and Parker, J., *Biology of microorganisms,* Prentice Hall, USA (2000).

Margulis, L., and Sagan, D., *What is life?,* University of California Press, USA. (1995).

McClintock, B., Controlling elements and the gene, Cold Spring Harbor Symposium 21, 197, USA (1957).

McClintock, B., The discovery and characterization of transposable elements: the collected papers of Barbara McClintock, Garland Publishers, USA (1987).

McDonald, J., Transposable elements: possible catalysis of organismic evolution. *Trends Ecol. Evol.* 10, 123-126 (1995).

Metcalfe, D., Genetically modified crops and allergenicity, *Nature Inmunology* 6, 857-860 (2005).

Miller, H. I., Conko, G., and Kershen, D. L., Why spurning food biotech has become a liability, *Nature Biotechnology,* 24, 1075-1077 (2006).

OCDE, The OECD Edinburgh Conference on the Scientific and Health Aspects of Genetically Modified Foods, http://www.oecd.org/document/58/0,2340,fr_2649_201185_1897018_1_1_1_1,00.html (2006).

OMS, 20 preguntas sobre los alimentos genéticamente modificados (GM). http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/20questions_es.pdf (2006).

Osusky, M., Kissova J., and Kovac, L., Interspecies transplacement of mitochondria in yeast. Curr. *Genetics* 32, 24-26 (1997).

Pennica, D., Holmes, W., Kohr, W., Harkins, R., Vahar, G., Ward, C., Bennett, W., Yelverton, E., Seeburg, P., Heyneker, H.L., Goeddel D., and Collen, D., Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli, Nature* 301, 214-221 (1983).

Ponti, L., Transgenic crops and sustainable agriculture in european context, *Bulletin of Science Technology Society* 25, 289-305 (2005).

Por qué Biotecnología, http://www.porquebiotecnologia.com.ar/educacion/cuaderno/doc/El%20Cuaderno%2054.doc (2006).

Potrikus, I., Gene transfers to cereals: an assessment. *Trends in Biotechnology 7,* 269-273 (1989).

Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin B., and Claverys, J., Antibiotic stress induces genetic transformability in human pathogen *S. pneumoniae, Science* 313, 189-192 (2006).

Purohit, S., *Agricultural biotechnology*, Agrobios (2003).
Purugganhanaud M., and Wessler, S., The splicing of transposable elements and its role in intron evolution, *Genetica* 86, 295-303 (1992).
Ramírez O. T., y Uribe J., Biotecnología farmacéutica moderna en México. El caso de Probiomed, S. A. de C. V. En: *Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna,* Francisco G. Bolívar Zapata Comp. y Ed., El Colegio Nacional, pp. 391-428. (2004).
Royal Society of London (RSL), la Academia de Ciencias de Brasil, la Academia de Ciencias de China, la Academia de Ciencias del Tercer Mundo, la Academia Mexicana de Ciencias, la Academia Nacional de Ciencias de la India y la U.S. National Academy of Sciences, 2000, http:// www.amc.unam.mx/Noticias/contenido_doctrans.html http://fermat.nap. edu/openbook.php?record_id=9889&page=R1}
Schieman, J., Coexistence of GM crops with convencional and organic farming, *Environmental Biosafety Research* 2, 213-217 (2003).
(SCDB). Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica (2000).
Singh, O. V., Ghai, S., Paul, D., and Jain, R. K., Genetically modified crops: success, safety assessment, and public concern, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 598-607 (2006).
Thomas J. A., and Fuchs, R. L., *Biotechnology and safety assessment*. Academic Press, USA (2002).
Trigo, E. J., and Capp E. J., *Ten years of genetically modified crops in argentine agriculture* (2006).
Venter J. C., *et al.,* The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1349. (2001).
Voytas, D., Retroelements in genome organization, *Science* 274, 737-738 (1996).
Watson, J., Gilman, M., Witkowski J., and Zoller, M., *Recombinant DNA*. W. H. Freeman & Co, USA. (1996).
Why silence is not an option. *Nature Biotechnology* 24, 1177 (2006).
Winter G., and Milstein, C., Man made antibodies, *Nature* 349, 293-299 (1991).
Wolfe K., and Shields, D., Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome, *Nature* 387, 708-713 (1997).
Xing, Y., and Lee, C., Alternative splicing and RNA selection pressure-evolutionary consequences for eukaryotic genomes, *Nature* Reviews Genetics 7, 499-509 (2006).
Ye, X., Al-babili, S., Klotti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I., Engineering the provitamin A biosynthetic pathway into rice endosperm, *Science* 287, 303-305 (2000).
Zhang J., *et al.,* Using information from Arabidopsis to engineer salt, drought and cold tolerance. *Plant Physiology* 135, 615-621 (2004).

EXTRACTOS CURRICULARES DE LOS AUTORES

Carlos Federico Arias Ortiz. Investigador titular "C" del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Obtuvo la licenciatura en la Facultad de Química, y el doctorado en Investigación Biomédica Básica en la UNAM. Posteriormente realizó estudios posdoctorales en el Instituto Tecnológico de California (CalTech), EUA. Desde el inicio de su carrera como investigador independiente ha trabajado en la epidemiología y la biología molecular de rotavirus y, más recientemente, en astrovirus y calicivirus, todos ellos causantes de gastroenteritis en niños. Ha publicado 65 artículos en revistas científicas internacionales, entre las que se encuentran *Journal of Virology, Virology, Journal of General Virology, Journal of Clinical Microbiology, Nucleic Acids Research, Journal of Molecular Biology, Proceedings of the National Academy of Sciences, USA y EMBO Reports*. Sus trabajos han sido citados en más de 900 ocasiones en la literatura mundial. Ha formado 24 estudiantes, ocho de licenciatura, 10 de maestría y seis de doctorado. Ha presentado más de 160 ponencias en congresos nacionales e internacionales. Ha sido revisor de trabajos enviados a numerosas revistas internacionales y editor invitado del *Annual Review of Genetics*. Ha sido profesor invitado en CalTech y en el Centro Nacional de la Investigación Científica de Francia. Entre sus distinciones se encuentran el premio Weizmann, que otorga la Academia Mexicana de Ciencias, el premio de Investigación en Ciencias Naturales de la Academia Mexicana de Ciencias, el premio Carlos J. Finlay otorgado por la UNESCO y el nombramiento de Investigador Internacional del Instituto Médico Howard Hughes, desde 1991. Actualmente es secretario académico del Instituto de Biotecnología de la UNAM y pertenece al nivel III del Sistema Nacional de Investigadores.

Jorge A. Ascacio Martínez. Es Químico Farmacéutico Biólogo egresado de la Universidad Autónoma de Coahuila y Maestro en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética por la Universidad Autónoma de Nuevo León. Ha trabajado en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas de la UANL en el área de

Biología Molecular e Ingeniería Genética y en el desarrollo de procesos Biotecnológicos de proteínas recombinantes de interés industrial. También ha participado en proyectos vinculados con las industrias biotecnológicas Biofarma y Probiomed. Ha impartido cursos y conferencias nacionales en el área de la Biología Molecular, Ingeniería Genética y Biotecnología. Su desarrollo académico y en investigación lo han llevado a obtener el Diploma al Mérito Universitario, otorgado por la UAC, dos premios de investigación por la UANL y uno de carácter nacional, así como diversas Menciones Honoríficas. Actualmente se encuentra en proceso de obtención del grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Ingeniería Genética y Biología Molecular por la UANL.

HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA. Es licenciado en Bioquímica, egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León y doctor en Biología Molecular por la Universidad de Texas en Houston, EUA. Realizó su posdoctorado en la Universidad Louis Pasteur de Estrasburgo, Francia. En 1977 inició labores de auxiliar docente y de investigación en la Universidad Autónoma de Nuevo León, en cuya Facultad de Medicina es maestro, fundador de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas y de la de Diagnóstico Molecular. En 1999 fundó el Centro de Biotecnología Genómica del IPN. Ha sido un pionero y líder en el campo de la biología molecular humana, la medicina molecular y de las aplicaciones biotecnológicas de las hormonas del crecimiento en México y Latinoamérica. Participó en el equipo de investigadores que en EUA estableció el récord mundial en 1988 por la secuenciación más extensa de DNA humano y que contribuyó a sentar las bases para el Proyecto del Genoma Humano. Sus trabajos de investigación en estos campos lo han llevado a obtener 10 premios de investigación por la UANL y 20 de carácter nacional, así como el máximo reconocimiento del SNI (nivel III). Por sus contribuciones al desarrollo de las ciencias biomédicas, fue el primer mexicano elegido miembro de la *Human Genome Organization,* la UANL lo nombró su primer profesor, la Escuela de Graduados en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Texas en Houston lo declaró su exalumno distinguido en 1998, y la Revista *Nature Medicine* le dedicó un perfil en su número de julio de 2003.

FRANCISCO GONZALO BOLÍVAR ZAPATA. Nació en la ciudad de México, en marzo de 1948. Doctor en Química (Bioquímica) por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Es investigador titular C desde

1982, y ese mismo año fue nombrado primer director del recién creado Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología de la UNAM. En septiembre de 1991, la UNAM transformó a este Centro en el Instituto de Biotecnología y Bolívar fue nombrado su primer director, cargo que ocupó hasta 1997. En ese año fue designado coordinador de la Investigación Científica de la UNAM, puesto que ocupó por espacio de tres años. Durante el período de 1996 a 2000 fungió también como vicepresidente y presidente de la Academia Mexicana de Ciencias (AMC).

Su trabajo de investigación y desarrollo tecnológico es pionero a nivel mundial en el área de la biología molecular y la biotecnología, en particular en el aislamiento, caracterización y manipulación de genes en microorganismos. Bolívar Zapata fue miembro de un grupo de investigadores que en San Francisco, EUA, lograron por primera vez en 1977 a nivel mundial, la producción por técnicas de ingeniería genética, de proteínas humanas en bacterias. Además, su trabajo en el área de la ingeniería de vías metabólicas en microorganismos, es también pionero en el propósito de la modificación genética y de la fisiología bacteriana, para el diseño y la optimización de microorganismos productores de metabolitos y proteínas de interés social y comercial.

Tiene más de 150 publicaciones en revistas y libros, las cuales han sido citadas más de 11,500 veces en la literatura mundial, incluyendo aquí más de 600 citas en 210 libros de texto y especializados. Como profesor y tutor ha impartido clases en diferentes programas docentes y ha dirigido más de 50 tesis, siendo la mayor parte de posgrado; muchos de sus alumnos son actualmente profesores-investigadores y técnicos en la UNAM y otras instituciones nacionales e internacionales, incluyendo la industria. Cuenta con más de 200 contribuciones en congresos y talleres y ha dictado más de 150 seminarios y conferencias docentes y de divulgación. Ha escrito y editado libros de divulgación y opinión, incluyendo cinco tomos de su obra científica y de divulgación, como miembro de El Colegio Nacional.

Como presidente de la AMC y a invitación de la Presidencia de la República, participó conjuntamente con el CONACyT y el Consejo Consultivo de Ciencias de la Presidencia de la República (CCC), en la elaboración y el consenso de la Iniciativa de Ley para el Fomento de la Investigación Científica y Tecnológica la cual fue aprobada de manera unánime por el Congreso de la Unión en 1999, y en la Iniciativa para la Creación de la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados, la cual fue creada por acuerdo Presidencial en 1999. Tam-

bién como presidente de la AMC, como coordinador de la Investigación Científica, como director, como investigador de la UNAM y miembro de la AMC, ha realizado numerosas intervenciones ante el Congreso de la Unión y ante la Presidencia de la República, en defensa y promoción de la ciencia, de la tecnología, de la Universidad y de la biotecnología.

Por su trabajo, ha recibido varias distinciones y 12 premios, entre los que destacan: En 1980, el Premio Nacional de Química otorgado por el Gobierno Federal. En 1982, el Premio Investigación en Ciencias Naturales, que otorga la AMC. En 1988, el Premio Manuel Noriega en Ciencia y Tecnología, que otorga la Organización de Estados Americanos. En 1990, el Premio Universidad Nacional. En 1991, el Premio Príncipe de Asturias en Investigación Científica y Técnica, que otorga en España la Fundación Príncipe de Asturias. En 1992, el Premio Nacional de Ciencias y Artes en el campo de Ciencias Físico-Matemáticas y Naturales, que otorga el Gobierno de la República. En 1997, el Premio TWAS en el área de la Biología que otorga, en Italia, la Third World Academy of Sciences; y en 1998, el Premio Luis Elizondo, que otorga el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. La Universidad de Lieja, Bélgica, le otorgó el doctorado *Honoris causa* y ha recibido distinciones y reconocimientos de las Universidades Autónomas de Coahuila, Nuevo León, Morelos y Benemérita de Puebla.

Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores (nivel III) desde 1984, del CCC desde 1992 y de El Colegio Nacional, desde 1994. Es miembro de la Junta Directiva de la Universidad Autónoma Metropolitana, desde 1997 y de la Junta de Gobierno de la UNAM, desde 2002.

PEDRO BOSCH GUHA. Es licenciado en Economía, egresado del Instituto Tecnológico Autónomo de México. Su trayectoria profesional se inicia en 1971 en el grupo Secretaría de Hacienda y Crédito Público-Banco de México. Participó como miembro del Grupo de Asesoría Personal del Presidente de la República, durante el periodo 1976- 1979, y en Petróleos Mexicanos, como asesor de la Dirección General, 1979-1982. De 1982 a 1988 fue director general de Planeación en el Banco Mexicano Somex; socio fundador en 1989 de la firma Preinversión Estudios y Proyectos, S.C., en la que prestó sus servicios hasta 1991. De junio de 1991 a enero de 1995, fue director general de Promoción Pesquera, cargo que desempeñó en la Subsecretaría de Fomento y Desarrollo Pesqueros de la Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. De 1995 a 1996, ocupó el cargo de director adjunto de Finanzas, en el Fondo Nacional de

Fomento al Turismo. Desde 1996 se desempeña como director de Proyectos Gubernamentales del Grupo Pulsar Internacional, S.A. de C.V., enfocado a la planeación, análisis y coordinación de diversos proyectos del Grupo ante instituciones y organismos gubernamentales.

Héctor Manuel Cárdenas Cota. Es Ingeniero Bioquímico egresado de la Universidad Autónoma de Sinaloa (1976), con diplomado en Administración de Empresas y en Microcomputación Administrativa por el Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, maestro en ciencias en Bioingeniería y doctor en ciencias en Biotecnología por el Cinvestav-ipn. Tiene más de 25 años como profesor de la Universidad Autónoma de Sinaloa habiendo impartido más de 100 cursos curriculares en química, bioquímica, ingeniería de fermentaciones y biotecnología. Ha dirigido más de 15 tesis, tres de ellas de posgrado. Tiene más de 25 participaciones en congresos nacionales e internacionales. Actualmente es investigador titular C del Centro de Ciencias de Sinaloa en la Dirección de Investigación y Desarrollo y coordinador del Programa de Biotecnología para un Desarrollo Agrícola Sustentable (bidas). Ha desempeñado trabajos de asesoría a diversas empresas, teniendo este tipo de vinculación con Agrobiológicos del Noroeste S.A. de C.V. (Agrobionsa) desde su creación en 1994, apoyándola en procesos, control de calidad y formulaciones básicas de productos.

María Mayra de la Torre Martínez. Es Ingeniera Bioquímica egresada del Instituto Politécnico Nacional, obtuvo el doctorado en Microbiología en el mismo Instituto y realizó una estancia posdoctoral en el Instituto Suizo Federal de Tecnología en Zurich, Suiza. Desde 1977 se incorporó como investigadora al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Actualmente es profesora invitada, en su periodo sabático, en el Centro de Investigación y Desarrollo en Alimentos A.C. en Hermosillo, Sonora. Desde antes de terminar los estudios de licenciatura empezó a realizar investigaciones en tecnología de fermentaciones, área a la que se ha dedicado toda su vida. Sus investigaciones se caracterizan por acoplar la investigación fundamental con el desarrollo tecnológico utilizando como herramientas la ingeniería química, la biología molecular y la bioquímica. Entre sus logros se encuentran el desarrollo de varias tecnologías de proceso para la fabricación de productos biotecnológicos, que actualmente están en el mercado, fundamentalmente levaduras para distintos propósitos, bioinsecticidas para

el control de plagas agrícolas y agentes para el biocontrol de hongos patógenos de plantas. Ella encabeza un grupo de investigación que diseñó y construyó una planta piloto de fermentaciones de propósito múltiple, esta planta funciona como un laboratorio de investigación y desarrollo, que además produce bajo contrato con empresas distintos productos biotecnológicos para pruebas de campo, apertura de mercado y registros. También ha colaborado con empresas en el diseño y arranque de plantas para la fabricación de estos productos. En este momento su investigación fundamental se centra en el efecto de las condiciones de proceso sobre la expresión diferencial de genes y sobre la modificación de los flujos metabólicos en el metabolismo central de Bt, así como en el estudio de la dinámica de las fases en un biorreactor utilizando velocimetría por seguimiento de partículas. Cuenta con más de 90 publicaciones en revistas y libros, incluyendo patentes, además de casi 50 reportes técnicos confidenciales que fueron entregados a empresas. Ha dirigido más de 30 tesis, la mayoría de ellas de posgrado. Por su trabajo ha recibido varias distinciones, siendo la primera mujer que recibió el Premio Nacional de Ciencias y Artes, en ciencias duras, y el laureado más joven en toda la historia del premio. Es miembro del SNI desde 1984, en la actualidad es nivel III. Así mismo fue presidenta de la Asociación Mexicana de Microbiología y de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería.

MARIO MARTÍN GONZÁLEZ CHAVIRA. Investigador titular C del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Obtuvo la licenciatura de ingeniero Agrónomo Fitotecnista en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, y la maestría en Biología Molecular de Plantas y doctorado en Biotecnología de Plantas en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados Unidad Irapuato. Ha trabajado en el mejoramiento genético de plantas mediante el uso de herramientas de biología molecular y en la caracterización de genomas de plantas y fitopatógenos usando marcadores genéticos de DNA con énfasis en la búsqueda de resistencia genética y su incorporación a nuevas variedades. Ha publicado 12 artículos en revistas científicas nacionales e internacionales, entre las que se encuentran *Phytopathology, HortScience, Euphytica, Physiological and Molecular Plant Pathology, Revista Mexicana de Fitopatología.* Sus trabajos han sido citados en más de cuarenta ocasiones en la literatura mundial. Ha formado 10 estudiantes; ocho de licenciatura y dos de maestría. Ha presentado más de 35 ponencias en congresos

nacionales e internacionales. Ha sido revisor de proyectos y posgrados del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Actualmente es responsable del Laboratorio de Marcadores Moleculares de la Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Bajío del INIFAP y pertenece al nivel I del Sistema Nacional de Investigadores.

GUILLERMO GOSSET LAGARDA. Nació en la ciudad de Colima en 1961. Realizó sus estudios de posgrado en la Universidad Nacional Autónoma de México, obteniendo el grado de doctor en Biotecnología en 1993. Actualmente es investigador titular A en el departamento de Ingeniería Celular y Biocatalísis del Instituto de Biotecnología/UNAM. Su trabajo de investigación se relaciona al estudio de la fisiología microbiana y a la aplicación de la ingeniería de vías metabólicas para el desarrollo de nuevas tecnologías biológicas. Tiene 24 publicaciones en revistas y libros de circulación internacional. Estos trabajos has sido citados en 209 publicaciones de investigación y en seis libros. Sus publicaciones relacionadas a la producción de compuestos aromáticos en bacterias son citadas y utilizadas como ejemplos en los principales libros de texto sobre ingeniería de vías metabólicas. Cuenta con una patente y participó en el grupo que desarrolló una tecnología para producir insulina humana en la bacteria *Escherichia coli*. Dicha tecnología fue transferida a una compañía mexicana. Por sus estudios y trabajo de investigación ha recibido varias distinciones, entre las que destacan: la medalla Gabino Barreda otorgada por la UNAM por mejor promedio durante los estudios de Maestría y el Premio Alfredo Sánchez Marroquín a las mejores tesis en Biotecnología y Bioingeniería en la categoría de Tesis Profesional, otorgado al trabajo de tesis de un alumno de licenciatura. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde 1992, siendo actualmente nivel II. Como tutor, ha dirigido el trabajo experimental de tres alumnos de licenciatura, dos de maestría y uno de doctorado. Actualmente dirige una tesis de licenciatura y cinco de posgrado.

ADOLFO GRACIA GASCA. Es licenciado en Biología, egresado de la Facultad de Ciencias de la UNAM, y realizó estudios de maestría en Ciencias (Biología) y doctorado en Ciencias (Biología), en la misma Facultad. Es investigador titular "B" de tiempo completo del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM; actualmente se desempeña como director de este Instituto. Las líneas de investigación que desarrolla son la ecología de poblaciones y pesquerías de crustáceos como el camarón, ecología de

comunidades bénticas y biología de crustáceos decápodos. Tiene cerca de 50 publicaciones, 33 de ellas en revistas arbitradas de circulación internacional, seis capítulos en libros, 11 artículos de divulgación y la traducción de un libro sobre su especialidad. Los resultados de sus investigaciones han proporcionado elementos importantes para el establecimiento de medidas para la conservación y el manejo del camarón como recurso pesquero, por lo cual se ha desempeñado como asesor de la Cámara Nacional de la Industria Pesquera y Acuícola del país en el manejo de dicho recurso y ha participado en varios comités gubernamentales relacionados con el aprovechamiento sustentable del camarón. Ha dirigido cuatro tesis de doctorado, ocho de maestría y 16 de licenciatura. Ha impartido alrededor de 30 cursos de licenciatura y posgrado en la UNAM y otras universidades del país, y un gran número de conferencias nacionales e internacionales. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde 1984. Pertenece a la Academia Mexicana de Ciencias, donde es director del Programa de Oceanografía, y también participa en varias sociedades científicas nacionales e internacionales, entre ellas la Southeastern Universities Research Association.

RAMÓN GERARDO GUEVARA GONZÁLEZ. Es profesor-investigador "C" del Departamento de Ingeniería Bioquímica del Instituto Tecnológico de Celaya. Su formación profesional ha sido a nivel licenciatura Químico Bacteriólogo Parasitólogo por parte de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León; Maestría y Doctorado en Ciencias en Biotecnología de Plantas por parte de CINVESTAV-Irapuato, con la especialidad de Virología Molecular de Plantas. Su área de investigación se involucra con el estudio a nivel molecular de virus de plantas y sus interacciones con el hospedero. Ha publicado 15 artículos de investigación en revistas internacionales y nacionales como *Virology, Journal of General Virology, Phytopathology, Plant Disease, Archives of Virology, Hortscience, Euphytica, Revista Mexicana de Fitopatología e Información Tecnológica.* En cuanto a formación de recursos humanos, ha graduado a 24 alumnos a nivel licenciatura y tres a nivel maestría. Ha pertenecido a comités de evaluación de CONACyT- Sistema Miguel Hidalgo y COSNET; asimismo ha sido jurado calificador en el certamen nacional juvenil de ciencia y tecnología. Es co-autor de una publicación internacional de autores mexicanos que es considerada como una cita clásica por parte del Internacional Scientific Information (ISI). Tiene cerca de 100 citas totales a sus publicaciones. Actualmente pertenece al Sistema Nacional de Investigadores Nivel I.

Luis Herrera Estrella. Ingeniero Bioquímico egresado de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Realizó estudios de posgrado en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN y en la Universidad Estatal de Gante, Bélgica. Actualmente es Director de la Unidad de Biotecnología Vegetal del Cinvestav y profesor titular del Departamento de Ingeniería Genética. Su trabajo de investigación ha quedado plasmado en las más de 100 publicaciones en revistas y libros internacionales de prestigio, entre las que destacan cinco publicaciones en la revista *Nature*, tres en *Science*, cinco en *EMBO Journal*, una en la serie *Annual Review of Plant Physiology* y una en la revista *Cell*, y las más de 150 conferencias internacionales y nacionales dictadas. Dos de sus publicaciones son consideradas como artículos clásicos en el área de la Biotecnología vegetal. La relevancia su trabajo científico se ve reflejado en más de 2800 citas que han recibido sus publicaciones, así como por premios internacionales y nacionales que le han sido otorgados. Los más importantes son el premio Minuro y Ethel Tsutsui de la Academia de Ciencias de Nueva York, El premio Javed Husain de la UNESCO al mejor científico joven en el área de biología, la Medalla de Oro de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual como uno de los inventores más destacados de México, el Premio de la Academia de la Investigación Científica de México y el Premio Nacional de Ciencias y Artes 2002. En el ámbito del desarrollo tecnológico ha realizado importantes contribuciones que han sido reconocidas con cuatro patentes internacionales. Sus aportaciones tecnológicas más importantes son: el desarrollo de la tecnología que permite la producción de plantas transgénicas y el desarrollo de plantas transgénicas que requieren menos fertilizantes para su crecimiento óptimo. El doctor Herrera fue líder del grupo que produjo las primeras plantas transgénicas en el mundo. Es Presidente de la Sociedad Internacional de Biología Molecular de Plantas, miembro del Consejo Asesor del Programa de Biotecnología de la UNESCO, del Programa de Biotecnología para América Latina de la Universidad de las Naciones Unidas y del Instituto de Investigación Donald Danford. El doctor Herrera es uno de los 30 investigadores latinoamericanos cuyos programas de investigación son financiados por el Instituto Médico Howard Hughes y fue elegido en abril de 2003 Miembro Extranjero de la Academia de Ciencias de los Estados Unidos por sus sobresalientes y continuas contribuciones al desarrollo científico mundial. Ha dirigido el trabajo experimental de siete tesistas de licenciatura, cinco maestros en ciencias y 16 doctores en ciencias.

Agustin López-Munguía Canales. Es ingeniero químico, egresado de la Facultad de Química de la UNAM; tiene la maestría en Ingeniería Bioquímica de la Universidad de Birmingham, Inglaterra y el doctorado en Biotecnología del Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas de Toulouse, Francia. Es investigador titular "C" de tiempo completo en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Su área de investigación es la biotecnología alimentaria y, en particular, la ingeniería y tecnología de enzimas. Ha publicado 80 artículos de investigación en revistas arbitradas, nacionales e internacionales y cuenta con más de 60 presentaciones en congresos. Es editor y autor del libro Biotecnología alimentaria, de Editorial Limusa (1993) y de los libros de divulgación Alimentos: del tianguis al supermercado, de la colección Viaje al Centro de la Ciencia de Conaculta (1995) y La biotecnología, de la colección Tercer Milenio de Conaculta (2000) y recientemente, Alimentos Transgénicos también dentro de la colección Viaje al Centro de la Ciencia. Asimismo, es autor de diversos artículos de divulgación. Es profesor titular de la materia de Biotecnología en la Facultad de Química de la UNAM, y coordinador del Tópico Selecto "Biocatálisis", en la Maestría en Biotecnología de la UACPYP-CCH. Ha impartido más de 70 cursos cortos a nivel nacional. En el extranjero ha dictado conferencias y cursos en Venezuela (Universidad Central), Colombia (Universidad Industrial de Santander y Universidad Nacional de Colombia), República Dominicana (Indotec), Universidad de las Naciones Unidas, y en Portugal. Ha dirigido 35 tesis de licenciatura, 19 de maestría y seis de doctorado. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Área de Ingeniería y Tecnología, nivel III. Entre las distinciones recibidas destacan el Premio Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos Conacyt (1992), la Distinción de la Academia de la Investigación Científica en el área de Tecnología (1990), el Premio Universidad Nacional 2000 en el área de Innovación Tecnológica y el Premio Nacional de Ciencias y Artes 2003, otorgado por el gobierno de la República.

Miguel Martínez Trujillo. Nació en la ciudad de Colima, Colima en 1958. Es Biólogo por parte de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (1981), Maestro en Ciencias por parte del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV-IPN (1989) y Doctor en Ciencias por parte del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. Se ha desempeñado como Profesor Investigador Titular en la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana desde 1989. Ha asesorado 18 tesis de Biólogo a nivel licenciatura, ha publicado tres artículos internacionales, 15 artícu-

los nacionales, dos capítulos de libros y presentado 40 trabajos de investigación en Congresos y Encuentros. Actualmente es Candidato a Investigador Nacional del SNI. En el periodo 1992-1996 se desempeñó como Director de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana.

GABRIELA M. MONTERO MORÁN. Nació en la ciudad de México, en 1971. Doctora en Ciencias (Bioquímica) por la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 2001. Es profesora de asignatura del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina desde agosto de 1997 en la que imparte la materia de Bioquímica y Biología Molecular. Actualmente se encuentra como Investigadora Asociada 'C' de tiempo completo con un contrato posdoctoral, en el Instituto de Biotecnología, UNAM, desarrollando el proyecto de Ingeniería de Proteínas para la producción de derivados de compuestos aromáticos en el laboratorio del doctor Xavier Soberón. Realizó una estadía de investigación en julio de 1998 en el Medical Research Council en el Centro de Ingeniería de Proteínas (MRC), Cambridge, Inglaterra. Su trabajo incluyó diferentes metodologías de Biología Molecular: purificación y amplificación de DNA (PCR), mutagénesis, metodologías de evolución *in vitro* como barajeo de genes o *DNA shuffling* y expresión en fagos, así como sistemas de selección *in vivo* y expresión de proteínas. Obtuvo el nombramiento de candidato a Investigador Nacional durante el periodo del 1o. de julio de 1998 al 30 de junio del 2001. Desde 2000 es miembro de la Sociedad Mexicana de Bioquímica. Ha participado como ponente en congresos nacionales y como autora y coautora en congresos internacionales. Tiene publicaciones tanto en revistas nacionales como en internacionales.

ADALBERTO NOYOLA ROBLES. Realizó estudios de ingeniería ambiental en la Universidad Autónoma Metropolitana-Azcapotzalco, en México D.F. (1976-1980). Posteriormente cursó la maestría y el doctorado en ingeniería de tratamiento de aguas residuales en el Instituto Nacional de Ciencias Aplicadas (INSA) de Toulouse, Francia (1981-1985). Ha laborado en la Universidad Autónoma Metropolitana-lztapalapa y actualmente se desempeña como Investigador Titular B en el Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), nivel Pride D. Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores desde 1986 (nivel II). Su línea de investigación es el tratamiento de aguas residuales por vía biológica, en particular los proceso anaerobios. Ha publicado 25 artículos en revistas científicas internacionales, 18 en revistas nacionales, varios

capítulos en libros, además de un gran número de presentaciones e invitaciones a congresos nacionales e internacionales. Es autor de cinco patentes y está activo en la transferencia de tecnología hacia el sector privado.

Ha dirigido y graduado 38 tesis de licenciatura, seis de maestría y dos de doctorado. Algunos reconocimientos a su trabajo académico son la Distinción Universidad Nacional para Jóvenes Académicos 1991, el Premio Ciba para la Innovación Tecnológica en Ecología 1993 y el Premio Universitario León Biálik, en dos ocasiones, 1992 y 1998. Ha sido Vicepresidente y Presidente de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A. C. y de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales (FEMISCA) A. C. Actualmente es Vicepresidente de Desarrollo Tecnológico de la Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (AIDIS).

IRMENE ORTIZ LÓPEZ. Es licenciada en Ingeniería Química, egresada de la Universidad Veracruzana-Xalapa (1988–1992). Realizó la maestría (1995-1998) y el doctorado (1999–2003) en Ingeniería Química en la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa, en México D. F. Sus investigaciones han estado relacionadas con la degradación de compuestos aromáticos volátiles en aire y de hidrocarburos en suelos, contaminados por las actividades de la industria petrolera. En 1998, fue becada por la Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA), donde realizó estudios de especialización en el Instituto Nacional de Recursos Naturales y Medio Ambiente (NIRE), en Tsukuba-Ibaraki, Japón. Ha efectuado estancias doctorales en Francia, en la Universidad de Montpellier II, en Montpellier (2000) y en el Instituto Nacional de la Investigación en Agronomía (INRA) en Marsella (2001). Ha participado en diversos congresos nacionales e internacionales sobre Biotecnología Ambiental y Biorremediación de Suelos. Es autora de artículos cintíficos en revistas de arbitraje internacional como son Environmental Science and Technology, Environmental Technology y Process Biochemistry.

JUAN ALBERTO OSUNA CASTRO. Es originario de Escuinapa, Sin. (1971). Obtuvo el grado de Ingeniero Bioquímico en la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, Culiacán, Sin. (julio, 1994). Posteriormente recibió el grado de doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología de Plantas por la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Irapuato, Gto. (marzo, 2003). Autor de ocho artículos científicos, tres

capítulos de libros y revisiones, nacionales e internacionales. Ha realizado estancias de investigación científica en el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato bajo la dirección del doctor Octavio Paredes López (julio 1994- a la fecha) y en el Long Ashton Research Station de la University of Bristol, en Bristol, Inglaterra dentro del programa de doctorado bajo la supervisión del Prof. Peter R. Shewry (marzo 1998-mayo 1999). Mejor Estudiante de la Generación de la Carrera de Ingeniería Bioquímica (1989-1994) y graduado con honores; Premio ATAM-TZUAL al Mejor Trabajo Técnico en la Categoría Estudiantil en el XXV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos organizado por la Asociación Nacional de Tecnólogos en Alimentos de México (ATAM), Acapulco, Gro. (abril, 1994); Becario del IV Verano de la Investigación Científica organizado por la Academia Mexicana de Ciencias (julio-agosto, 1994). Dictaminador de los Proyectos en el área de Ciencias Naturales y Exactas en el Marco de la Convocatoria 2001 del Acuerdo México-Francia relativo a la Formación y Capacitación Científica y Técnica. Revisor en la revista internacional Plant Foods for Human Nutrition (Kluwer).

GERARDO RAYMUNDO PADILLA RIVAS. Es Ingeniero Zootecnista egresado en 1991 de la Universidad Autónoma de Baja California, Maestro en Ciencias en Producción Animal de la Universidad Autónoma de Nuevo León en 1994, y en 2000 Doctor en Biotecnología de la Reproducción por la George August Universitaet de Goettingen, Alemania. En 2001 inició labores como investigador y docente en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California, en donde fue también coordinador del Doctorado en Ciencias Agropecuarias. En 2003 inició labores como investigador y docente en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de Nuevo León, donde es también responsable del Laboratorio de Biotecnología de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas.

OCTAVIO PAREDES LÓPEZ. Es originario de Mocorito, Sin. Estudió la carrera de Ingeniería Bioquímica y obtuvo el grado de Maestro en Ciencias Alimentarias en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN. Maestro en Ingeniería Bioquímica por la Academia Checa de Ciencias. Posteriormente recibió el grado de doctor en Ciencia de Plantas (Ph.D.) de la University of Manitoba en Winnipeg, Canadá. Ha efectuado estan-

cias de investigación y posdoctorales en Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Francia, Alemania, Suiza, República Checa y Brasil. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores (nivel III) y es autor de 200 artículos científicos y técnicos, 36 capítulos en libros y revisiones, tres libros internacionales y diversos artículos periodísticos. Ha dirigido 25 tesis de licenciatura, 38 de maestría y 18 de doctorado.

Algunos premios y distinciones: 1) Banco Nacional de México (BANAMEX) Ramo Agropecuario. 2) Presea Lázaro Cárdenas como Investigador Distinguido del IPN, 1981. 3) Premio Nestlé por Investigación y Desarrollo sobre Alimentación Humana. 4) Premio Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos en cinco diferentes ocasiones. 5) Premio Nacional al Mérito en Ciencia y Tecnología de Alimentos 1986. 6) Premio Nacional de Química 1991 "Andrés Manuel del Río", por la Sociedad Química de México. 7) Premio Nacional de Ciencias 1991 otorgado por la Presidencia de la República. 8) Doctor *Honoris causa* otorgado en 1992 por el Consejo Universitario de la Universidad Autónoma de Querétaro. 9) Denominado "Profesor Distinguido" por parte de la Universidad Autónoma de Sinaloa. 10) Profesor invitado de la Universidad de Manitoba (Canadá) y de la Texas A&M University (Estados Unidos). 11) Presea L. Cárdenas como egresado distinguido del IPN, 1993. 12) Premio Miguel Hidalgo y Costilla otorgado por el Congreso del Estado de Guanajuato, 1993. 13) Seleccionado por CONACYT para recibir Cátedra Patrimonial 1, 1994- a la fecha. 14) Asesor Científico de la Presidencia de la República a través del Consejo Consultivo de Ciencias. 15) Denominado Ciudadano Distinguido de lrapuato. 16) Designado Pionero de la Ingeniería Bioquímica en México en el ler. Congreso lnternacional de Ingeniería Bíoquímica, 1994. 17) Denominado "Hijo Predilecto" por el Municipio de Mocorito, Sin., con motivo de los cuatrocientos años de su fundación, 1994. 18) Premio Científico y Tecnológico Luis Elizondo del Patronato del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, 1994. 19) Miembro vitalicio de El Colegio de Sinaloa, 1997. 20) Asesor Científico de la lnternacional Foundation for Science, Estocolmo, Suecia, 1998. 21) Premio Third World Network of Scientific Organizations (TWNSO) 1998, Trieste, Italia. 22) Fundador de la lnternacional Academy of Food Science and Technology dentro del grupo de 30 científicos a nivel mundial seleccionado por la lnternacional Union of Food Science and Technology, Sidney, Australia 1999. 23) Editor general y editor asociado de tres revistas científicas internacionales, y revisor de 10 revistas científicas y de difusión, nacionales e internacionales. 24) Doctor *Honoris causa*

otorgado en 1999 por el Consejo Universitario de la Universidad Autónoma de Sinaloa. 25) Premiado con la Presea Vasco de Quiroga; máxima distinción que otorga el Municipio de Irapuato, 2000. 26) Miembro del Consejo Consultivo de Ciencia y Tecnología del CONACYT, 2000-2002. 27) Designado Miembro de la Academia Mexicana de Ciencias Agrícolas, Nov. 2002. 28) Vicepresidente (2002-2003) y Presidente (2004-2005) de la Academia Mexicana de Ciencias. 29) Coordinador General del Premio México de Ciencia y Tecnología, CONACYT-Consejo Consultivo de Ciencias, 2002. 30) Miembro del Comité de Premiación, Third World Academy of Sciences, Trieste, Italia, 2002.

Ha establecido grupos regionales para el desarrollo científico y tecnológico del país, entre otros, fundó el primer programa académico regional en México denominado Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República, actualmente es su asesor científico, con la participación de seis universidades y cuya sede es la Universidad de Querétaro; tanto la maestría como el doctorado han estado y están en el Padrón de CONACYT. Fundador del Programa de Doctorado en Biotecnología del Noroeste. Asesor científico de organismos y empresas internacionales. Ha sido asesor académico del Programa de Doctorado en Biotecnología y Alimentos de la Facultad de Química de la UNAM, 1990-1998. Fue fundador, Director y actualmente profesor de la Unidad Irapuato del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV, 1981 a la fecha). Asesor de los Rectores de las Universidades de Querétaro, Sinaloa y de Occidente.

ANTONIO ALÍ PÉREZ MAYA. Es licenciado en Bioquímica, egresado de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana, Cuba. De 1996 a 1997 realizó prácticas profesionales en el Departamento de Anticuerpos Monoclonales del Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros del Instituto Finlay de La Habana, Cuba. Recibió capacitación en las técnicas de "hibridización por fusión", clonaje y cultivo de hibridomas, sistemas de ensayo de actividad de anticuerpos monoclonales y metodologías básicas para la producción y purificación de éstos. De 1998 al 2000 laboró en el Laboratorio de Citogenética del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Hematología e Inmunología en la Habana, Cuba. Participó en el cultivo de muestras de médula ósea de las diferentes hemopatías malignas, la obtención de cromosomas, reconocimiento del cariotipo e impartió instrucción teórica sobre aspectos generales de citogenética a doctores residentes. En 2000 desarrolló actividades en el

laboratorio de calidad de agua y sedimentos marinos del departamento de ecotoxicología del Centro de Investigaciones Pesqueras de La Habana, Cuba. Del 2002 al 2003 Supervisor del laboratorio de Biotecnología del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL donde trabaja en la producción de hormonas del crecimiento (GHs) de origen humano y animal, así como su purificación y análisis así como en la generación de anticuerpos policlonales anti-GHs en conejos.

OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH. Es Ingeniero Químico de la UNAM y doctor en Ingeniería Química y Bioquímica de la Universidad de Drexel, EUA. Desde 1990 es investigador del Instituto de Biotecnología de la UNAM; es investigador nacional nivel III y ha obtenido diversas distinciones, entre las que destacan: el Premio de Investigación 1998 de la Academia Mexicana de Ciencias; la Distinción Universidad Nacional para Jóvenes Académicos 2000; Premio Sigma Xi al mejor trabajo de posgrado de la Universidad de Drexel, EUA; el Premio Carlos Casas Campillo de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería; en dos ocasiones el Premio por Mérito Académico al mejor estudiante internacional de la Universidad de Drexel; miembro del Comité Editorial de la revista Biotechnology and Bioengineering y diversos premios de organizaciones como el premio Anual Casa de la Ciencia de la UAEM, IMIQ y Academia Nacional de Ingeniería. Ha sido pionero en México en el área de la bioingeniería del cultivo de las células de eucariotes superiores y en la aplicación de métodos computacionales para el control de bioprocesos entre los que destacan, además del cultivo de células animales, las fermentaciones con microorganismos recombinantes, cultivos mixtos y axénicos, y el escalamiento descendente. Ha pulicado 58 artículos científicos, editado dos libros de difusión internacional y tiene más de 284 citas a sus trabajos en la literatura científica. Su labor ha trascendido del ámbito académico al industrial a través de su amplia labor de asesoramiento y participación en empresas e instituciones, tanto nacionales como extranjeras. Esta labor ha dado diversos frutos como el desarrollo de nuevos productos y procesos biotecnológicos en el área de alimentos, farmacéutica y ambiental.

SERGIO REVAH MOISEEV. Es ingeniero químico egresado de la UNAM (1975). Realizó sus estudios de maestría en Ciencia de Alimentos en la Universidad de California en Davis (1978), y de doctorado en Ingeniería de Procesos en la Universidad de Tecnología de Compiégne en Francia (1986). Es actualmente profesor titular en el Departamento de Ingenie-

ría de Procesos de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa e investigador nacional nivel III del Sistema Nacional de Investigadores. Desde 1987 dirige un laboratorio de ingeniería aplicada a procesos biológicos. Actualmente, sus principales líneas de investigación se encuentran en la eliminación biológica de contaminantes gaseosos producidos por fuentes fijas. La formación de este laboratorio ha sido posible gracias al apoyo de la UAM, a contratos de investigación con agencias de apoyo y empresas privadas mexicanas (CONACYT, IMP y el Grupo Cydsa) e internacionales (IFS de Suecia, OEA, IRD de Francia, JICA de Japón, la Agencia Internacional de Energía Atómica, el Departamento de Energía de Estados Unidos y con la Comunidad Económica Europea).

Ha graduado a la fecha a 30 estudiantes de posgrado. Ha publicado cerca de 50 artículos en revistas internacionales con arbitraje. Ha participado en el desarrollo de varias tecnologías, de las cuales una tiene registro internacional y se ha exportado.

IRAM PABLO RODRÍGUEZ SÁNCHEZ. Realiza sus estudios de licenciatura en la Facultad de Ciencias Biológicas, es egresado de la Preparatoria Técnica Médica donde cursó la especialidad de laboratorista clínico. En el año de 1999 se incorpora a la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, donde se desarrolla como personal técnico apoyando investigaciones y tesis. Con la experiencia recolectada en los apenas tres años de dedicación a la investigación, ha participado como ponente en diferentes congresos, como instructor invitado en cursos de carácter internacional.

CELIA NOHEMI SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ. Es Química Clínica Bióloga y Maestra en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética. Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL. Desarrolla actividades de docencia en el área de Bioquímica y Biología Molecular para las carreras de Químico Clínico Biólogo, Médico Cirujano Partero y también en el Posgrado. Fue supervisora del laboratorio de Biotecnología de 1998 al 2003, trabajando con la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* en la producción de hormonas del crecimiento y proteínas relacionadas de origen humano y animal, así como su purificación, análisis y evaluación de la actividad biológica. Actualmente supervisora del Laboratorio de Enfermedades Hereditarias y Cáncer de la Unidad de Diagnóstico del mismo Departamento,

con actividades tanto de Servicio externo como en la actualización e implementación de nuevos diagnósticos moleculares.

José Antonio Serratos Hernández. Es licenciado en Biología por la Universidad Nacional Autónoma de México, con especialidad en Agroecología por el Instituto de Investigación en Recursos de la Tierra (Land Resources Research Institute), del Ministerio de Agricultura y Alimentación de Canadá. Es maestro en ciencias en Biología por la Universidad de Ottawa en Canadá y doctor en Biotecnología por el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Desde 1992, es investigador titular del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. De 1993 a 1999 fue miembro del Comité Nacional de Bioseguridad Agrícola. Desde el año 2000 es delegado representante de México en el Grupo BIOT (Working Group on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology) de la OECD. Actualmente ocupa la posición de científico adjunto representante del INIFAP en el Centro de Biotecnología Aplicada (Applied Biotechnology Center) del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Ha realizado investigación en los mecanismos bioquímicos de resistencia del maíz y la cebada a la infestación de insectos y patógenos. Ha colaborado con centros y universidades internacionales en el escrutinio y aprovechamiento del germoplasma de maíz mexicano. Actualmente lleva a cabo investigación en la biología molecular de la apomixis (reproducción asexual de plantas), en colaboración con el CIMMYT y la institución francesa IRD (Institut de Recherche pour le Dévélopement). Es asesor de la CIBIOGEM (Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados), 2002-2003; y Miembro del Subcomité Especializado de Medio Ambiente en el INE (Instituto Nacional de Ecología).

Jorge Soberón Mainero. Es licenciado en Biología, egresado de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Tiene la maestría en Ciencias, por la misma Facultad y el doctorado en Ecología por el Imperial College de la Universidad de Londres. Ha publicado 43 trabajos en revistas de circulación internacional, artículos en revistas de divulgación científica, libros científicos y capítulos en libros. Ha impartido más de 30 cursos a nivel de licenciatura y de posgrado en matemáticas, estadística, evolución y ecología de poblaciones. Ha dirigido tesis de licenciatura, maestría y doctorado. Ha sido profesor en la Facultad de Ciencias de la UNAM, coordinador del doctorado en Ecología en el Instituto de Ecología de la UNAM y jefe

de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Es investigador titular en el Instituto de Ecología de la UNAM desde 1985. Es investigador nacional, miembro de la Sociedad Mexicana de Botánica, de la Sociedad Mexicana de Lepidopterología y de la Society for Conservation Biology. Asimismo, fue miembro del Comité Científico del Global Environment Facility 1995-1998 y vicepresidente científico de Pronatura, AC, durante el periodo 1992-1998. Actualmente y desde 1992 es secretario ejecutivo de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

FRANCISCO XAVIER SOBERÓN MAINERO. Es licenciado en Química y doctor en Investigación Biomédica Básica, egresado de la UNAM. Desde su incorporación a la UNAM en 1981 ha participado en el desarrollo de la Ingeniería Genética y la Biotecnología. Participó en la creación del CIIGB en 1982; al término de su doctorado, en 1984, siendo secretario académico del mismo Centro, inició un grupo independiente en el área de la ingeniería de proteínas. De 1979 a 1981, durante su estancia en el Instituto City of Hope, en California, se especializó en la síntesis química de oligonucleótidos y empezó a perfilar una carrera científica sustentada en metodología de vanguardia. A su regreso a México, estableció la primera unidad de síntesis de oligonucleótidos en Latinoamérica. En los últimos años ha cultivado el moderno enfoque de evolución dirigida, en el ámbito de la biocatálisis. Tiene más de 70 publicaciones, 39 de las cuales son artículos de investigación original publicados en revistas internacionales arbitradas, y que han recibido más de 1 500 citas en la literatura internacional. Asimismo, ha sometido dos patentes internacionales en el área de síntesis química de oligonucleótidos, con esquemas útiles para la evolución dirigida. Como profesor y tutor ha dirigido más de 25 tesis, la mayoría de ellas de posgrado. Por su trabajo, ha recibido varias distinciones, entre ellas la Medalla Gabino Barreda UNAM por estudios de maestría; Mención Honorífica en los premios Canifarma en 1994 y el Premio Nacional de Química Andrés Manuel del Río en 1999. Desde 2002 es miembro del SNI nivel III y en 1998 obtuvo el nombramiento de investigador titular "C" de la UNAM. A partir de 1997 es el director del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

IRINEO TORRES PACHECO. Investigador Titular "C" de la Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Bajío perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícola y Pecuarias. Se graduó como Ingeniero Agrónomo especialista en Fitomejoramiento en la Fa-

cultad de Agrobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Los estudios de posgrado los realizó en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados de la Unidad Irapuato, en el Departamento de Ingeniería Genética; la maestría en Biología vegetal y el doctorado en Biotecnología de plantas. Su actividad como investigador ha estado relacionada con las hortalizas y sus enfermedades, con énfasis en geminivirus, cucumovirus, tobamovirus y potyvirus, los cuales son los virus recurrentes en las hortalizas. Ha publicado en revistas internacionales tales como *Phytopathology, Journal of General Virology, Plant Pathology* y *Hort Science* 16 artículos y su trabajos han sido citados en más de 160 artículos relacionados a nivel mundial. Ha formado 19 estudiantes, 17 de licenciatura y dos de maestría. Como profesor invitado colabora en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. Ha participado con más de 70 ponencias y conferencias en congresos nacionales e internacionales. Actualmente es revisor de trabajos que se publican en la Revista Mexicana de Fitopatología y Fitotecnia, las cuales son revistas nacionales indexadas. Es miembro del Consejo Consultivo de la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados. Es el líder de Investigación en Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias y pertenece al nivel I del Sistema Nacional de Investigadores.

Eduardo Torres Sánchez. Es Ingeniero Agrónomo egresado de la Universidad Autónoma de Sinaloa (1986). Fundó en 1994 junto con su padre Eduardo Torres Pompa, Agrobiológicos del Noroeste S. A. de C. V. (Agrobionsa, es una empresa dedicada a la producción y comercialización de agrobiológicos), desempeñándose como Gerente General. Ha asesorado a más de 50 empresas en el uso de agentes microbianos de control biológico en 15 estados de la República Mexicana, capacitando al personal técnico de los campos agrícolas en el uso apropiado de los productos biológicos para el control de plagas agrícolas.

Jaime Uribe de la Mora. Ingeniero Químico egresado de la Universidad Iberoamericana con posgrado en Economía. Inicia su carrera profesional en las Fábricas de Papel Loreto y Peña Pobre, después en Kimberly Clark y posteriormente trabajó en la industria del plástico en las empresas Manufacturera Aztlán, Mercadotecnia Industrial y finalmente en Plastifin ocupando la Dirección General de esa empresa. Fundador junto con otros cuatro socios de Productos Químicos Finos en 1970, ocupó el

puesto de Responsable de la Producción y en 1975 ocupa la Dirección General de la empresa y de PROQUIFIM, S. A. de C. V., de la cual también es fundador. Estas empresas se dedicaban a la fabricación de farmoquimícos (principios activos de las medicinas), ya sea por síntesis química o por procesos extractivos. Se fabricaron productos como Sulfametazina, Sulfamerazina, Sulfatiazol, Dipironas, Vitamina B12, Cianocobalamina, Hidroxocobalamina, Cloramfenicol y sus sales, etc. Por procesos extractivos se fabricó Gonadotropina Coriónica partiendo de orina de mujeres embarazadas y Heparina partiendo de mucosa intestinal de cerdo que se recolectaba de todos los rastros del país. En 1977 se iniciaron las exportaciones de Heparina principalmente a Europa y hasta la fecha continúan las exportaciones, aunque han variado los productos. Desde 1975 inició un laboratorio de Investigación y Desarrollo, para generar nuevas tecnologías, y mejorar y optimizar las existentes con técnicos y científicos mexicanos. También fue Director General de los Laboratorios Helber de México, Laboratorios CHEMIA, y Laboratorios GALEN. En 1988 inicia los trabajos para desarrollar Proteínas con la tecnología del ADNr. Es pionero de la Biotecnología Industrial y fabricante único en México de Proteínas y Vacunas Recombinantes. En 1994 adquiere PROBIOMED y en 1998 inicia la comercialización de productos a base del ADNr, fabricados en México desde el Gen y la clonación hasta el medicamento, logrando tener el Porcentaje de Integración Nacional más alto de la Industria Farmacéutica y el Valor Agregado de Manufactura más alto de toda la Industria a nivel Nacional, razón por la cual se le otorgó el Premio Nacional de Tecnología en 1999, año en que se instituyó. Siempre ha trabajado en la integración de las cadenas productivas y buscando la vinculación y colaboración del sector académico científico tanto en México como en el extranjero. Actualmente es Presidente y Director General de PROBIOMED y Presidente de la Fundación en PRO DE LA VIDA.

GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ nació en México, D.F., en 1940. Es Médico Cirujano por la Universidad Nacional Autónoma de México (1965) y en 1967 obtuvo el grado de Maestro en Ciencias (Bioquímica) por el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN. Realizó el doctorado en biofísica en la Universidad de California, San Francisco, EUA (1971) y fue estudiante de posdoctorado en la Universidad de Pensilvania (1972). En 1972 ingresó como Investigador Titular A para crear el Depto. de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Fue promovido a lnv. Tit. B en 1976. Desde 1977 ha sido Profesor Titu-

lar C de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, donde contribuyó a la fundación del Departamento de Biotecnología. Las principales distinciones obtenidas son: En 1982, Socio de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. De 1982 a 1990 fue miembro de la Junta Directiva de la UAM. En 1985, obtuvo el Premio Nacional al Mérito en Ciencia y Tecnología de los Alimentos y fue admitido a la Academia Mexicana de Ciencias. En 1995 fue nombrado Profesor Distinguido por acuerdo del Colegio Académico de la UAM. En abril de 2001 se le otorgó el doctorado *Honoris causa* de la Universidad Aix-en-Provence (Marsella, Francia) En enero de 2002 obtuvo el nombramiento de Investigador Nacional Emérito. En 2002 fue electo como representante del Área de Ingeniería y Tecnología del Foro Consultivo de Ciencia y Tecnología y se le admitió a la Orden de las Palmas Académicas de Francia. Organizó y supervisó el grupo que registró el primer invento biotecnológico (el proceso Biofermel) licenciado comercialmente por una universidad mexicana. Sus trabajos especializados han merecido más de 300 citas publicadas en revistas científicas internacionales. Las líneas de investigación del doctor Gustavo Viniegra son la fisiología y genética de hongos, el desarrollo de cepas especializadas para fermentaciones de sustratos sólidos y las transformaciones genéticas de *Aspergillus niger* para aumentar la producción de enzimas.

ÍNDICE DE MATERIAS

ablandamiento de los frutos: 177
acceso a los recursos genéticos: 312
acceso público a la información: 304
aceites de pescado: 676
aceites vegetales: 460
ácido 6 aminopenicilánico: 438
ácido desoxirribonucleico (DNA): 5, 11, 23, 25, 29, 31, 53, 57, 63, 357, 675
ácido nucleico: 23, 220
ácido ribonucleico (RNA): 23, 30, 85, 357
ácidos grasos: 459
ácidos ribonucleicos de transferencia (RNAt): 38
ácido ribonucleico integrante de ribosoma: 37
activador de plasminógeno celular: 121
activador de plasminogéno de la sangre (tPA): 126
actividad catalítica de las enzimas: 214
actividad ganadera: 333
acuacultura: 659
adaptabilidad evolutiva del organismo: 103
adenina: 26
agarosa: 69
agotamiento de las fuentes de energía: 677
AgrEvo: 685
agricultura: 16, 190, 550, 681, 687, 689
agricultura convencional: 339
agricultura sustentable: 317, 341, 348
Agrobacterium rhizogenes: 170
Agrobacterium tumefaciens: 169, 170, 679
Agrobiológicos del Noroeste, S. A. de C. V.: 519
agroecología: 318
agroecosistema: 317, 318, 323, 325
agroquímicos: 505
aire contaminado: 634
aislamiento de genes humanos: 105
alergenicidad en cultivos modificados genéticamente: 492
alfabeto genético: 26, 27
alimentación global: 186
alimentación humana: 250
alimento transgénico: 191
alimentos balanceados: 591
alimentos GM: 685
alteración de la vida de anaquel de frutos: 177
amaranto: 458
ámbito biogeográfico: 342
Amgen: 373, 404, 405
amilasas: 121, 429, 676
aminoácidos: 32, 228
anabolismo: 225
análisis de control metabólico: 237, 240
análisis de flujos metabólicos: 235
análisis de régimen: 286
Andersson, S.: 678, 679

"ANDi": 157
anemia falciforme: 106, 121
animales acuáticos transgénicos: 662
animales "humanizados": 158
animales ponzoñosos: 446
animales transgénicos: 128, 131
animales transgénicos clonados: 158
antibióticos: 254, 355, 391
anticongelantes de la sangre: 676
anticuerpos alegerno-específicos: 455
anticuerpos de amplio espectro para diagnóstico: 121
anticuerpos "humanizados": 127 676
anticuerpos monoclonales: 392
anticuerpos recombinantes: 126
aparato de Golgi: 21, 22
aplicación de procesos biológicos en el tratamiento de aguas: 601
aplicaciones de la clonación: 157
aplicaciones de la ingeniería genética de plantas: 174
aplicaciones para los procesos biológicos: 215
aplicaciones típicas de la biofiltración: 643
aporrepresor: 47
Arabidopsis thaliana: 7, 12, 92, 93, 192, 679, 680
Arber: 53, 59
árboles filogenéticos: 93
área forestal y boscosa: 328
Arnold F.: 211
aroma: 491
arroz: 336, 679, 682
aspectos biológicos de la biofiltración: 638
aspectos físicos de la biofiltración: 637
atenuación de patógenos por métodos de DNA recombinante: 357
átomos de carbono: 242
autorización de la obtención y uso de la información genética: 108
autosuficiencia alimentaria: 333
Aventis: 685
Avery O.: 5, 11, 27
aves transgénicas: 148
azúcares: 228
azúcares fermentables: 580

β-caroteno: 176, 484
β-globina: 86, 87
β-lactoglobulina: 145
β-talasemias: 106
Bacillus thuringiensis: 179, 496, 507, 508, 516
bacterias fitopatógenas: 531
bacterias fotosintéticas: 679
bacteriófagos: 77
balance de biomasa: 280
balance de oxígeno: 276
bambú: 576
bancos de información en el Internet: 92
bancos de semillas: 307
barrenador europeo: 180
Bainbridge, J.: 686
Bayer: 431, 685
bebidas alcohólicas: 219
Berg D.: 53, 64, 680
Bertoni, G.: 686
bioconversión de los azúcares: 592
biobalística: 173, 174
biocatálisis: 198, 216, 429, 432
Bioclon, S. A. de C. V.: 447
biocontrol: 506
biocontrol de plagas agrícolas: 505
biocontrol en México: 515
biodisponibilidad: 451
biodiversidad: 10, 12, 15, 113, 190, 299, 302 675, 676, 677, 683, 685, 587, 689

biodiversidad como riqueza natural estratégica de México: 299
"biofermel": 16
biofertilizantes: 347
biofiltración: 633, 634
biofiltro: 632, 639
Biogen: 373, 404, 405
bioherbicidas: 515
bioinformática: 85, 92, 234, 686
bioingeniería de procesos: 238
bioinsecticidas: 16
biomacromoléculas de interés alimentario: 452
biomasa: 260, 261, 606, 638
biomasa activa: 638
biopelículas: 639
bioprocesos: 201, 250, 259, 415
biorreactores: 216, 263, 270
biorreactores agitados mecánicamente: 271
biorremediación: 182
bioseguridad: 186, 308, 344
biosíntesis de carotenoides: 485
biosíntesis de lípidos: 463
biotecnología: 9, 10, 14, 15, 117, 120, 198, 292, 302, 675, 677, 684, 685, 686, 689
biotecnología agroecológica: 15, 317, 322, 341
biotecnología ambiental: 599
biotecnología ambiental aplicada al tratamiento de aguas: 601
biotecnología farmacéutica: 391
biotecnología molecular: 451
biotecnología para el desarrollo de la acuacultura: 660
bloques de secuencias repetidas en tandem: 101
bombardeo con micropartículas recubiertas de DNA: 169
bosques: 299
botulismo: 689
bovinos: 147
Boyer H.: 6, 53, 80
Bradford, K. J.: 686
Brenner S.: 6, 30

cadena polipeptídica: 86
cadenas A y B de la insulina humana: 124
Caenorhabditis elegans: 7, 12, 91, 93
Calentamiento global: 677
Calgene: 184, 460, 685
calidad alimentaria y nutracéutica de diferentes cultivares: 16, 451
calidad proteínica de los cereales: 454
cambios en el uso del suelo: 330, 343
cambios en los factores del medio ambiente: 103
cáncer: 121
Capp, E. J.: 677
caprinos: 147
características nutracéuticas del cempasúchil: 485
caracterización de DNAs: 80
caracterización de los bancos de germoplasma: 344
carbohidratos: 464
carotenoides: 483
caseína: 141
catabolismo: 225
catalasas: 676
catalizadores biológicos: 204
cebada: 336, 454
célula bacteriana: 237
célula eucarionte: 20, 21
célula procarionte: 20
célula viva: 19
células animales: 411
células estaminales: 140

cempasúchil: 446, 484
centrómeros: 101
cerdos transgénicos: 144, 145
cereal "StarLink": 496
Cetus: 373
Chargaff E.: 27
chimpancé: 92
Chiron: 404, 405
Chrysoperla sp: 520
cicatrización: 380
ciclo de los ácidos tricarboxílicos: 229
ciclos biogeoquímicos: 323
ciencia genómica: 12, 85, 234
ciencia proteómica: 12, 85
cinasas: 63
cinética del crecimiento celular: 264
cinta genética: 25
citoesqueleto celular: 22
citoplasma: 19, 21
citosina: 26
clonación: 131
clonación animal: 152
clonación de animales superiores: 391
clonación molecular del DNA: 13, 81
clonación molecular y expresión del DNA: 74
cloroplasto: 679, 680
Codex Alimentarius: 685
Clostridium acetobutylicum: 252
código genético: 6, 35
codón: 35, 38
Cohen S.: 6, 53, 80
"cola de poli A": 86
coleópteros: 179, 510
cólera: 689
colinearidad: 41
Comité de Biotecnología de la Academia Mexicana de Ciencias: 675, 685, 690
comparación de genes: 94
comparación de los genomas entre diferentes organismos: 93
complementación ecológica: 593
comportamiento cinético: 266
composición química de *Escherichia coli:* 224
compuestos aromáticos: 240
compuestos volátiles tratados por procesos biológicos: 631
concentraciones tóxicas de alumnio: 182
Conferencia de Edimburgo: 684
Conferencia General de la UNESCO en 1997 sobre el Genoma Humano: 113
configuración estándar de un biorreactor agitado: 274
conservación y manejo de especies: 305
construcción del "super salmón" transgénico: 667
consumo de genes dañinos a la salud: 187
consumo de oxígeno: 277
contaminación: 677, 689
contaminación ambiental: 599
contaminación antropogénica: 625
contaminantes inorgánicos: 600
control de la contaminación ambiental: 599
control de la contaminación del agua: 619
control eficaz de los bioprocesos: 294
control transcripcional: 46
controles de ciclo cerrado: 294
Convenio sobre la Diversidad Biológica: 684
corea de Huntington: 106
correpresor: 47
Coulson F.: 73

crecimiento: 285
crecimiento exponencial: 264
Crick F.: 5, 11, 28, 30, 53
cristalografía: 206
cromosomas: 20, 23, 24, 87, 89, 96, 102, 680, 681
cromosomas humanos: 21, 24, 90
cromosomas vegetales: 679
cultivo: 266
cultivo alimentado: 279
cultivo continuo o quimiostato: 279
cultivo de células de eucarionte: 259
cultivo de microorganismos: 256
cultivo por perfusión: 279
cultivos de interés agroalimentario: 452
cultivos hortícolas: 337
cultivos transgénicos: 185, 186, 187

Daar, A.: 676
Dale, P. J.: 688
d-endotoxinas: 179
deficiencia en vitamina A: 175
degradación de los contaminantes por los microorganismos: 636
deleción: 40
demanda de semilla: 571
denitrificación: 634
desarrollo de bioprocesos para el tratamiento de aire contaminado: 625
desarrollo de las vacunas: 391
desarrollo de un proceso de purificación biológica: 645
Desarrollo Industrial y Tecnológico, S. A. de C. V: 442
deshidratación de huevo: 676
deshidrogenasa: 228
desórdenes inmunológicos: 106
destrucción del hábitat en bosques: 325
desventajas de los procesos anaerobios: 603
detección de secuencias repetidas o análisis de microsatélites: 549
detergentes: 121, 208
detergentes biodegradables: 677
deterioro de los suelos: 677
diabetes: 106, 121
diagnóstico de enfermedades de las plantas: 529
diagnóstico genético: 105, 107, 530, 538, 543
diagnóstico *in vitro*: 392
diagnóstico *in vivo*: 392
diagnósticos veterinarios y forenses: 307
dietas vegetales: 451
difusión facilitada: 222
digestión anaerobia: 605
digestor anaerobio: 608
digestores de lodos: 609
diseño de drogas específicas (farmacogenómica): 99, 109
diseño de reactores: 251
diseño racional de proteínas: 197
diseño y operación de equipos biológicos de tratamiento: 654
disgregación celular: 153
disponibilidad de enzimas: 204
distrofia de Duchenne: 106, 143
diversidad biológica: 348
DNA: 5, 11, 23, 25, 29, 31, 53, 57, 63, 357
DNA complementario (DNAc): 67, 85, 86
DNA polimerasa: 66
DNA polimórfico amplificado al azar: 549
DNA recombinante: 54, 117, 200, 676
“DNA shuffling”: 211, 213

DNA sintético: 71, 117
doblamientos: 42
dogma central: 31
Dolly: 154, 159
Dow Agro Sciences: 685
Drosophila melanogaster: 11,91, 93
duplicaciones de regiones del genoma: 101

Ecogen: 510
ecología microbiana: 593
economía mundial: 321
ecosistemas: 318, 322, 323
ecosistemas costeros: 323
ecosistemas de agua dulce: 323
ecosistemas de pastizal: 323
ecosistemas en México: 327
ecosistemas forestales: 323
ecosistemas lacustres: 326
ecosistemas y agroecosistemas: 321
"edición a nivel molecular": 29
efecto de atenuación: 51
efecto de la escala de fermentación: 289
Elder J.: 253
electroforesis: 7, 69
electroporación: 137, 138, 169
elongación: 37
El-Sayed, N. M.: 680
empaquetamiento de los residuos internos: 208
enanismo: 121, 374
endonucleasa EcoRI: 62
endonucleasas de restricción: 59, 62
endospermo de arroz: 485
endulzante natural: 437
endurecimiento de la tortilla de maíz: 440
energía: 232
enfermedad bovina de la boca: 121
enfermedad de Halzheimer: 106
enfermedad de Huntington: 107, 108
enfermedades de las plantas: 505
enfermedades en el ser humano: 95
enfermedades genéticas: 95, 106
enfermedades virales: 177
enfoque de bioprocesos: 207
engorda de bovinos: 592
Enmex, S. A. de C. V.: 431
Enzymologa, S. A. de C. V.: 444
entidades extracromosomales: 76
entremezclado de genes: 211, 213
enzima a-1-antitripsina: 145
enzima cinasa de DNA: 64
enzima DNA polimerasa: 5, 66
enzima ligasa del DNA: 6, 65
enzimas de alta eficiencia: 205
enzimas de restricción: 61
enzimas de uso industrial: 202
enzimas microbianas: 430
enzimología de ácidos nucleicos: 58
enzimología industrial: 429
epidemiología e importancia médica de la hepatitis B: 358
eritropoyetina: 411
errores cometidos al replicar el DNA: 39
escala de producción: 286
escala experimental: 286
escalamiento ascendente: 281
escalamiento descendente: 285, 286
escasez de agua: 677
Escherichia coli: 93, 97, 122, 124, 223, 236, 240
especies amenazadas de sobreexplotación: 306
especies de México como fuentes de materia prima: 311
especies descritas en el mundo y en México: 301

espermatozoide: 24
esqueletos de carbono: 239, 243
esquematización de un biolavador: 635
estequiometría del crecimiento celular y producción de metabolitos: 260
estrategia de innovación: 594
estrategia de negocios: 566
estrategias de operación: 251
estrés abiótico: 181
estructura a hélice: 42, 43
estructura b plegada: 42, 43
estructura conformacional de la doble hélice del DNA: 5, 11, 28
estructura cuaternaria: 42, 43
estructura primaria: 42
estructura secundaria: 42, 43
estructura terciaria: 42, 43, 196
estructura y función biológica de las proteínas: 39, 42, 195
eucalipto: 576
eucromatina: 21
evaluación de los ecosistemas: 324
evolución dirigida: 195, 197, 210
evolución dirigida de proteínas: 15
exones: 6, 32, 85, 86
expansión de suelo arable: 325
expresión del DNA: 80
expresión genética: 6, 12, 43, 82, 96, 239
expresión global: 96

factor de necrosis tumoral: 121
factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos: 121, 411
factor VIII-C: 121
factores económicos: 322
falla renal crónica: 121
familia de la hormona del crecimiento: 374
farmacogenómica: 109, 110
Federoff, N.V.: 680
fenilalanina: 245, 246, 247
fenilcetonuria: 106
fenómeno de transformación: 678
fenómenos de erosión: 529
fenómenos de transporte: 273
fermentación: 16, 82, 219, 581
fermentación industrial: 219
fermentación ruminal: 582
fermentaciones ganaderas: 593
fermentador: 280, 285
fibras: 139
fibrosis quística: 106
fijación biológica del nitrógeno: 77
filogenia molecular: 93
filtro anaerobio de flujo descendente: 608, 610
filtros de escurrimiento (BLE): 631
fisiología: 234
fisiología celular microbiana: 221
fitomejoramiento: 168
fitomejoramiento mediante ingeniería genética: 172
fitorremediación de suelos contaminados: 182
Flemming A.: 5, 253
flóculos: 610
fluido newtoniano: 289
flujo de carbono: 237, 239, 242, 243
flujo volumétrico: 280
flujos metabólicos: 236
flujos molares: 261
fosa séptica y tanque Imhoff: 606
fosfatasas: 63
fosforilación oxidativa: 229, 230
fósforo: 477
fragmentos de DNA: 70

Franklin R.: 11, 28
Fuchs, R. L.: 683, 686, 687, 688
fundamentos de los procesos de tratamiento de aire: 635

gallinas transgénicas: 148
gametos: 24
Ganadería Pastejé, S. de R. L.: 587, 590
gases de invernadero: 625
geles de poliacrilamida: 69
gen estructural: 48
Genbank: 92
gene: 5, 24, 25, 85, 87, 92, 99, 190, 239
gene "anticongelante": 668
Genencor: 431
Genentech: 6, 122, 373, 404, 405
generación de variabilidad: 213
generación y separación de fragmentos de DNA: 67
genes clonados: 211
genes homólogos: 93
genes bacterianos: 678
genes interrumpidos: 85
genes sintéticos: 118
genes terminadores: 689
genética: 11
Genin, S. A. de C. V.: 438
genoma: 15, 85, 87, 89, 91, 93, 96, 100, 190, 234, 679, 680, 681, 686
genoma de la bacteria *Escherichia coli:* 88
genoma del arroz: 7, 12
genoma del ratón: 7, 12
genoma del virus de la hepatitis B: 361
genoma humano: 12, 15, 104, 109, 373, 391, 678, 679
genómica: 550, 686
Genzyme: 404, 405
germoplasma: 319
Gilbert W.: 6, 45, 73
glándula pituitaria: 668
glucanasas: 676
glicólisis: 226, 227
glucoamilasa: 209
glucocinasa: 226
glucosa: 23, 226, 237, 244, 246, 464
glucosa isomerasa: 209, 676
glucosa oxidasas: 676
gluten: 458
Goeddel D.: 122, 676
"Golden Rice": 486
González de León T.: 326
gráfica tipo Lineweaver-Burk: 268
Green, J. A.: 677, 683
Griffith A.: 26, 680
grupo fosfato: 63
Grupo Savia: 562
grupos taxonómicos: 300
guanina: 26

Hails, R.: 687
H. *influenzae*: 7
Hamilton J.: 53, 59
Hammond, J.: 683
harinas de trigo: 459
Heatley R.: 253
Heineman, J.: 687
Helicobacter pylori: 369
hemofilia: 106, 121
hemoglobina: 39
hepatitis B: 127
herramientas celulares: 53, 58
herramientas de la ingeniería celular: 234
herramientas moleculares: 57, 195
Herrera Estrella, L.: 677, 679, 683
hidrólisis de ATP: 223
hierro: 475
hipoparatiroidismo: 106
histonas: 24

Historia natural: 159
hombre: 92
hongos entomopatógenos: 510
hongos fitopatógenos: 531
Hopking, M.: 687
hormona de crecimiento: 126, 373, 676
hormona de crecimiento bovina: 121, 375
hormona de crecimiento del salmón: 668
hormona de crecimiento humano: 121, 374, 381
hormona del crecimiento canino: 381
hormona del crecimiento caprino: 379
hormona del crecimiento equino: 380
hormona del crecimiento felino: 381
hormonas del crecimiento de origen animal: 378,
hormonas proteicas: 689
Howe, M.: 680
Hozim, A.: 680
human endogenous retrovirus (Hervs): 102
humidificador: 634
huntingtina: 107
Hutchinson: 206

identidad genética individual: 99
implementación: 286
incremento de especies invasoras: 325
incremento en la superficie agrícola: 331
individualidad genética: 105
industria alimentaria: 198, 464
industria azucarera: 592
industria bioquímica: 199
industria biotecnológica de animales transgénicos: 151
industria biotecnológica nacional: 320
industria farmacéutica: 198, 392, 405
industria química: 198
industria tequilera: 573
Industrializadora Integral de Agave, S. A. de C. V: 436
inestabilidad genética de cepas: 220
infarto agudo del miocardio: 121
infección por virus de la hepatitis: 121
infección por virus de la polio: 121
infecciones bacterianas: 121
infecciones virales: 679
información genética: 5, 14
información genómica: 92
ingeniería bioquímica: 15, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 259
ingeniería celular: 15, 219, 238, 239
ingeniería de las moléculas biológicas informacionales: 220
ingeniería de proteínas: 195, 196, 198, 200, 206, 234
ingeniería de vías metabólicas: 221
ingeniería genética: 11, 14, 15, 54, 57, 168, 177, 195, 196, 220, 234, 661, 681
ingeniería y evolución dirigida de proteínas: 221
inhibición alostérica: 242
inmunidad protectora: 356
inmunofluorescencia: 533
inmunoglobulina E (IgE): 493
inmunoterapia contra el cáncer: 121
insecticidas químicos tradicionales: 525
insectos parasitoides: 516
Instituto de Biotecología de la UNAM: 125
Instituto de Ingeniería de la UNAM: 618
Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM: 586

instrumentación, control y optimización de bioprocesos: 288
insulina: 11, 122, 374, 676
insulina humana: 120, 121, 123, 124, 125
interferón: 11, 121, 411, 676
interleucina-2: 121
internalización: 222
intrones: 6, 32, 85, 86
investigación en biofiltración: 653
investigación post-genómica: 94
investigación y desarrollo de biofarmacéuticos: 405
isoesquizómeros: 62
isótopos: 236
Itakura K.: 6, 122
Ivens, K.: 680

Jackson: 53, 64
Jacob F.: 6, 45
Jaffe, J.: 688
Jenner E.: 355
Jensen E.: 5

Kellis, H.: 680
Kapuscinski, A. R.: 688
Kornberg A.: 5
Kunkel T.: 206

lactoalbúmina: 141
lactógeno placentario humano (HPL): 377
lagunas anaerobias: 608
lectura del mensajero: 37
leches deslactosadas: 433
Lee, C.: 680
Leewenhoek A.: 219
leguminosas: 336
Lengler, J.: 679
lepidópteros: 179, 510
leucemia: 121
levaduras metilotróficas: 251
levaduras transgénicas: 128
Lewin, B.: 680
Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM): 675, 685, 688
liberación de los productos agrícolas: 498
librerías de proteínas: 197
licencias de productos biotecnológicos de la FDA: 394
ligasa de DNA: 64, 65, 80
lipasa: 121, 676
lípidos: 228, 459
liposomas: 139
lisosoma: 21
lodos granulares: 611
López-Munguía Canales, A.: 677
lote alimentado: 279

macromolécula informacional: 23
macromoléculas: 232
macromoléculas biológicas: 23
Madigan, M.: 678
maíz: 333, 454, 677, 679, 682, 687, 689
manejo integrado de plagas: 519
manglares: 299
manipulación del material genético: 220
manipulación genética de animales: 15, 131
manipulación genética de embriones: 132
manipulación *in vitro* del material genético: 57
manufactura de pan: 459
mapa genético del plásmido pBR322: 79
mapas genéticos: 89

Margulis, L.: 678, 679
Marsan, P. A.: 686
Martínez, M.: 677, 679, 683
Maseca: 442
materia orgánica no biodegradable: 600
material genético: 23, 211, 678, 679, 680, 681, 686
material genético repetido: 101
material repetido derivado de transposones: 101
Maxam R.: 6, 73
McCarthy M.: 5, 11, 27
McClintock, B.: 680
McDonald, J.: 680
McLeod C.: 5, 11, 27
mecanismos de regulación genética: 48
medicina molecular: 105
medicina tradicional: 309
medición y control de variables: 290, 293
medio ambiente: 189, 674, 677, 683, 685, 689
megabiodiversidad: 317
mejoramiento de la calidad nutricional: 175
mejoramiento de la composición y cualidades de semillas y frutos: 175
mejoramiento de respuesta inmunitaria: 142
mejoramiento del sabor: 491
melaza: 579
membrana celular: 20, 21, 221, 223
Mendel G.: 5, 11, 24, 167
mercado de la melaza: 591
Messelson M.: 5, 30
metabolismo celular: 23, 220, 224, 225, 234, 243
metabolismo de la glucosa: 226
metabolito: 237, 238
metabolitos novedosos: 221
metabolitos precursores: 231, 239
metaboloma: 234, 235
Metcalfe, D.: 683
Methylophilus methylotropus: 251
método "PCR": 75
metodología del DNA recombinante: 57
metodología para la construcción de animales transgénicos: 135
métodos de clonación: 152
métodos de la biología molecular aplicados a la conservación y manejo de la biodiversidad: 303
métodos de transferencia génica para la producción de peces transgénicos: 664
métodos de transformación genética de plantas: 169
métodos para determinar la secuencia de nucelótidos del DNA: 71, 72
microarreglos: 95, 97
microinyección: 136
micronutrientes: 451, 471
microorganismos ruminales: 593
microorganismos termofílicos: 433
microorganismos transgénicos: 117
micropropagación de agave: 573, 575
Milstein, C.: 676
minerales: 473
mineralización de los contaminantes: 635
mitocondria: 21, 679
modelamiento: 286
modelo de Contois: 269
modelo de Moser: 269
modelo de Ottengraf y van Den Oever: 639
modelo de Powell: 269

modelo de Tessier: 269
modelo de Monod: 268
modificación química: 206
modos de operación: 277
moléculas biológicas informacionales: 38
moléculas de ATP: 230
Monod J.: 45, 267
monómeros: 232
Monsanto: 685
Montagu M.: 7
Morgan T.: 5, 11, 24
mosca: 92
mosca de la fruta *(Drosophila melanogaster)*: 5, 11
mosca pinta: 515
Mullis K.: 7, 74
mutación: 39, 40, 214, 220
mutagénesis: 682
mutagénesis dirigida: 212

nemátodos entomopatógenos: 507, 514
neoplasia endócrina: 106
neurofibromatosis de von Recklinghausen: 106
Nicklen S.: 73
Niremberg M.: 6, 30
nitrificación: 634
nopales transgénicos: 486
Novozymes: 431
nucleasa de restricción: 6, 58, 59, 60, 64
núcleo: 21
nucleolo: 21
nutracéuticos: 451
nutrición adecuada: 472
nutrientes: 225

Ochoa S.: 30
oligonucleótidos sintéticos: 75
operador: 47, 48, 233
operón: 45
optimización: 286
organismo transgénico: 6, 117, 374
organismos antagonistas: 506
organismos eucariontes: 20
organismos modificados genéticamente: 14, 675, 676, 677, 683, 684, 685, 687, 688, 689
organismos sacarolíticos: 593
organización del gene de la proteína b-globina: 87
Organización Mundial de la Salud (OMS): 685
Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE): 684
Oryza longistaminata: 178
Osusky, M.: 679
ovejas transgénicas: 145, 147
óvulo: 24
oxígeno disuelto: 292

países megadiversos afines: 313
papas transgénicas: 464
paradigma de los pesticidas: 339
pared celular: 20
Pasteur L.: 5, 219, 355
pastizales: 325
PCR: 7, 73, 127, 211, 531
peces transgénicos: 149, 151, 659, 661
pectinasas: 676
penicilina: 5, 253
penicilinas semisintéticas: 438
penicilino acilasa: 441
Penicillium chrysogenum: 254
Pennica, D.: 676
pérdida de la productividad agrícola: 677

pesticidas: 452, 529, 542, 682
Pfizer: 431
Phytophtora palmivora: 515
piensos concentrados: 592
pigmentos: 483
piruvato: 226, 228
plaguicidas químicos: 346
Plant Genetic Systems: 685
planta de tratamiento de efluentes en una industria: 620
plantas cinegéticas: 302
plantas como biorreactores: 182
plantas de tratamiento representativas instaladas: 617
plantas medicinales: 302
plantas ornamentales: 302
plantas pesqueras: 302
plantas resistentes: 177
plantas transgénicas: 7, 15, 128, 167, 179, 180, 185, 187, 189, 191, 677, 687
plásmido pBR322: 78, 80, 81, 82, 117, 119
plásmido pSC101: 81
plásmido Ti de *Agrobacterium:* 173
plásmidos: 20, 78, 80, 117, 119
plásticos: 689
plataformas tecnológicas: 411, 418
plegamiento: 196
poliacrilamida: 69
polimerasas del DNA: 65
polimerización: 232
polimerización de aminoácidos: 38
polímeros: 29
polímeros biológicos: 38
polimofismo genético: 39, 98, 105, 108
polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados: 547
polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción: 546
Polly: 154
Ponti, L.: 688
posibles riesgos: 308
posibles riesgos en la biodiversidad: 308, 344
potencial alergénico: 495
potencial biotecnológico de las GHs: 381
Potricus, I.: 677
práctica médica: 106
predicción: 206
predisposición genética: 106
primeras vacunas: 9
prímero: 74
primeros ejemplos de clonación de animales: 153
principales diseños de biorreactores: 272
privacidad genética y biológica: 108
Probiomed, S. A. de C. V.: 391, 406, 412
problemas de crecimiento: 374
procariontes: 19
proceso anaerobio para el tratamiento de aguas residuales: 603, 604
proceso Biofermel: 579, 589, 590
proceso natural de evolución: 211
procesos anabólicos: 235
procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales: 604, procesos catabólicos: 235
procesos ecológicos: 299
procesos evolutivos: 299
procesos morfogenéticos: 299
producción agrícola: 167
producción animal: 141
producción de alimentos: 659
producción de b-caroteno en arroz transgénico: 176
producción de cerveza: 676

producción de fructosa a partir del agave: 436
producción de leche y carne en ganado: 121
producción de metabolitos: 264
producción de metano: 583
producción de plásticos biodegradables y nuevas fibras: 184
producción de proteínas: 80
producción de quesos: 121
producción de somatostatina humana en bacterias: 119
producción de vacunas orales en plantas transgénicas: 183
producción industrial de macromoléculas: 13
producción primaria: 333
productividad de largo plazo: 343
producto proteico: 41
productos biofarmacéuticos: 183
productos comerciales de *Bacillus thuringiensis:* 508
productos de Agrobionsa: 524
productos farmacéuticos: 404
productos naturales: 217
productos terapéuticos y profilácticos recombinantes: 412
programa de mejoramiento vegetal: 564
programas de divulgación: 108
promotor: 46, 47, 48, 233
propiedades físicas del DNA: 28
proteasas recombinantes: 677
proteasas vegetales: 429
proteína: 23, 29, 39, 91, 141, 195, 206, 223, 234
proteína "B_t": 681
proteína S del virus de la hepatitis B: 365
proteínas alimentarias: 452
proteínas Cry: 510
proteínas de reserva: 453, 458
proteínas heterólogas: 117, 141, 195
proteínas importadoras: 222
proteínas recombinantes: 82, 121, 122, 125, 141, 258, 391, 676
proteínas terapéuticas: 406
proteínas transportadoras: 222, 223
proteinasa: 209
proteoma: 12, 15, 89, 91, 94, 234
proteoma humano: 85, 96, 100
proteómica: 686
Protocolo de Cartagena: 675, 684
Proveedor Internacional de Químicos, S. A. de C. V.: 442
pruebas de diagnóstico: 108
pseudogenes: 99, 101
Pseudomonas aeruginosa: 208
Ptashne M.: 45
Purohit, S.: 677
Purugganhanaud, M.: 680

química fina: 216
quimiosina recombinante: 676
quimiostato: 280
Quintero R.: 438

rabia: 5, 9
radiación solar: 39
Ramírez, O.T.: 676
rango de aplicación para tratamiento de gases: 630
ratón: 92, 127
ratones transgénicos: 134, 143
reacción alergénica: 455
reacción en cadena de la polimerasa (PCR): 12, 57, 73, 74, 76
reacción enzimática: 242
reactor agitado: 289
reactor anaerobio de lecho de lodos: 607, 610, 611, 618

reactor de contacto anaerobio: 608
reactor de lecho granular expandido: 611
reactores de alta tasa: 605
reactores de baja tasa: 605
reactores de lecho expandido o fluidificado: 612
reciclaje: 343
recombinación de secuencias de genes: 213
recursos económicos: 659
red glicolítica Embden-Meyerhoff: 227
red metabólica celular: 12, 225, 231, 233
redes o vías catabólicas: 226
regulación: 43
regulación autógena: 50
regulación de los ecosistemas: 337
regulación genética: 43, 233
regulador: 48
regulón: 46
relaciones filogenéticas: 93
reninas: 121
renitis pigmentosa: 106
reorganización del genoma: 681
replicación del DNA: 5, 29, 30, 58, 66, 76
replicones: 76
represión multivalente: 50
represor: 45, 47
reproducción de los agroecosistemas: 346
requerimientos de la célula para producir metabolitos: 259
resistencia a virus, bacterias y hongos fitopatógenos: 177
resonancia magnética: 206
respiración celular: 230
respiración endógena: 638
retículo endoplásmico: 21, 22
retinoblastoma: 106
retrovirus: 102, 680
retrovirus endógenos de humanos (Hervs): 102
revolución verde: 529
ribosoma: 20, 32, 35, 37, 87, 679
riesgos ecológicos: 187
rizado amarillo del chile: 543
RNA mensajero (RNAm): 6, 37, 38, 41, 86, 87
RNA polimerasa: 46, 47, 51
RNA precursor: 87
RNA premensajero: 86, 100
RNAms policistrónicos: 45
RNA ribosomal: 37
RNA de transferencia: 37
Rohm O.: 429
Royal Society: 688
rumen de los animales: 588
ruptura mecánica: 67

sabor: 491
sacarosa: 470
Saccharomyces cereviciae: 7, 12, 93
Sagan, D.: 678, 679
salmón transgénico: 16
salud: 11
Schiemann, J.: 688
Sanger F.: 6, 73
sector agropecuario: 11, 333
secuencia consenso: 46
secuencia de aminoácidos: 196, 206
secuencia de los nucleótidos del DNA: 6, 57, 71, 73, 101
secuencia del genoma humano: 103
secuencia específica de aminoácidos: 42
secuenciación del DNA: 12, 71, 85, 679
secuencias de los nucleótidos de los genomas: 94

secuencias LINE: 102
secuencias SINE: 102
secuencias publicadas en los últimos veinte años en el Genbank: 302
sedimentación y flotación: 600
selección de tecnología adecuada: 570
selvas: 299, 300
semillas genéticamente mejoradas: 571
semillas oleaginosas: 459
Seminis: 563
sensores: 290, 292
señales de terminación: 38
separación de fragmentos de DNA por electroforesis: 70
Shields, D.: 680
sida: 121, 680
siembra y consumo de productos transgénicos: 186
simulación: 286
síndrome de Down: 90
síndrome de Lesch-Nyhan: 106
síntesis de la vitamina E: 482
síntesis de los RNAm: 95
síntesis de macromoléculas: 232
síntesis del almidón en plantas: 470
síntesis del RNA: 29, 30
síntesis enzimática del DNA: 68, 75
síntesis proteica: 38
síntesis química de oligonucleótidos: 57, 71
síntesis y procesamiento del RNA: 85
sistema de PCR: 7
sistemas agroecológicos: 319
sistemas anaerobios: 606
sistemas de diagnóstico: 54, 73, 127
sistemas de expresión: 80, 82
sistemas inducibles: 50
sistemática: 304
sistematización de la información agroecológica: 319
sitio de unión ribosomal: 51
Smith H.: 6, 53, 59
somatostatina humana: 118, 122
sonicación: 137
sorgo: 336, 454, 682
soya: 336, 677, 682
Spiegelman S.: 210
S. Pneumoniae: 678
Stahl F.: 5, 30
Streptomyces aureus: 253
Streptomyces pyrogenes: 253
subprocesos: 285
"subsidio ecológico": 599
subtilisina: 121
suelos ácidos: 181
super salmón: 659
superficie cultivable: 529
superficies cultivables de plantas transgénicas: 185
superóxido dismutasa: 121
sustitución: 40
sustratos: 279

tabaco: 679, 689
Takamine J.: 429
tamizado de alta productividad: 215
tanque de fermentación: 279
tasa de mutación: 211
taxonomía: 303
técnica de PCR: 73, 211
técnicas de detección: 531
técnicas de DNA recombinante: 117, 199
técnicas de fitomejoramiento: 167
técnicas de tratamiento de aire contaminado emitido por fuentes fijas: 627
tecnología del DNA recombinante: 362

tecnología enzimática: 16, 429, 432
tecnología moderna de producción agrícola: 569
técnologías biológicas: 200
telómeros: 101
teoría de la evolución: 96, 678
terapia génica: 111, 112, 129
Thermos aquaticus: 74
Thomas, J. A.: 683, 686, 687, 688
tijeras moleculares: 58
timina: 26
tolerancia al estrés abiótico: 181
tomate: 491
Tonewaga, T.: 680
Traavik, T.: 687
traducción del RNA mensajero: 37, 38, 51
transciptoma: 87
transcripción: 30, 33, 58, 85
transcripción y elementos de control genético: 44
transcriptasa reversa: 361
transcriptoma: 15, 91, 94, 97, 234
transcriptomas de la bacteria *E. coli*: 96
transcritos de RNA premensajeros: 89
transferencia de calor: 285
transferencia de genes ajenos entre un OGM: 308
transferencia de masa: 275, 285
transferencia de momentum: 275
transferencia de tecnología: 591, 594, 614
transferencia del aminoácido: 37
transferencia horizontal: 101, 678, 679, 680, 681, 686
transferencia nuclear: 153
transformación por ADN: 678
transformaciones químicas: 199
transgénesis: 131, 132, 171, 189
transgénesis experimental: 134
transgénesis murina: 144
transplante de riñón: 121
transporte: 221, 222
transporte del azúcar: 222
transposones: 101, 102, 103, 679, 680, 681
traslado del laboratorio a la industria: 281
tratamiento de aguas residuales: 16, 250, 599, 602, 609
tratamiento de aguas residuales en México: 612
tratamiento de aire contaminado: 16, 642
tratamiento de textiles: 121
trigo: 336, 459
Trigo, E. J.: 677, 682
tripanosomas: 680
triplete: 35, 38
tripsina: 39, 429

ultrafructosa: 437
Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapala (UAM-I): 614, 645
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM): 615
Uribe, J.: 676
uso comercial de plantas transgénicas: 184
uso de enzimas: 443
usos ilegales: 688
utilización de DNA sintético: 211
utilización de organismos vivos: 199

vacuna: 5, 121, 126, 355, 357, 367, 689
vacuna contra la hepatitis B: 16, 121, 355, 358, 364, 367, 411
vacuna contra polio: 121
vacuna recombinante: 366
vainilla: 576

vacunas de ácidos nucleicos "desnudos": 357
vacunas recombinantes: 364, 368
Valenzuela P.: 7, 127, 364
variables comúnmente medidas en fermentadores: 291
variación genética: 299, 300
vector de clonación: 74, 77, 78
vector de expresión: 77
vectores espermáticos: 140
vectores retrovirales: 149
vehículo molecular: 74, 76, 82
velocidad de crecimiento: 261
venenos: 447
Venter, J. C.: 678, 679, 680
vía aromática común: 246
vía de las pentosas fosfato: 228
vías anabólicas: 231
vías de síntesis de compuestos aromáticos en *Escherichia coli:* 241
vías del metabolismo central: 244
vías glicolíticas: 225
vías metabólicas: 225
vías o redes anabólicas: 229, 230
viruela: 5, 9, 355
virus: 6, 77, 139, 360, 362, 534, 545, 678, 681
virus o bacterias atenuados como vectores de antígenos de microorganismos patógenos: 357
vitamina A: 176, 479
vitamina B: 479
vitamina C: 479, 481
vitamina D: 479
vitamina E: 479, 480
vitamina K: 479
Voytas, D.: 680

Watson J.: 5, 11, 28, 30, 53, 113, 117, 676, 678, 679, 680
Wesler, S.: 680
Whemer J.: 253
Wilkins M.: 28
Winter, G.: 676
Wolte, K.: 680

Xanthomonas oryzae: 178
xenotransplantes: 158
xilanasa: 209
Xing, Y.: 680

Zelus mubilais: 515
Zeneca: 185 714
Zhang, J.: 687