

Departamento de Química y Toxicología. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.

ORÍGENES, OBTENCIÓN Y APLICACIONES DE LOS ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS.

Lázaro Núñez Cárdenas¹.

RESUMEN

El desarrollo de las técnicas de manipulación genética ha permitido acelerar diferentes procesos naturales que normalmente hubieran necesitado de un largo período de tiempo para llevarse a cabo, o que nunca hubieran ocurrido de manera espontánea. Esto ha sido posible a través de la inserción de ácido desoxirribonucleico foráneo en organismos hospederos, lo que provoca nuevas variaciones en el metabolismo de las especies receptoras. En el presente trabajo (el primero de una trilogía) se muestran algunas de las principales metodologías utilizadas para la obtención de organismos genéticamente modificados en plantas y animales, se comentan sus principales características y se ejemplifican sus usos y aplicaciones.

Descriptor DeCS: Organismos transgénicos / Recombinación genética / Organismos genéticamente modificados / Ácidos nucleicos.

¹ Máster en Ciencias. Jefe del Proyecto “Detección de Organismos Genéticamente Modificados en alimentos” (OGM). Presidente del Comité Técnico Nacional de OGM (CTN-91).

Recibido: 13 de Febrero del 2011. Aceptado: 31 de Julio del 2011.

Lázaro Núñez Cárdenas. Departamento de Química y Toxicología. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Calzada de Infanta # 1158 e/t Clavel y Llinás. La Habana 10300. Cuba.

Correo electrónico: lanuca35@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, con el objetivo de mejorar las producciones agrícolas, el hombre estableció un proceso de selección y entrecruzamiento entre las mejores especies del mundo animal o vegetal. Esto le permitió obtener plantas más resistentes a las sequías y al ataque de plagas, aumentar el rendimiento de las especies animales productoras de carne, huevos, e incluso, aumentar la fuerza de tracción o la velocidad de sus ejemplares domésticos. Todo este proceso de selección, cruzamiento y obtención de una nueva variedad con mejores condiciones genéticas se ha desarrollado a lo largo de miles de años entre especies sexualmente compatibles. Sin embargo, una de las primeras publicaciones científicas relacionadas con este tema se llevó a cabo en 1866 por el monje Gregorio Mendel. Su sistema de experimentación se basó en el cruzamiento entre distintas variedades de guisantes, que solo diferían en una característica externa que, además, era fácilmente detectable, como el color de las flores, el color de las semillas, y el tamaño del tallo, por citar algunas.¹ Mendel intuyó que existía un factor en el organismo que determinaba cada una de estas características, y que debía estar formado por dos elementos hereditarios, aportado por cada uno de sus progenitores. Estos dos elementos consistirían en versiones iguales o diferentes del mismo carácter, lo cual proporcionaría, por ejemplo, un color distinto de la semilla, o una longitud de tallo diferente en la planta. Actualmente a estos factores se les denomina genes, y a cada versión diferente del gen se le denomina alelo. Así el gen que determina el color de la semilla, en la planta del guisante, puede tener dos alelos: uno para las semillas verdes y otro para las semillas amarillas.¹

Con el desarrollo de la biotecnología se ha logrado la manipulación y transferencia

de genes entre organismos diferentes, debido a la unión artificial y deliberada *in vitro* del ácido desoxirribonucleico (ADN). Esto ha permitido variar el metabolismo de las especies animal o vegetal existentes, creándose así nuevas especies genéticamente modificadas.

Métodos de obtención de Organismos Genéticamente Modificados en animales

La Organización Mundial del Comercio (OMC) define como organismo genéticamente modificado o transgénico a: “...todo organismo cuyo material genético fue modificado por medio de la tecnología de genes de una manera que no ocurre naturalmente por multiplicación y/o por recombinación natural”.²

Muchos son los métodos biotecnológicos destinados a la obtención de animales transgénicos, de los cuales se describirán, por su relevancia, la microinyección pronuclear, la clonación somática, la transferencia de genes mediada por espermatozoides, los animales “knock-down”, las células embrionarias totipotentes, y los vectores lentivirales.

La microinyección pronuclear (MIP) de ADN consiste en la microinyección directa de ADN desnudo en el pronúcleo masculino de un embrión fertilizado. Si el material genético se integra en uno de los cromosomas embrionarios, el animal nacerá con esta nueva información en cada célula. El ADN foráneo debe integrarse en el genoma antes de la duplicación del material genético que precede al primer clivaje.³⁻⁴ Los transgenes se integran en zonas de la cromatina transcripcionalmente inactivas o silentes. Los que se integran en las juntas heterocromatina/eucromatina podrían expresarse en algunas células y mantenerse silentes en otras, resultando en un patrón de expresión en mosaico cuando se usan promotores constitutivos. Los que se

integran en secuencias codificantes nativas, podrían conducir a una discapacidad o la muerte del animal transgénico.³⁻⁴

La MIP podría resultar en la integración de múltiples copias. Antes de que ocurra la integración, los casetes de expresión pueden formar concatámeros de forma tal que múltiples copias del transgen se integran en una posición única del genoma. Estos concatámeros inducen silenciamiento mediado por metilación de las citosinas o heterocromatinización. Además, la eficiencia de integración del transgén mediante MIP difiere significativamente entre las especies, a saber: ratón: 5%; conejo: 5%; cerdo: 2%, cabra y oveja: 1%, y vaca: < 1%.³⁻⁴

En la clonación somática se sustituye el genoma de un ovocito por la información genética de una célula somática transfectada con un transgen de interés. Una vez dentro del ovocito anucleado, el material genético de la célula somática se reprograma y comienza el desarrollo embrionario hasta el nacimiento de una progenie clónica y transgénica.³⁻⁴ Éste es un proceso poco eficiente, caracterizado por una alta tasa de mortalidad durante la etapa fetal, hígado agrandado, defectos cardio-pulmonares, edemas de placenta, síndrome del feto grande, alta mortalidad al nacer, envejecimiento precoz y mayor propensión a padecer enfermedades infecciosas y autoinmunes.⁵⁻⁶

Por su parte, la transferencia de genes mediada por espermatozoides se basa en el empleo de espermatozoides como vectores para transferir el ADN foráneo al ovocito durante el proceso de fertilización. El ADN de interés puede ser incorporado al espermatozoide, previo a la fertilización, mediante coinubación, electroporación o lipofección de los espermatozoides.⁷⁻⁸ Los eventos moleculares que median la internalización del ADN en los espermatozoides se desconocen; es necesario evaluar un gran número de

sementales antes de encontrar uno con las características adecuadas para el procedimiento; y este método se caracteriza por su baja reproducibilidad y gran escepticismo.⁷⁻⁸

La obtención de animales “knock-down” se basa en inducir la supresión total o parcial de una proteína determinada, sin alterar la secuencia nucleotídica que codifica para dicha proteína. En principio se puede usar en cualquier especie, pues es un método que puede silenciar múltiples genes homólogos, no requiere gen marcado, y permite tener un criterio preliminar de los niveles de silenciamiento que se obtendrán en el animal resultante. Además, mediante el empleo del ARN de interferencia, se pueden generar animales con diferentes gradaciones en los niveles de expresión del gen que se desea silenciar, y no se requiere homocigosis.⁹⁻¹⁰

Hasta el momento, el método “knock-down” solo es aplicable a ratones presenta efecto transitorio y baja accesibilidad a las células dianas. Además, este método no permite tener un criterio de selección de clones cuando el gen a silenciar no es constitutivo.⁹⁻¹⁰

La obtención de células embrionarias totipotentes (CET) consiste en la integración de un transgen determinado en el genoma de células embrionarias totipotentes, mediante recombinación homóloga. Estas células son microinyectadas en blastocistos, a partir de los cuales se obtienen animales quiméricos. Si las células microinyectadas contribuyen a la formación de la línea germinal, entonces la descendencia de este ratón quimérico será transgénica.¹¹⁻¹² Se han encontrado células similares a las CET en muchas especies animales, incluyendo, ratas, hámster, cerdos, ovejas y monos. Solo las CET de ratón han sido capaces de contribuir a la línea germinal; constituyendo así una ruta para la generación de animales transgénicos.¹¹⁻¹²

Otra técnica utilizada para la obtención de especies transgénicas consiste en la

microinyección de vectores lentivirales en el espacio previtelino de un ovocito (gameto no fertilizado) o un embrión. Los vectores lentivirales penetran en el embrión, se retrotranscriben y se integran en el genoma. Este método presenta una elevada eficiencia de transgénesis, es una metodología poco invasiva, y permite la integración en zonas transcripcionalmente activas. Además, no se integran en forma de tándem, y el número de copias integradas se correlaciona con los niveles de expresión.¹³ Esta técnica tiene la particularidad que la capacidad de clonaje no excede los 8.5 kb, presenta dificultad para la construcción de vectores multigenes y el establecimiento de líneas homocigóticas similares al animal fundador.¹³

Usos de los organismos genéticamente modificados en la agricultura y la industria alimenticia.

Diversos son los usos que en la actualidad presentan los organismos genéticamente modificados. Estos van desde el empleo de bacterias, levaduras o células de mamíferos como sistema de expresión de diversas proteínas recombinantes de interés farmacéutico, tales como las células de ovario de hámster, utilizadas en la producción de anticuerpos monoclonales y/o Eritropoyetina, entre otros. En el caso particular de la agricultura, el uso de los transgénicos está dirigido, fundamentalmente, a lograr el mejoramiento animal. Un ejemplo de ello es la obtención de puercos transgénicos con el gen de la desaturasa modificado, lo que permite obtener animales con una mayor relación de ácidos grasos poli insaturados/saturados.¹⁴

Métodos de obtención de Organismos Genéticamente Modificados en plantas y vegetales

Las plantas transgénicas son aquellas en cuyo genoma (hospedador) se han introducido de forma estable uno o varios genes procedentes de otra especie mediante técnicas de transferencia genética. Estos genes poseen una secuencia nucleotídica específica y se expresan generando una o varias proteínas (nuevas) en el organismo, lo cual le confiere un nuevo genotipo a la planta²⁴⁻²⁶

Los principales logros en el empleo de la transgénesis en plantas se deben a los avances en el cultivo *in vitro* de células, tejidos, y regeneración de plantas completas, a partir de células de un organismo (efecto éste último denominado totipotencia); y el descubrimiento del mecanismo de infección de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.²⁶⁻²⁷

Los métodos más utilizados para la obtención de plantas transgénicas son los siguientes: la infección por *Agrobacterium tumefaciens*, la biolística, la microinyección, y la electroporación de células intactas.

La infección por la *Agrobacterium tumefaciens* se basa en la capacidad de esta bacteria de infectar las células de las plantas con un fragmento de su ADN. Cuando el ADN bacteriano se integra en un cromosoma de la planta, puede secuestrar efectivamente la maquinaria celular de esta y usarla para asegurar la proliferación de la población bacteriana.²⁸⁻²⁹ La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* transfiere el ADN de una región del plásmido Ti hacia el genoma de la célula vegetal de algunas plantas (dicotiledóneas) a través de heridas. Las cepas virulentas de *Agrobacterium* contienen un plásmido denominado Ti (Tumor-inductor) que es capaz de inducir la formación de agallas, o tumores, en diferentes zonas de las plantas. Esta región se denomina T-DNA (Transfer-DNA) y contiene genes que se expresan únicamente al ser integrados al genoma.²⁵⁻³⁰ Por sus características, este método no permite la

inserción de moléculas de gran tamaño y solo es aplicable a plantas dicotiledóneas.

La biolística consiste en la introducción de ADN en células mediante la aceleración (“disparo”) de proyectiles de muy pequeño tamaño. Los microproyectiles son cubiertos de ADN, y posteriormente acelerados mediante pólvora, una descarga eléctrica, o utilizando gases a presión; los genes que recubren la partícula recuperan posteriormente su actividad biológica. De esta manera, se puede introducir ADN en prácticamente cualquier tejido de cualquier especie vegetal.²⁵⁻³⁰ Otra aplicación de esta técnica es producir daños mecánicos, disparando proyectiles sin ADN sobre las células a ser transfectadas, y posteriormente, usar la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como vector de transmisión génica.²⁵⁻³⁰

Una de las principales desventajas de este método es que no es posible controlar el lugar de integración del gen en el genoma de la planta. Puede suceder que el transgen se rompa durante el proceso, y se integren fragmentos de ADN de partida, o que se integren múltiples transgenes, y por lo tanto, la planta reaccione silenciándolos, es decir, impidiendo la expresión del gen. Además, las partículas deben alcanzar células competentes, que por lo general son escasas, con la excepción de los tejidos embrionarios.²⁵⁻³⁰

La microinyección es una de las técnicas más precisas para incorporar ADN en compartimentos celulares, y se realiza mediante dispositivos microcapilares junto con la microscopía, lo que posibilita introducir el ADN sin causar daños. Además, permite un control visual de la célula a transformar, es aplicable a pequeñas estructuras (microsporas y cigotos), y al introducir el gen en el núcleo, éste no se expone a agresiones propias del citoplasma, como la degradación por DNAsas.²⁵⁻³⁰ La microinyección es un proceso lento que requiere aplicar el método célula a célula;

así como precisa una mayor habilidad del analista y el uso de equipamiento científico mucho más complejo.

Otra de las técnicas utilizadas, la electroporación de células intactas, se basa en la aplicación de un elevado voltaje a las células por un período muy corto de tiempo. Durante este proceso las células despolarizan sus membranas y se forman pequeños orificios por donde penetran las moléculas de ARN y ADN que se encuentran alrededor. Pasada la despolarización, muchas células sufren daños irreparables y mueren, en muchos casos, más del 90%; pero las que logran recuperarse incorporan las moléculas deseadas.²⁵⁻³⁰

Usos de las plantas transgénicas en la agricultura

El uso de plantas transgénicas en la agricultura ha permitido la creación de nuevas especies de plantas capaces de resistir las condiciones ambientales adversas, de producir o aumentar la producción de vitaminas, carbohidratos o azúcares (entre otros componentes) que anteriormente no se encontraban presentes en la composición nutricional de aquellas, o se encontraban a muy bajas concentraciones.³¹⁻³⁴ Además, la obtención de plantas transgénicas le ha posibilitado a personas hipersensibles el consumo de productos alimenticios carentes de toxinas y componentes alergénicos de los que anteriormente debían abstenerse de probar. Así, se han obtenido un maní hipoalergénico, que no contiene el antígeno capaz de desatar una de las alergias alimentarias más serias, y que se manifiesta con urticaria, hinchazón, problemas respiratorios, trastornos gastrointestinales, e incluso choque anafiláctico; un café sin cafeína, pero con todo el sabor y las propiedades originales del grano; y un trigo

con un alto rendimiento de amilasa que permite mejorar la composición de la flora intestinal, los niveles sanguíneos de glucosa, y con efecto protector contra el cáncer colorectal; entre otros muchos ejemplos.³⁵⁻³⁷

CONCLUSIONES

La ingeniería genética y sus técnicas con frecuencia han sido descritas como medios utilizados por el hombre para presionar y retar a la naturaleza más allá de sus límites. Muchos de estos criterios han sido emitidos a veces por desconocimiento o falta de la información necesaria, sin la cual sería muy difícil emitir una opinión justa sobre esta temática. También en muchos casos, el mal uso de estas técnicas por personas inescrupulosas y faltas de ética ha sido la fuente fundamental de criterios opuestos al desarrollo y aplicación de las técnicas de recombinación genética. Sin embargo, múltiples han sido los beneficios obtenidos con el desarrollo de estas tecnologías, las cuales han permitido, entre otros aspectos, mejorar la calidad de vida de muchos seres humanos. No se trata de negar o evitar el desarrollo de la ciencia: todo consiste en aplicar responsablemente, a favor de la humanidad, las ventajas y posibilidades de los nuevos avances tecnológicos.

SUMMARY

The development of genetic manipulation techniques has enabled the acceleration of several natural processes that otherwise would have required extended periods of time for their completion, or have never occurred spontaneously. This has been achieved through insertion of foreign deoxy-ribonucleic acid into hosting organisms, resulting in new variations of the metabolism of the receiving-species. In this present work (the first of a trilogy) some of the relevant methodologies used for obtaining genetically modified organisms in plants and animals are shown, their main features are

commented, and examples are presented of their uses and applications.

Subject headings: Transgenic organisms / Genetic recombination / Genetically Modified Organisms / Nucleic acids.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smith JA, Bardoe C, Smith JA. Gregor Mendel: the friar who grew peas. Abrams Books for Young Readers. New York: 2006. ISBN 0-8109-5475-3.
2. Antunes G, Pereira J. El consumidor y el derecho a la información frente a la incertidumbre que envuelve a los alimentos genéticamente modificados. Rio de Janeiro: 2003. pp. 50.
3. Hesse F, Wagner R. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. Trends Biotechnol 2002; 18:173-80.
4. 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. Nature Biotechnology 2003; 21:157-62.
5. Brem G, Brenig B, Goodman HM, Selden RC, Graf F, Kruff B, Springmann K, Hondele J, Meyer J, Winnacker EL, Kräusslich H. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. Zuchthygiene 1985; 20:251-2.
6. Colman A. Dolly, Polly and other 'ollys': likely impact of cloning technology on biomedical uses of livestock. Genet Anal 1999;153:167-73.
7. Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature 1996;380: 64-6.
8. Lavitrano ML, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing

- foreign DNA into eggs. *Cell* 1989;57:717-23.
9. Webster NL, Lavitrano ML *et al.* Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev* 2005;72: 68-76.
 10. Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M *et al.* Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 2003;421:231-7.
 11. Melo EO, Canavessi AMO, Franco MM, Rumpf R. Animal transgenesis: state of the art and applications. *J Appl Genet* 2007; 48:47-61.
 12. Wall RJ, Powell AM, Paape MJ, Kerr DE *et al.* Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *Nature Biotechnol* 2005;23:445-51.
 13. Seow Y, Wood MJ. Biological gene delivery vehicles: Beyond viral vectors. *Molecular Therapy* 2009;17:767-77.
 14. Wells K, Moore K, Wall R. Transgene vectors go retro. *Nat Biotech* 1999;17: 25-6.
 15. Baguisi A. Production of goats by somatic nuclear transfer. *Nature Biotechnol* 1999;17:456-61.
 16. Golovan SP, Meidinger RG, Ajakaiye A, Cottrill M, Wiederkehr MZ, Barney DJ, Plante C, Pollard JW *et al.* *Nat Biotechnol* 2001;19:741-5. Erratum in: *Nat Biotechnol* 2001;9:979.
 17. Boer H. Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production. *Biotechnology* 1991;9:844-7.
 18. Hesse F, Wagner R. Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *Trends Biotechnol* 2002;18: 173-80.
 19. Schniek E, Kind AJ, Ritchie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie M, Wilmut I, Colman A, Campbell KHS. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science* 1997;278:2130-3.
 20. Amado RG, Yi SCh. Lentiviral vectors- the promise of gene therapy within reach? *Science* 1999;285(5428): 674-6.
 21. Prescott LM. Microbiología. Quinta Edición. McGraw Hill/Interamericana de España SA. Madrid: 2004.
 22. Cooper DKC, Kemple A, Platt L, White DJG. Xenotransplantation: The transplantation of organs and tissues between species. Second Edition. Harpers Books. New York: 1997.
 23. Denman J, Hayes M. Transgenic expression of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology* 1991;9:839-43.
 24. Baguisla B. Production of goats by somatic nuclear transfer. *Nature Biotechnol* 1999;17:456-61.
 25. Wilkinson JQ. Biotech plants: From lab bench to supermarket shelf. *Food Technology* 1997;51:37-42.
 26. Goodner B. Genome sequence of the plant pathogen and biotechnology agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 2004;294:2323-8.
 27. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. ISSN 0717-3458.
 28. Wood DW. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 2004;294: 2317-23.
 29. Allardet-Servent A. Presence of one linear and one circular chromosome in the *Agrobacterium tumefaciens* C58 genome. *J Bacteriol* 1993;175:7869-74 .

30. Arencibia AD, Carmona ER, Téllez P, Chan MT, Yu SM, Trujillo LE, Oramas P. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum spp L.*) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic Research 1998;7:1-10.
31. Arencibia A, Molina P, Gutiérrez C, Fuentes A, Greenidge V, Menéndez E, de la Riva G, Selman-Housein G. Regeneration of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum L.*) plants from intact meristematic tissue transformed by electroporation. Biotecnología Aplicada 1992;9:156-65.
32. Arencibia A, Molina P, de la Riva G, Selman-Housein G. Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum L.*) plants by intact cell electroporation. Plant Cell Reports 1995;14:305-9.
33. Arencibia A, Vázquez R, Prieto D, Téllez P, Carmona E, Coego A, Hernández L, de la Riva G, Selman-Housein G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem-borer attack. Molecular Breeding 1997;3:247-55.
34. Doty SL, Yu NC, Lundin JI, Heath JD, Nester EW. Mutational analysis of the input domain of the VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol 1996;178:961-70.
35. Hamilton CM. A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. Gene 1997;200: 107-16.
36. Heath JD, Charles TC, Nester EW. Ti plasmid and chromosomally encoded two-component systems important in plant cell transformation by *Agrobacterium tumefaciens*, En: Two-component signal transduction (Editores: Hoch JA, Silhavy TJ). ASM Press. Washington DC: 1995. p. 367-385.
37. Hansen G, Shillito RD, Chilton MD. T-strand integration in maize protoplasts after codelivery of a T-DNA substrate and virulence genes. PNAS Proc Nat Acad Sc USA 1997;94:11726-30.