

Propuesta de metodología para el análisis de los riesgos de la liberación de organismos en el medio ambiente

✉ Orfelina Rodríguez García, José Rodríguez, Miguel Lorenzo, Julia La Rosa, Esther Argote, Leticia Pastor

Centro Nacional de Seguridad Biológica. Calle 28 No. 502 e/ 5^a y 7^{ma}, Miramar, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf. (53-7) 23 8040; E-mail: cnsb@cidea.cu.unep.ne

Biotecnología Aplicada 1999;16(Número especial):E53-E56

Introducción

La biotecnología moderna se desarrolló y se aplica, desde principios de la década de 1970, en condiciones de confinamiento y, desde mediados de la década de 1980, para aplicaciones en el medio ambiente. Aunque no pueda resolver todos los problemas fundamentales del medio ambiente y del desarrollo, se espera que aporte una importante contribución al desarrollo sostenible.

El desarrollo de la biotecnología moderna permitió la manipulación y modificación genética de muchos organismos, lo que posibilita la transferencia de material genético entre especies no relacionadas. De esta forma, fue posible la transferencia de genes del hombre a los peces y de microorganismos a plantas y animales superiores, para obtener mejoras en la calidad y la producción de alimentos, medicamentos, productos químicos e industriales, vacunas para la salud humana y animal, nuevos agentes de diagnóstico y agentes para contrarrestar el deterioro ambiental. Sin embargo, teniendo en cuenta que ya se informan riesgos potenciales y efectos adversos de los organismos modificados genéticamente para el medio ambiente y la salud [1, 2], el capítulo 16 del Programa 21, aprobado por la Conferencia de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo (CNUMAD, junio 1992), reconoce que la comunidad, en general, sólo se podrá beneficiar al máximo de la biotecnología si ésta se desarrolla y aplica juiciosamente, y es por eso que preconiza una gestión ecológicamente racional de la misma. El Convenio sobre la Diversidad Biológica que entró en vigor en diciembre de 1993, abordó la necesidad de la elaboración de un Protocolo sobre Seguridad de la Biotecnología para garantizar la seguridad en el desarrollo, manipulación y transferencia de cualquier organismo vivo modificado (OVM) que pueda tener efectos adversos para la conservación y utilización sostenible de la biodiversidad, y abordó la necesidad de mecanismos fundamentados previos para la exportación e importación de OVM. Posteriormente, se aprobaron, por una consulta mundial de expertos en diciembre de 1995, las Directrices Técnicas Internacionales del Programa de las Naciones Unidas sobre el Medio Ambiente (PNUMA) sobre la Seguridad de la Biotecnología, que se basan en que la utilización de procedimientos adecuados de evaluación y gestión del riesgo, la creación de capacidad y el intercambio de información, pueden contribuir considerablemente a la seguridad de la biotecnología. Aunque estas directrices se refieren a los organismos con rasgos nuevos, los principios generales de seguridad son aplicables a todos los organismos [3].

En nuestro país, el estado cubano designó al Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente como autoridad competente en materia de seguridad biológica, y éste, a su vez, a través de la Resolución 67/96, creó el Centro Nacional de Seguridad Biológica para la organización del Sistema Nacional de Seguridad Biológica, que entre sus objetivos tiene que desarrollar la Metodología para el Análisis del Riesgo Biológico por la Liberación de Organismos al Medio Ambiente.

Desarrollo

El riesgo derivado del uso y manipulación de los organismos, se define por la siguiente fórmula: Exposición x Peligro, donde la exposición es la probabilidad de ocurrencia del riesgo y el peligro es la magnitud del impacto del suceso. Uno de los riesgos que tiene la ingeniería genética es precisamente que la inserción del gen foráneo en el genoma del organismo receptor es al azar, lo que puede ocasionar efectos imprevisibles sobre la fisiología y bioquímica de los organismos. Además, esto impide predecir con exactitud los niveles de expresión de los transgenes introducidos y, por lo tanto, de los riesgos derivados de esa manipulación genética, teniendo en cuenta que el nivel de expresión y la función de un gen depende de la posición que ocupe el mismo dentro del material genético del receptor. En dependencia de esta posición, el gen puede ser más o menos activo, más propenso a las mutaciones o al silencio genético. Es por eso que existe la necesidad de un análisis de los riesgos de los organismos que serán liberados al medio ambiente, el cual, metodológicamente, comprende tres etapas.

Análisis de riesgo

Este procedimiento consiste en la aplicación de un método objetivo y realista para determinar la probabilidad de ocurrencia de un suceso que involucra peligro. Su metodología comprende básicamente las siguientes etapas: evaluación de riesgos, gestión de riesgos y comunicación de los riesgos, con el objetivo de llegar a un nivel aceptable de seguridad. La aceptación del nivel de seguridad significa que no se puede exigir el riesgo cero debido a que, en la práctica, cualquier actividad o proceso involucra algún grado de riesgo. En el proceso de análisis de riesgo, la evaluación de los riesgos es muy importante debido a que, si un riesgo particular no es identificado, los pasos para reducir dicho riesgo no pueden ser formulados [4-6].

Evaluación de riesgos

Es un procedimiento que consiste en el uso de datos científicos, sobre todo los relacionados con los posi-

1. Greenpeace International. *Playing God. Genetic Engineering of Food in Central and Eastern Europe*. Noviembre, 1996.

2. Ho MW, Tappeser B. *Transgenic Transgression of Species Integrity and Species Boundaries. Implications for Biosafety*, 1996.

3. PNUMA. *Directrices Internacionales sobre Seguridad de la Biotecnología*, 1995.

4. Cane BG, et al. *Análisis de los factores de riesgos asociados a la encefalopatía espongiiforme bovina en Argentina*. *Rev Sic Tech Off Int Epiz* 1993; 12(4):1203-4.

5. Mac Diarmid SC. *Risk analysis and the importation of animal and animal products*. *Rev Sic Tech Off Int Epiz* 1993; 12(4):1045-53.

6. AHL AS, et al. *Standardization of nomenclature for animal health risk analysis*. *Rev Sic Tech Off Int Epiz* 1993;12(4): 1045-53.

bles efectos adversos que impliquen una relación causa-efecto; es decir, es un procedimiento que debe realizarse de una manera científicamente adecuada con el uso de conocimientos especializados y actualizados, con el objetivo de caracterizar e identificar la naturaleza y la magnitud de las situaciones hipotéticas de peligro, si las hubiera, y la probabilidad de que esas situaciones se presentaran en realidad. Debe hacerse caso por caso, lo que significa hacer un examen individual de cada propuesta y paso a paso, es decir, deberá efectuarse una evaluación en cada una de las fases del proceso, desde la fase de investigación en el laboratorio, desarrollo y producción, hasta la liberación ambiental en pequeña y gran escala [6–8].

Gestión de riesgos

Es el procedimiento que permite, una vez caracterizado el riesgo, la aplicación de las medidas más adecuadas para reducir al mínimo los riesgos determinados y mitigar sus efectos, al tiempo que se obtienen los resultados esperados, con el objetivo de que el uso y la manipulación de los organismos durante la investigación, desarrollo, producción y liberación, sean seguros para la salud del hombre y/o el medio ambiente. Estarán determinados por la evaluación del riesgo, los organismos utilizados y la forma en que serán liberados [6–8].

Comunicación de los riesgos

Consiste en la comunicación al personal de los riesgos identificados en la etapa de evaluación de los mismos.

El proceso de análisis de los riesgos se basa en el principio de familiaridad que se refiere a los conocimientos y experiencia con un organismo dado. La familiaridad no implica seguridad, implica disponibilidad de información. Esta información es usada para analizar efectos adversos potenciales con un organismo específico, con un rasgo específico, en un ambiente específico [3]. La evaluación y la gestión de los riesgos pueden basarse, en parte, en los conocimientos y la experiencia (es decir, la familiaridad) con un organismo. Una familiaridad adecuada con un organismo no implica necesariamente que sea inocuo, pero significa que se le pueden aplicar procedimientos de gestión conocidos. La falta de familiaridad no significa que un organismo no sea inocuo, pero significa que, mientras no se haya adquirido suficiente familiaridad con dicho organismo, los riesgos a él asociados se estiman caso por caso y de forma gradual.

Metodología general para el análisis del riesgo biológico

Dada la gran diversidad de productos derivados de la biotecnología, se hace difícil la elaboración de una metodología única que pueda abarcar todos los productos, por lo que es necesaria la elaboración de una metodología general que permita la confección de los expedientes técnicos por la entidad autora de la propuesta de la liberación, para el análisis de los riesgos a nivel de la instalación como primer nivel, y por el órgano regulador como segundo nivel de evaluación. Esto culmina con la concesión o denegación de la autorización biológica [9–12].

Características de los organismos

Hay que tener en cuenta al organismo donante, al receptor parental y al organismo que se modifica genéticamente.

Organismos modificados genéticamente (OMG): organismos con rasgos nuevos. Son los organismos producidos por modificación genética y cuya estructura genética resultante es poco probable que se dé en la naturaleza [3].

Donante: el organismo del que se obtiene material genético para su inserción en otro organismo o su combinación con él [3].

Hospedero (Receptor): organismo en el que el material genético se altera mediante la modificación de parte de su material genético y/o la inserción de material genético ajeno [3].

En el caso de los microorganismos, es importante tener en cuenta los aspectos taxonómicos de los organismos y señalar el biotipo, los serotipos y las cepas.

En cuanto a las características biológicas de los organismos, como la patogenicidad, la toxicidad y la alergenicidad, es de señalar que, en el caso de los microorganismos, existen listas de clasificación de agentes patógenos para los seres humanos, los animales y las plantas. Esta clasificación se tiene en cuenta ya que no es lo mismo manipular genéticamente un microorganismo del grupo de riesgo II que uno del grupo de riesgo III.

Mecanismos que utiliza el organismo para sobrevivir, multiplicarse, difundirse y competir en el medio ambiente

La habilidad relativa de los organismos para la supervivencia y multiplicación en el medio ambiente en el cual serán diseminados, es una consideración importante para la evaluación de la seguridad de la liberación, debido a que la capacidad que tienen para causar daño depende de la interacción que establezcan con otros organismos del ecosistema. Hay microorganismos que, en respuesta a condiciones adversas del medio ambiente, disminuyen su tamaño, su morfología se altera y no crecen en los medios de cultivo de laboratorio, mas sin embargo, conservan su viabilidad y patogenicidad. Este estado recibe el nombre de viable pero no cultivable, el cual es más frecuente en el ambiente marino, y proporciona protección al ADN desnudo que se encuentre biológicamente activo, que puede persistir en el medio ambiente procedente de los OMG [13, 14–16]. Existe otro estado de latencia que pueden tener algunos microorganismos y que difiere del mecanismo descrito anteriormente. Algunos microorganismos como *Pseudomonas fluorescens* pueden tener este estado y persistir en el medio ambiente (suelo) por varios meses [13].

Resistencia a la desinfección: la capacidad que tiene un microorganismo de resistir el proceso de desinfección, posibilita su persistencia en el medio ambiente. Un ejemplo de ello lo constituye la capacidad que tienen cepas rugosas de *Vibrio cholerae O1 El Tor Inaba N 16961* (que pueden causar enfermedad humana, demostrada por inoculación en voluntarios humanos) de resistir una concentración de cloro de 2 mg/L por más de 30 min. Esto es de muy seria importancia

7. Morley RS. A model for the assessment of the animal disease risk associated with the importation of animal and animals products. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1993;12(4): 1055–92.

8. ONUDI. Código de conducta voluntario para la liberación de organismos en el medio ambiente. Preparado por la Secretaría de la ONUDI/PNUMA/OMS/FAO sobre Seguridad de la Biotecnología, 1991.

9. Comunidad Económica Europea. Directiva 220 del Consejo sobre la Liberación Intencional en el Medio Ambiente de Organismos Modificados Genéticamente, 1990.

10. Organización Internacional de Epizootias. Guías para la liberación en el medio ambiente de Organismos Modificados Genéticamente. Programa II. Generación y Transferencia de Tecnología. Serie Publicaciones. Misceláneas. Costa Rica, 1991.

11. Tzotzos TG. Genetically Modified Organisms. A Guide to Biosafety. UNIDO/UNEP/ICGEB, 1995.

12. OCDE. Safety considerations for biotechnology. Scale up of microorganisms as biofertilizers, 1995.

13. Tappeser B, et al. Survival, persistence, transfer—An update on current knowledge on GMO and the fate of their recombinant DNA. Institute for Applied Ecology. Germany, May 1998.

14. OPS/OMS. Lineamientos para el control del cólera. Grupo de trabajo de control de cólera. 1992.

15. Chowdhury MAR, et al. Physiology and molecular genetics of viable but non-culturable microorganisms. In *Of the Biotechnology Risk Assessment Symposium*, June 22–24, 1994.

16. Kellenber E. Genetic ecology: A new interdisciplinary science fundamental for evolution, biodiversity and biosafety evaluations. *Experientia* 1994;50:429–37.

17. Courvalin P. Transgenic plants and antibiotics. Will GMO aggravate the crucial problems of bacterial resistance? The Edmonds Institute, 1998.

en la evaluación del riesgo de una vacuna viva atenuada oral contra *V. cholerae* en humanos, por lo que este aspecto es de vital consideración para la utilización del desinfectante adecuado en la eliminación de los microorganismos después de la liberación.

Capacidad de transferencia de material genético a otros organismos

Puede haber transferencia de material genético de los OMG a los organismos del ecosistema afectados después de la liberación, y también de los organismos del ecosistema a los OMG.

Hoy se conoce que los genes son dinámicos y fluidos, que pueden cambiar por influencia del medio ambiente. Los genes portados por vectores pueden persistir indefinidamente en el medio ambiente dentro de bacterias que se mantienen latentes, o como ADN desnudo adsorbido sobre partículas [2]. La concentración de ADN desnudo en el agua marina está en el rango de 0,2–44 µg/L, entre 0,5–25,6 µg/L en el agua fresca y hasta de 1 mg en sedimentos. La transferencia horizontal de genes puede ocurrir prontamente por la captura de este ADN desnudo liberado en el medio ambiente.

La transferencia horizontal de genes se refiere a la transferencia que ocurre en la naturaleza por los mecanismos de conjugación, transducción y transformación entre especies afines, pero sobre todo entre especies no relacionadas. En el caso de los microorganismos y los organismos superiores, ocurre por hibridación. Durante mucho tiempo, se pensó que la transferencia horizontal no involucraba organismos superiores; sin embargo, hoy se conoce que ocurre frecuente y promiscuamente en la naturaleza entre bacterias muy diferentes, entre hongos, entre bacterias y protozoos, entre hongos y plantas, entre insectos, y entre bacterias y organismos superiores (plantas y animales). Se demostró entre bacterias en el ambiente marino, en el agua fresca y en el suelo, mediada por vectores que son usados en la tecnología de la transgénesis. Aunque los vectores fueron mutilados de sus funciones patogénicas, no deben dar una falsa sensación de seguridad, porque, como parte de la tecnología de la transgénesis, es bien conocido que pueden ser ayudados por virus y elementos genéticos móviles para saltar dentro y fuera del genoma. La frecuencia reportada de la transferencia horizontal de genes varía sobre 10^4 veces y algunos autores han reportado una frecuencia de $6,2 \times 10^{-2}$. Teniendo en cuenta que la transferencia horizontal de genes de los organismos transgénicos a otros organismos del ecosistema podría permitir la persistencia del gen ingenierizado en el medio natural después de que el OMG no esté presente, se hace necesario el conocimiento de la frecuencia con que ocurre este fenómeno, de vital importancia para las consideraciones de bioseguridad, aunque es casi imposible eliminar toda la capacidad de transferencia horizontal de genes desde un OMG que está siendo liberado al del medio ambiente [10, 11, 13, 17–21].

En la actualidad, existen evidencias de que los vectores que median la transferencia horizontal de genes y la recombinación, diseminan la resistencia a antibióticos y generan nuevos patógenos, por lo que la utilización de la resistencia a antibióticos como genes marcadores en organismos transgénicos podría exacerbar esta situación [19]. Hasta el presente, la rápida di-

seminación de la resistencia a antibióticos está bien documentada. En 1982, en Alemania, la estreptomycin fue administrada a cerdos. En 1983, plásmidos que codificaban resistencia a ese antibiótico fueron encontrados en bacterias intestinales de los cerdos y, en 1984, esa resistencia fue diseminada a las bacterias intestinales de los agricultores y de su familia, por lo que el antibiótico fue retirado en 1990. Sin embargo, la prevalencia del plásmido permaneció elevada cuando fue monitoreado en 1993, lo que confirma la capacidad de las poblaciones microbianas de servir como reservorio estable para la replicación, recombinación y transferencia horizontal de genes [22].

El ambiente acuático y marino es particularmente favorable para la transferencia horizontal de genes, por lo que la transducción a través de los virus constituye una vía importante. Está demostrado que la concentración de partículas virales en agua salada es extremadamente alta, entre 10^6 – 10^8 partículas por mililitro [22, 23].

Características del vector

Vector: organismo o vehículo utilizado para transferir material genético de un organismo donante a un organismo receptor. Éstos pueden ser plásmidos (pequeño ADN circular fuera del cromosoma bacteriano que es capaz de replicarse de manera independiente en una célula hospedera), bacteriófagos (virus de bacterias) y virus de células eucarióticas. Los vectores son manipulados genéticamente para eliminar su capacidad patógena [3].

Teniendo en cuenta que uno de los riesgos de la ingeniería genética es precisamente que la inserción de los genes foráneos en el receptor es al azar, se hace necesario conocer las siguientes características del vector y del inserto:

- naturaleza y fuente del vector
- secuencia completa de los ácidos nucleicos
- presencia o ausencia del vector en la construcción final (en caso de ausencia, es necesario conocer cómo fue eliminado)
- método por el cual se introduce el vector en la célula hospedera
- características de seguridad del vector
- capacidad para transferirse a otros organismos
- factores que pueden influir en la capacidad del vector para establecerse en otros hospederos
- estabilidad genética de la combinación hospedero-vector.

Características del inserto

Inserto: es el ácido nucleico insertado [3].

- Origen del ADN insertado. Conocer si proviene de algún organismo que causa afectaciones a la salud humana, vegetal o animal.
- Ubicación del material genético insertado en la construcción final. Si los genes introducidos son integrales o extra cromosómicos.
- Número de copias del gen que se insertaron.
- Debe estar bien caracterizado, conocido el tamaño, las secuencias y las funciones codificadas por el ácido nucleico insertado, ya que no debe codificar ninguna sustancia peligrosa, para lograr que el OMG sea genéticamente estable. Por ejemplo, secuencias que comienzan el proceso de replicación viral (genes regulatorios) pueden resultar en nuevos rasgos fenotípicos.

18. Tiedje JM, et al. The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recommendations. *Ecology*, 1989; 70(2).

19. Ho MW. Perils amid promises of genetically modified foods. 1996.

20. Ho MW. Are current transgenic technologies safe? Capacity building in biosafety urgently needed for developed countries. *Bios Safety capacity building: Evaluation criteria development*. Edited by Ivar Virgin, 1996.

21. Phage transfer. A new player turns up in cholera infection. *Science*, 1996;272: 1869–70.

22. Biosafety. Scientific findings and elements of a protocol. Report of the Independent Group of Scientific and Legal Experts on Biosafety. Published by Third World Network, 1996.

23. Ho MW, Tappeser B. Potential contributions of horizontal gene transfer to the transboundary movement of living modified organisms resulting from modern biotechnology. In: Kalem J, Mulongy IAE, editors. *Transboundary movement of living modified organisms resulting from modern biotechnology issues and opportunities for policy markers*. Ginebra, 1997.

- Información sobre la expresión del ácido nucleico insertado y la actividad del producto o los productos del gen.

Información relativa a la utilización prevista

Liberación deliberada o intencional: cualquier utilización de organismos que no esté confinada [3].

Liberación controlada: la utilización de organismos con la aplicación de medidas de gestión de riesgo [3].

Confinamiento: prevención de la dispersión de organismos fuera de las instalaciones, que puede lograrse por medio del confinamiento físico (la aplicación de prácticas de trabajo adecuadas, equipos de seguridad apropiados y un buen diseño de las instalaciones) y/o el confinamiento biológico (el empleo de organismos que tienen una capacidad reducida de sobrevivir o de reproducirse en el medio natural) [3].

- Descripción y ubicación geográfica del área de liberación.
- Condiciones ambientales previstas durante la liberación.
- Información procedente de utilizaciones previas.
- Número o volumen de los organismos que van a ser liberados.
- Escala y frecuencia de la liberación.
- Momento y duración de la liberación.
- Posibilidad de movimientos transfronterizos.
- Las medidas de gestión de riesgos y su verificación.
- Capacitación y supervisión del personal que realiza el trabajo.
- Posibilidad de que después de la liberación se produzca un efecto adverso.
- Medidas en el proceso de producción para asegurar la calidad y pureza del organismo que se va a liberar.
- Condiciones para la transportación de los organismos que se van a liberar.
- Detallar las medidas para reducir poblaciones o eliminar organismos una vez que haya finalizado la liberación.
- Distancia entre el sitio de liberación y las aguas destinadas para el consumo.

Control de la liberación con las medidas de gestión de los riesgos en dependencia del organismo que se va a liberar

- Métodos para evitar y/o reducir al mínimo la diseminación. (Estabilidad genética).
- Métodos para controlar el acceso de personas no autorizadas.
- Métodos para impedir que otros organismos penetren en el lugar.

Técnicas de control para la detección de OMG en el medio ambiente (monitoreo)

- Métodos empleados para el seguimiento de los OMG.
- Sensibilidad y especificidad de los métodos de control.
- Duración y frecuencia del control.

Planes de emergencia

Se refiere al control de accidentes y acontecimientos imprevistos. Debe estar debidamente documentado.

- Métodos y procedimientos de control de los OMG en caso de diseminación.
- Métodos de aislamiento de la zona afectada por la diseminación.
- Métodos de eliminación o de saneamiento de plantas, animales, suelos, etc., expuestos al organismo durante la diseminación o después de la misma.
- Planes de protección para la salud humana y del medio ambiente en casos en los que se produzca un efecto indeseable.

En el caso de ensayos clínicos en humanos con patógenos no endémicos en el territorio nacional, deben elaborarse los procedimientos de emergencia relacionados con la posibilidad de escape del organismo hacia el medio ambiente y la posibilidad de ocurrencia de una epidemia, por lo que deben conocerse de antemano las medidas de tratamiento como antibióticoterapia y todo debe estar debidamente documentado.

Control de desechos

- Conocer qué tipos de residuos se van a generar.
- Volumen de residuos previstos.
- Riesgo potencial de los mismos.
- Procedimientos para el control de los desechos: procedimientos de desinfección, tratamiento y eliminación final.

El medio ambiente como receptor potencial

La capacidad potencial de un organismo para causar daño está relacionada con el medio ambiente en el cual se va a liberar y su interacción con otros organismos.

- Tamaño de la población local.
- Características del medio ambiente receptor (características geográficas, climáticas y geológicas).
- La proximidad del lugar a seres humanos, flora y fauna.
- Disponibilidad de hábitats/nichos adecuados y asequibles para el OMG que va a ser liberado.
- Descripción de los ecosistemas que podrían verse afectados por la liberación.
- El potencial de cualquier organismo que se encuentre en el medio receptor para recibir genes del organismo liberado.
- Condiciones ambientales conocidas o previstas que pudieran afectar la supervivencia, multiplicación y diseminación de los OMG (viento, agua y suelo).
- Ventajas competitivas de los OMG en relación con los organismos del ecosistema.
- Posibilidad de un incremento excesivo de la población del OMG liberado en el medio ambiente.

Todos estos elementos se documentan y constituyen el expediente técnico del organismo que va a ser liberado.

Conclusiones

Los riesgos potenciales de los organismos con rasgos nuevos existen, pero también se conocen los procedimientos adecuados para el análisis de los riesgos y es ahí donde la mano del hombre desempeña el papel fundamental, por lo que se hace necesaria la elaboración de una metodología general que permita realizar las evaluaciones correspondientes antes de la liberación de estos organismos al medio ambiente.