

Nuevas alternativas en la prevención de la deficiencia de hierro. Uso de la ingeniería genética en la modificación de alimentos

María Nieves García-Casal

Centro de Medicina Experimental, Laboratorio de Fisiopatología.
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Caracas

RESUMEN. Este artículo discute algunas de las posibles aplicaciones de técnicas de modificación genética para introducir algunos compuestos en plantas o animales. El potencial de estas técnicas de modificación de plantas es muy amplio y va desde mejoras en la producción de alimentos para consumo humano y para el desarrollo pecuario, pasando por la producción de anticuerpos o proteínas para uso terapéutico hasta las modificaciones que implican la inclusión de nutrientes para mejorar el valor nutritivo de un alimento y la producción de vacunas. Debe tenerse presente, sin embargo, que el alcance o las consecuencias de estas modificaciones no están totalmente dilucidadas. Hay preocupación por efectos secundarios o la aparición de nuevos virus por recombinación genética que no han sido totalmente descartados, aunque la tendencia es considerar el proceso como seguro. Finalmente se presentan evidencias sobre la posibilidad de introducir en vegetales la capacidad de sintetizar vitamina A o de producir arroz con un alto contenido de hierro como alternativas reales para combatir algunas de las deficiencias nutricionales más importantes a nivel mundial.

Palabras clave: Biotecnología, modificación genética.

Desde hace unos pocos años se ha abierto un nuevo campo de investigaciones y posibilidades con la manipulación de genes. Se han hecho realidad delecciones, transformaciones, inserciones y un sinnúmero de manipulaciones genéticas que hace 20 años parecían imposibles y que se traducen en mejoras a nuestra calidad de vida a pesar de no haber sido evaluados en su totalidad las limitaciones o posibles daños. En esta conferencia enumeraré algunos logros importantes en cuanto a manipulación genética con especial énfasis en alimentos transgénicos en general y las modificaciones que afectan de alguna manera el metabolismo de hierro.

Leche

La producción de algunas sustancias usadas en transfusiones (factores de coagulación, interleucinas, eritropoyetina) presenta ciertos inconvenientes como altos costos de producción industrial, requerimiento de purificaciones exhaustivas y rigurosas antes de poder ser usados por lo que el rendimiento es por lo general bastante bajo (1). Algunas estrategias recientes incluyen la obtención de estas proteínas a partir de la leche

SUMMARY. *New alternatives in the prevention of iron deficiency. Use of biotechnology in food modification.* This article reviews the possible applications of new food biotechnology techniques to introduce some compounds into plants or animals. The potential for these plant modification methods has ample applications ranging from improvements in food production and development for human consumption, production of antibodies or therapeutic proteins, inclusion of nutrients to improve nutritional value of the food to production of vaccines. It must be clear though that currently the scope and consequences of such modifications are not completely clear. There is some concern about potential secondary effects and the hypothesis of the appearance of new viruses due to recombinant genetical transformations that have not been totally rejected. However the tendency is towards considering the process as safe. Finally some evidence is presented about the possibility of introducing the capacity to synthesize vitamin A in vegetables or produce rice with high content of iron as real alternatives to fight some of the nutritional deficiencies most common worldwide.

Keywords: Biotechnology, genetic modification, GMO.

de animales transgénicos. Esto se logra introduciendo un vector de fusión en huevos fertilizados de cabras, ovejas o cerdos, que transmitirán el gen a su progenie. El producto se expresa solo en la leche debido a que el vector de fusión contiene secuencias regulatorias para proteínas específicas de la leche como caseína o lactoglobulina. Sin embargo, este procedimiento tiene algunos problemas como expresión no predecible, glicosilación alterada y la posible presencia de agentes patógenos.

Se ha logrado también producir lactoferrina humana (hLF) en leche de vaca (2). Para ello se usaron vectores de expresión específicos de glándula mamaria basados en elementos regulatorios de caseína bovina que contenían bien el cDNA de lactoferrina humana o secuencias genómicas de hLF. Dichos vectores fueron introducidos en líneas germinales bovinas por inyección pronuclear a embriones. Los niveles de lactoferrina humana fueron bajos en la leche de las vacas a las que se insertó el cDNA, pero del orden de miligramos por litro en la leche de las que contenían secuencias genómicas.

La expresión de lactoferrina humana no afectó la cantidad

y composición de la leche, ni estuvo asociada a cambios en la salud de las vacas. La lactoferrina recombinante resultó virtualmente idéntica a la lactoferrina humana por criterios inmunológicos, funcionales y estructurales. Los autores especulan que la lactoferrina recombinante tendría efectos antimicrobianos y antiinflamatorios similares a los reportados *in vivo*.

Plantas

Otro gran acierto en cuanto a manipulación genética ha sido la obtención de hemoglobina humana a partir de plantas de tabaco (3). Actualmente se obtienen los sustitutos sanguíneos basados en hemoglobina a partir de sangre bovina o humana descartada, expresando la hemoglobina en bacterias, levaduras o animales transgénicos con algunos problemas como oxidación del hemo y la presencia de agentes infecciosos. Las plantas transgénicas podrían ser una buena alternativa como recurso más económico y menos susceptible a contaminación. En este trabajo se transformaron plantas de tabaco con *Agrobacterium tumefaciens* que contenía un plásmido co-expresando las secuencias de α y β -globina. La presencia de estas proteínas fue analizada por Western blot. Las globinas recombinantes tenían un peso molecular similar a las nativas indicando la ruptura del péptido de tránsito. La hemoglobina recombinante fue extraída de semillas y purificada por cromatografía. Esta hemoglobina fue estudiada en cuanto a propiedades funcionales como cinética de recombinación para monóxido de carbono encontrándose comportamientos similares a la hemoglobina humana. La producción de hemoglobina por este método posee las ventajas adicionales de eliminar la dependencia de sangre humana o bovina y las posibilidades de contaminación bacteriana y animal.

La producción de anticuerpos ha sido otro campo en el que se ha evaluado, por cierto con bastante éxito, la manipulación genética de plantas. En 1998 Verch y colaboradores (4), usando un vector basado en el virus mosaico del tabaco, lograron expresar en plantas anticuerpos monoclonales dirigidos contra un antígeno de cáncer de colon. Las cadenas pesadas y livianas fueron introducidas por separado y al coinfectar se logró el ensamblaje y funcionalidad del anticuerpo. También se ha reportado que anticuerpos del tipo IgA desarrollados en plantas tienen actividad contra *S. mutans*, el principal patógeno involucrado en el desarrollo de caries dental (5).

Se han realizado trabajos en la producción de vacunas para combatir infecciones que afectan gran cantidad de personas en el mundo, especialmente a los niños. *Escherichia coli* enterotóxica y *vibrio cholerae* causan diarrea aguda por colonización del intestino delgado y producción de enterotoxinas. La producción de vacunas eficaces debe estimular respuesta inmunitaria mucosa con producción de IgA secretora, un proceso que se logra mejor cuando el antígeno es presentado por vía oral. El gen de la enterotoxina de *E. Coli* enterotóxica fue introducido en plantas de tabaco y papa a través de *Agrobacterium tumefaciens* y se confirmó la presencia de

enterotoxinas en estas plantas (6). Se alimentaron ratones por gavage con extractos de hojas de tabaco transgénico y después de 30 días se evaluaron los títulos de anticuerpo contra la toxina, resultando similares a los títulos de los ratones a los que se administró la enterotoxina purificada de *E. Coli*.

La administración de papa transgénica produjo una respuesta de IgG e IgA específica contra la enterotoxina. Sin embargo la respuesta fue menor que cuando se administró la misma cantidad de toxina purificada. Este trabajo muestra evidencias de la utilidad de las plantas para expresar y servir de vehículo de vacunas orales. Los mismos autores han realizado estudios expresando la proteína de cápside del virus Norwalk en plantas. La administración de estas plantas a ratones, provoca respuesta inmunitaria específica.

Con la finalidad de producir vacunas para niños se están realizando estudios en bananas, que expresarían antígenos "bioencapsulados" que serían consumidos y posteriormente liberados en el tracto gastrointestinal, produciendo una respuesta inmunitaria mucosa seguida inmediatamente por una respuesta humoral (7). Las bananas ofrecen múltiples ventajas incluyendo su alta disponibilidad y consumo en áreas tropicales y sub-tropicales donde usualmente las vacunas son más necesarias, buen sabor y digestibilidad en infantes y no requieren cocción. La principal desventaja es que pueden transcurrir 2 a 3 años desde que se introduce el gen en las plantas, hasta que se obtiene el fruto transgénico.

Producción de alimentos

Desde el punto de vista de nutrición mundial, la búsqueda de mejoras en la producción de alimentos debe ser prioritaria. La población casi se duplicará en los próximos 45 años, lo cual implica que la producción de alimentos debería triplicarse. El área cultivable o de producción en el ámbito mundial podría variar muy poco. Por una parte tiende a disminuir debido a la urbanización y daño ambiental y por otra parte aunque es cierto que existen vastas zonas para la producción agrícola aún sin explotar, el costo de poner esas tierras a producir excede su valor, por lo menos en la actualidad.

Una de las utilidades de la industria genética es satisfacer la demanda creciente, aumentando la producción y calidad de los productos, probablemente disminuyendo la necesidad de grandes extensiones de terreno. Si se aumenta el contenido energético o el valor nutricional de los alimentos, disminuirá proporcionalmente la cantidad necesaria para alimentación, lo que es equivalente a aumentar la producción (8).

Se han realizado modificaciones en plantas que incluyen resistencia a insectos y herbicidas, resistencia a enfermedades y aumentar la calidad de alimento. A gran escala, estas mejoras se traducirían en disminución de costos, aumento de la disponibilidad de alimentos a nivel mundial y reducción del impacto sobre el ambiente. El control de insectos, hongos y otros organismos a través de plantas capaces de degradar toxinas producidas por estos organismos o la inserción de compuestos que no permitan a las aves o insectos acercarse a

la cosecha, disminuiría las pérdidas y reduciría costos. Con relación a mejorar el valor nutritivo de los alimentos, la utilización de modificaciones genéticas presenta- por lo menos en forma teórica- muchas ventajas. Sería posible introducir en un alimento de consumo masivo ciertos nutrientes en los que el alimento es deficiente, aumentar la disponibilidad de esos nutrientes, evitar la pérdida de nutrientes introduciendo algún elemento que lo retenga o lo haga mas absorbible, eliminar inhibidores de la absorción, etc.

La deficiencia de vitamina A, así como la de hierro y yodo constituyen importantes problemas de salud pública, que ocurren principalmente debido al consumo insuficiente o la baja biodisponibilidad de estos nutrientes. La fortificación de alimentos es una de las medidas mas efectivas para combatir la deficiencia. La inclusión de estos nutrientes o indirectamente de proteínas relacionadas con el metabolismo o la utilización de estos nutrientes, podría ser de gran ayuda en el mejoramiento del estado nutricional de la población.

Por ejemplo, el arroz es la principal fuente de energía de la mayor parte de la población mundial, especialmente en países en vías de desarrollo. Este cereal no contiene ni β -caroteno ni precursores C40 en su endospermo. Para mejorar el valor nutricional del arroz se ha tratado de introducir la maquinaria necesaria para que el tejido del endospermo del arroz sea capaz de producir β -caroteno y eventualmente, vitamina A. Burkhardt y colaboradores (9) encontraron en el arroz el precursor C20 necesario para la biosíntesis de carotenoides. La sintetasa de fitoene, que condensa 2 moléculas de geranyl-geranyl difosfato, es la primera de 4 enzimas necesarias para la síntesis de β -caroteno en plantas. Así, el arroz Japónica, variedad Taipei 309 fue transformado con el cDNA de la sintetasa de fitoene de narcisos, produciendo plantas transgénicas de arroz con la enzima de narcisos activa (medida por la acumulación de fitoene en endospermo de arroz). Los autores concluyen que es posible inducir la síntesis de vitamina A en un tejido vegetal no fotosintético carente de carotenoides, lo que tendría importantes implicaciones para disminuir la prevalencia de deficiencia de vitamina A.

Otro importante problema nutricional es la deficiencia de hierro y la anemia que acompaña sus últimos estadios. Este problema tiene alta prevalencia en grupos de edad en etapas de rápido crecimiento, cuando las demandas son mayores y está muy relacionado con la baja biodisponibilidad de las dietas consumidas en países en vías de desarrollo basadas en el consumo de cereales, tubérculos y leguminosas. En un artículo de Nature de este año, Goto y colaboradores (10) reportan sus experiencias sobre la fortificación de semillas de arroz con ferritina, como una manera de incrementar el contenido de hierro en este cereal.

La ferritina es la proteína de almacenamiento de hierro en los tejidos siendo capaz de almacenar hasta 4500 átomos de hierro. Esta proteína se encuentra virtualmente en todos los seres vivos y su conformación y capacidad de almacenar hierro, está bastante conservada entre los diferentes organis-

mos.

Estos autores introdujeron el gen de ferritina de soya en plantas de arroz mediante transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, bajo el control del promotor de glutelina (proteína de almacenamiento exclusivo de las semillas de arroz) de manera de acumular ferritina sólo en la semilla, reportando hasta 3 veces mayor concentración de hierro en semillas transgénicas que en las no transformadas.

En primer lugar aislaron el mRNA de soya y produjeron y amplificaron cDNA de ferritina utilizando primers específicos. Se hicieron 2 clonajes, el segundo de los cuales se realizó en un vector binario que contenía el promotor de glutelina. Este plásmido fue insertado en *Agrobacterium tumefaciens* por electroporación, la cual fue utilizada para infectar brotes de arroz. Estas plantas son cultivadas en el laboratorio y luego sembradas. Durante el proceso de cultivo y siembra, las plantas fueron analizadas para determinar la presencia del gen de ferritina de soya, encontrando por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) amplificación sólo en el caso de plantas transformadas. Además por Western Blot encontraron acumulación de ferritina exclusivamente en las semillas. En cuanto al contenido de hierro reportan incrementos importantes en semillas transformadas (en promedio 22.5 μ g Fe/g peso seco en semillas transformadas y 11.2 μ g Fe/g peso seco en semillas no transformadas). Además la determinación de hierro en otras partes de la planta demuestran que no hay diferencia en el contenido de hierro en plantas transformadas y no transformadas. Este hallazgo contrasta con el estudio realizado por Van Wuytswinkel y colaboradores (11) también en 1999, donde producen plantas de tabaco sobreexpresando el gen de ferritina de soya y encuentran alteraciones en el proceso de fotosíntesis que se evidencia por hojas amarillas, disminución del contenido de clorofila, desorganización estructural de cloroplastos. Por otra parte el incremento en la resistencia a metilviologeno, aporta evidencia adicional de la deficiencia de hierro en plantas sobreexpresando ferritina. La principal consecuencia de la acumulación de ferritina parece ser el aumento de hierro en las hojas y el incremento en la actividad de reductasa férrica (enzima crucial en la captación de hierro). Este comportamiento se explica debido al aumento en la capacidad de almacenamiento de hierro en las plantas transformadas, en las que se altera el metabolismo debido al excesivo secuestro de hierro, llevando a la planta a un "aparente" estado de deficiente que debe ser compensado activando los sistemas de captación de hierro.

Según Goto y colaboradores (10) es posible producir "arroz con ferritina" como una fuente de hierro para la dieta humana. El contenido de hierro de este arroz transgénico cubriría 30% a 50% del requerimiento diario de un adulto. Los resultados de este trabajo parecen indicar que estos métodos podrían ser un nuevo camino en la fortificación de alimentos para mejorar el estado nutricional de algunos grupos de población. Según la creciente cantidad de evidencia reportada

en la literatura, parece ahora una realidad muy factible la modificación de alimentos en gran escala con la posibilidad de incluir nutrientes importantes para el adecuado desarrollo humano. Es importante señalar que hay muchos elementos que analizar sobre todo en relación con riesgos potenciales, efectos secundarios, costos, beneficios, etc. En el caso específico de fortificación con hierro debe adicionalmente evaluarse la biodisponibilidad de esta fuente de hierro en humanos que, teóricamente, cubriría una buena parte del requerimiento diario. Como expresa Eleanor Lawrence en un editorial sobre este artículo (10) "quizás pasen algunos años antes que veamos este arroz con ferritina en nuestras mesas" pero lo que si es una realidad ahora es que este es un campo de investigación muy extenso que ofrece muchas posibilidades.

Actualmente existe preocupación acerca de los posibles riesgos de este tipo de manipulaciones. Uno de los puntos mas debatidos es la posibilidad de producir nuevos virus y por consiguiente nuevas enfermedades, mediante la manipulación genética. Esta es un área en la que se realiza una cantidad importante de investigación debido, entre otras cosas, al gran impacto económico que tiene la pérdida de cultivos por infecciones virales. Un método nuevo y poderoso para atacar este problema ha sido expresar ciertos segmentos virales (proteínas de cubierta, el gen incompleto de alguna otra proteína viral) en plantas, lo que confiere resistencia contra el virus correspondiente.

El problema que se plantea ahora (13), es la posibilidad de generar nuevos virus y enfermedades por medio de la recombinación genética. Un reporte de Greene y Allison (14) demuestra que ocurre recombinación cuando plantas transgénicas son inoculadas con un virus defectivo, y se recupera el virus completo. La preocupación es entonces si la recombinación genética podría producir nuevos virus peligrosos. La posibilidad de recombinación genética existe aún sin considerar plantas transgénicas, aunque se ha reportado que en los casos de infección viral mixta la producción de nuevos virus patógenos es muy rara. Aunque las condiciones en que se producen alimentos en muchos países proveen un buen ambiente para la interacción simultánea de varios virus, las nuevas enfermedades virales que se producen son usualmente debidas a variaciones menores de virus ya conocidos y no a virus nuevos de origen recombinante. La estabilidad estructural y funcional es importante y necesaria para el virus y los cambios son básicamente muy lentos.

En cuanto a las plantas transgénicas, aunque la respuesta no es aún definitiva, se cree que es poco probable que la recombinación entre RNA transgénico y genómico viral pueda ocurrir a frecuencias mayores que las que ocurren entre RNA genómico viral en infecciones naturales "convencionales" o múltiples, así como parece poco probable que puedan generarse y mantenerse nuevos virus viables mas patógenos o resistentes que los existentes, durante todo el ciclo de infección.

Otro tipo de patología que se ha incrementado en los últimos años, tanto en la severidad de los síntomas como en el

espectro de susceptibilidad, son las alergias alimentarias. Por esta razón, la posibilidad de incluir alimentos transgénicos a nivel de poblaciones (13) ha causado gran preocupación en algunos sectores.

La inserción de un gen nuevo en una planta podría resultar en la expresión de nuevos alérgenos o aumentar la expresión de los ya existentes. Si el DNA insertado se conoce bien, se podría esperar la expresión sólo de esa proteína y posiblemente el producto del gen marcador. Sin embargo, el sitio donde se inserta ese transgen en el genoma no está controlado y podría interferir con la expresión de otros genes y afectar numerosas características fenotípicas (15). Si la proteína a introducir es un alérgeno, es muy probable que el organismo transgénico exprese la proteína con potencial alérgico. Una proteína de las nueces de Brasil (albúmina de almacenamiento 2S) fue insertada en soya para incrementar los niveles de aminoácidos azufrados y aumentar así el valor biológico de las proteínas utilizadas para producir alimentos para animales. Esta proteína es un potente alérgeno (16) y provocó reacciones alérgicas idénticas tanto en la soya transgénica como en las nueces de Brasil (17). Así también se ha demostrado que la β -lactoglobulina expresada en *E. coli* tiene el mismo poder alérgico que la secretada en leche.

Se han sugerido (15,18) algunos aspectos que deben ser considerados antes de insertar una nueva proteína, entre los que se incluyen: conocer el origen del gen a insertar, caracterización exhaustiva de la proteína a producirse en el organismo transgénico, estudios en animales utilizando dicha proteína, análisis de estructura y comparación de secuencia con alérgenos conocidos y predicción de estructuras alérgicas que podrían no estar accesibles antes del proceso digestivo. De esta manera podría disminuirse el riesgo de inclusión de una sustancia alérgica. Como puede desprenderse de lo aquí señalado, con los alimentos transgénicos y con la manipulación genética en general, las posibilidades son inmensas y los riesgos, hasta ahora, pocos. Queda sin embargo mucho que aprender y modificar para perfeccionar la metodología que podría permitir solucionar, entre otras cosas, gran parte de los problemas nutricionales de la población.

REFERENCIAS

1. Ganz P. Human blood proteins from transgenic plants and animals. Abstract presented at the Joint Scientific Conference of the Canadian Society for Transfusion Medicine and the Canadian Red Cross Society. 1996.
2. Nuijens J, Pharming B. Production of recombinant human lactoferrin in milk of transgenic cows. *Pediatric Res.* 1997; 41: 739.
3. Dieryck W, Pagnier J, Poyart C, Marden M, Gruber V, Bournat P, Baudino S, Merot B. Human hemoglobin from transgenic tobacco. *Nature.* 1997; 386: 29-30.
4. Verch T, Yusibov V, Koprowsky H. Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J. Immunol Methods.* 1998; 220: 69-75.

5. Larrick J, Yu L, Chen J, Jaiswal S, Wycoff K. Production of antibodies in transgenic plants. *Res Immunol.* 1998;199: 603-608.
6. Haq T, Mason H, Clements J, Arntzen C. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science.* 1995; 268: 714-716.
7. Katz S. Future vaccines and a global perspective. *The Lancet.* 1997; 350: 1767-1770.
8. Briggs S. Plant genomics: more than food for thought. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1998; 95:1986-1988.
9. Burkhardt P, Beyer P, Wünn J, Klöti ., Armstrong G, Schledz M, von Lintig J, Potrykus I. Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *The Plant Journal.* 1997;11: 1071-1078.
10. Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, Toki S, Takaiwa F. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotech.* 1999; 17: 282-286.
11. Van Wuytswinkel O, Vansuyt G, Grignon N, Fourcroy P, Briat J. Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *The Plant Journal.* 1999;17: 93-97.
12. Falk B, Bruening G. Will transgenic crops generate new viruses and new diseases? *Science.* 1994; 263: 1395-1396.
13. Greene A, Allison R. *Science.* 1994; 263: 1423-1424.
14. Bahona E. News in brief (policy and people). *The Lancet.* 1999; 359: 9158.
15. Wal J, Pascal G. Benefits and limits of different approaches for assessing the allergenic potential of novel foods. *Eur J Allerg Clin, Immunol.* 1998; 53 (suppl): 98-101.
16. Nordlee J, Taylor S, Townsend J. Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *New Engl J Med* 1996; 334: 688-692.
17. Nestle M. Allergies to transgenic foods- questions of policy. *New Engl J Med* 1996; 334: 726-728.
18. Fuchs R, Astwood J. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Tech.* 1996; 50: 83-88.