

A BIOTECNOLOXÍA NO SÉCULO XX: ¿O INICIO DUNHA REVOLUCIÓN?

Tomás G. Villa*

Juan M. Lema Rodicio**

Universidade de Santiago
de Compostela

BIO + TECNOLOXÍA. UN PERCORRIDO HISTÓRICO

Acostúmase considerar a Noé, que descubriu por manipulación das uvas o proceso de fermentación alcohólica, como o precursor da utilización práctica polo home de procesos microbianos. Desde entón, a Humanidade utiliza un número de procesos 'naturais', especialmente orientados á produción de alimentos: pan, viño, cerveja...

Para isto tiveron que se desenvolver técnicas sinxelas de produción con deseños baseados na experiencia e a observación como, por exemplo, a fabricación de pan, que require cumprir unha serie de etapas, non evidentes a primeira vista. Noutros casos máis complexos, a posta a punto dalgúns sistemas utilizados tradicionalmente supuxo unhas boas doses de enxeño ("enxeñarizando procesos naturais") como por exemplo o proceso de obtención do *aceto balsámico* de Módena,

Italia, onde se dispón dunha batería de 'biorreactores' operando en semicontínuo, con tempos de residencia de ata ¡cen anos!

'Biotecnoloxía', termo acuñado nos anos vinte polo enxeñeiro húngaro Karl Ereky, é un paradigma da filosofía productiva que dominou a Humanidade no século que concluíu e que pola súa vez herdara, en termos de forza de desenvolvemento, da Revolución Industrial, isto é, "máis, mellor e máis barato". Desde logo non é previsible que, cando acuñou a palabra, estivese Ereky predicindo o futuro porque, entre outras cousas, naqueles anos descoñecíanse as endonucleasas de restricción, acababan de descubrirse os bacteriófagos por Twort e D'Herelle e a *Escherichia coli* (a bacteria hóspede da maioría das manipulacións xenéticas) era case aínda *Bacterium coli mutabile*.

Emporiso, o certo é que a fusión de ámbalas palabras, 'bio' e 'tecnoloxía', representou un enorme revulsivo no último cuarto do século XX, cando

* Catedrático de Microbioloxía.

** Catedrático de Enxeñería Química.

parecía que a sociedade andaba algo desleixada polo síndrome post conquista da lúa.

Non se podería comprende-lo rápido desenvolvemento da Biotecnoloxía sen mencionar algúns aspectos da ciencia e a tecnoloxía, dos seus conceptos, desvelos e metamorfoses —nunca mellor dito— seculares. O século XVI caracterizouse por un intento de romper con moldes que arrastraba, desde tempos ancestrais, a daquela incipiente Ciencia. Sobresae neste sentido Aureolus Philippus Theophastrus Bombastrus von Hemheim (1493-1541) —aínda que el mesmo se chamaba Paracelso, como desprezo á figura do galeno romano Celso— por ser unha fonte inesgotable de teorías, pero, iso si, con aspectos rabelaisianos. Como traballara en Basilea, estaba influenciado polo Humanismo que alí florecera mesmo antes da Reforma e que se traduciu en aplicación práctica das súas ideas, como foi a loita contra a enfermidade; así, por exemplo, utilizou o metal alquímico máis poderoso, o mercurio, para o tratamento da sífilis, servindo polo tanto de ponte de unión entre a vella alquimia e os novos conceptos de quimioterapia e iatroquímica, espírito que en definitiva herdou tamén a moderna Biotecnoloxía e sen dúbida ocupará unha área moi importante na centuria que principia.

O século XVIII caracterizouse por un racionalismo sen concesións e pensábase que todo o que existía se debía a estruturas matemáticas definidas. Non é de estrañar, logo, que as ciencias

precursoras da Biotecnoloxía, en definitiva empíricas, non tivesen a aceptación que os séculos XIX e XX lles recoñeceu. Debemos toma-la viaxe de cinco anos que comezou Charles Darwin o 27 de decembro de 1831 a bordo do *Beagle* e que o trouxo de regreso a Inglaterra “co convencemento de que as especies biolóxicas non eran inmutables”, como algo premonitorio que engarza co sentimento de evolución acelerada que a Biotecnoloxía —mediada pola manipulación xenética— pode estar conculcando ós seres vivos do planeta.

Como grandes precusores, sen dúbida, hai que menciona-las figuras de Lázaro Spallanzani (do que este ano se celebra o bicentenario da súa morte) e Louis Pasteur, a quen podería recoñecerse co título de primeiro biotecnólogo moderno. Lémbrese cómo refutou belamente as teorías sobre a xeración espontánea en 1860 e cómo chegaría á cima do seu poderío científico en 1863 cando resolveu, a instancias do emperador de Francia, os problemas xurridos nos procesos de elaboración do viño.

A principios do século XX ten lugar o desenvolvemento dunha industria incipiente baseada na acción de microorganismos para a produción de disolventes (etanol, acetona, butanol...), ácidos (cítrico, acético, etc.), completando así o campo que ata ese momento se limitara á área alimentaria (bebidas alcohólicas, panificación...). A eficacia dos procesos era baixa, pois non se comprendían nin os principios

microbiolóxicos nin se dispoñía de ferramentas ó xeito.

Tamén a comezos de século asoma xa unha preocupación pola conservación do medio, especialmente o acuoso, en contornos das grandes cidades, moitas das cales xa dispoñían de sistemas de saneamento para a recollida das súas augas residuais. É entón cando ten lugar a construción das primeiras plantas para o tratamento e recuperación destes vertidos mediante dispositivos moi elementais baseados na acción de asociacións microbianas desenvolvidas naturalmente.

Nos anos vinte, o extraordinario desenvolvemento da industria petroquímica, orientada non só á produción de carburantes senón tamén de infinidade de produtos da química dos hidrocarburos, incentivou o estudo de procesos térmicos e catalíticos que axiña desbancaron, pola súa maior eficacia, os sistemas de produción baseados na transformación microbiana.

De novo os produtos obtidos por procesos biolóxicos se limitan, basicamente, ó campo das industrias alimentarias. Este panorama manteríase inalterado por décadas debido ás baixas productividades, os problemas operacionais e as necesidades de asepsia.

Adicionalmente, dúas das posibles vantaxes comparativas dos procesos biolóxicos —menores requirimentos enerxéticos e impacto menos agresivo co medio natural— carecían, e así foi ata hai relativamente pouco

tempo, de importancia real, dado o baixo custo da enerxía e a pouca atención prestada á preservación do medio.

En pleno fragor da Segunda Guerra Mundial, Avery, MacLeod, e McCarthy decatábanse en 1944 de que o 'principio transformante' que Griffith describira a finais dos anos vinte para pneumococos non era outra cousa que segmentos dunha molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), inequivocamente a molécula-base da vida e, desde logo, pedra angular da Biotecnoloxía molecular. Sería nunha molécula estruturalmente tan sinxela coma esta onde residise a información xenética, concepto posteriormente confirmado por Hershey e Chase en 1952. Esta contribución, xunto coas de Max Delbrück e Salvador Luria sobre a bioloxía e a recombinación xenética en bacteriófagos, fertilizaron adecuadamente o campo científico para que en 1953 se propuxese desde a Universidade de Cambridge (Watson & Crick, Reino Unido) a estrutura dunha molécula de DNA, vixente basicamente aínda hoxe, utilizando unhas boas fotografías de difracción de raios X realizadas por Rosalind Franklin.

Tamén neste mesmo período, e debido sen dúbida ás necesidades masivas de antibióticos requiridas polos feridos da Segunda Guerra Mundial, ten lugar o desenvolvemento básico da enxeñaría de grandes fermentadores para a produción de fármacos. Para isto tiveráanse que aplicar conceptos sobre axitación, transferencia de osíxeno, e desenvolver

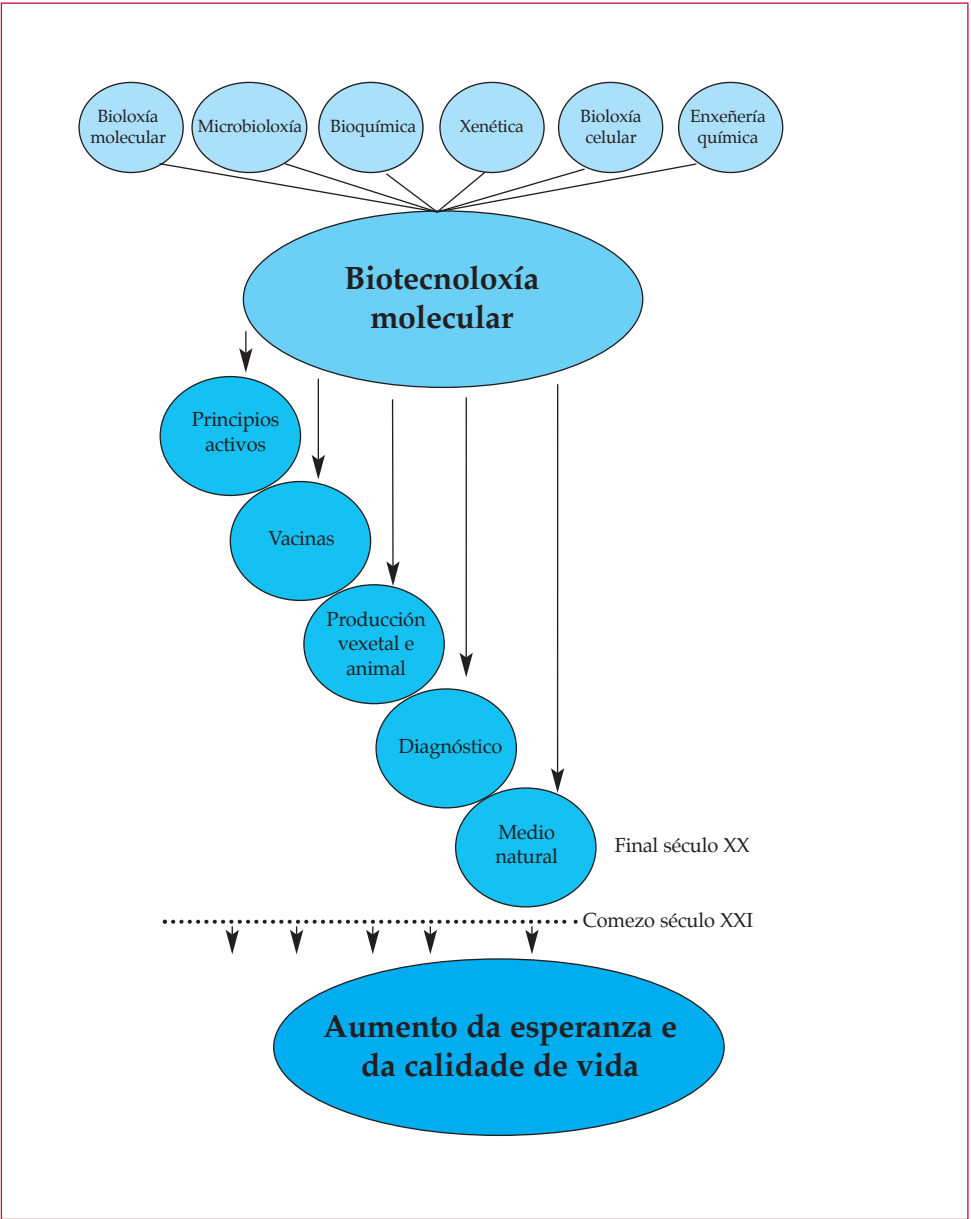


Figura 1. Xénese e contribucións da Bioteconoloxía no século XX.

dispositivos eficaces de esterilización ou procesos de concentración e purificación de produtos.

Á fin da década dos sesenta, era xa evidente que as bacterias contiñan un modelo de organización xénica (operón/regulón, fundamental no desenvolvemento da Biotecnoloxía molecular) e que como pouco posuía dous tipos de endonucleasas, das cales as chamadas de tipo II que recoñecen e cortan unha secuencia específica de pares de bases no DNA, estaban chamadas a causar unha auténtica revolución na Bioloxía molecular xa que permitiron infinidade de moléculas recombinantes de DNA. Din os historiadores da Biotecnoloxía molecular que cando Stanley Cohen en Stanford e Herbert Boyer en San Francisco idearon en 1973 o método básico para transplantar xenes dun organismo vivo a outro, e que estes se expresasen conferíndolle ó ser receptor características fenotípicas que antes non tiña, sabían perfectamente o que estaban facendo e que o primeiro, en particular, tiña unha visión da entón incipiente Biotecnoloxía (segundo se reacuñaría na reunión de Asilomar, California). Non sería xusto, por outra banda, se non se destacase o mérito do profesor Bolívar ó desenvolve-lo primeiro plásmido pequeno (pBR322) verdadeiramente efectivo para a clonación en bacterias Gram negativas.

A Biotecnoloxía, se ben é unha rama moi nova da ciencia, parte de áreas moi consolidadas. Calquera observador imparcial da actual situa-

ción en que encontra a Biotecnoloxía mundial neste cambio de século e milenio, decatárase da situación complexa que atravesamos debido, en parte, ó seu carácter multidisciplinar, o que fai que os profesionais procedan de eidos máis tradicionais como a Bioquímica, a Microbioloxía, a Enxeñería química, a Xenética, a Fisioloxía vexetal e animal, etc. (figura 1) e en parte tamén (aplicado para España en particular) debido á inexistencia dun marco administrativo que aglutine tódolos biotecnólogos para formaren unha 'casa común' desta aventura apaixonante que representa a Biotecnoloxía.

O impacto das 'novas tecnoloxías biolóxicas' (termo que podería competir co propio de Biotecnoloxía) manifestouse xa en moitos dos aspectos presentes na vida cotiá da Humanidade (saúde, ambiente, alimentación...). Deixando á parte a amplísima área da Medicina biotecnolóxica, que será obxecto dun tratamento diferenciado nesta publicación, a Biotecnoloxía permitiu o desenvolvemento de procesos eficaces e competitivos nas áreas que se indican:

- obtención de produtos bioactivos para o home e os animais,
- produción vexetal e biodiversidade,
- produción de enzimas, alimentos e bebidas por fermentación,
- agricultura e alimentación,
- carburantes e produtos químicos finos,

- tratamento e valorización de produtos de refugallos,
- recuperación de solos e acuíferos contaminados.

Na táboa 1 preséntanse algunhas previsións de mercado dalgúns pro-

ductos, pertencentes a diversos campos de aplicación. Nos seguintes apartados revisaranse varios destes grandes campos, como unha mostra da potencialidade económica, científica, tecnolóxica e social da Biotecnoloxía.

Composto ¹	Valor (USD x 10 ⁶)	Anos para o desenvolvemento
Aminoácidos (9)	1.703	5
Vitaminas (6)	668	10-15
Enzimas (11)	218	5
Hormonas esteroídicas (6)	368	10
Hormonas peptídicas (9)	268	5
Antíxenos virais (9)	300	5-10
Interferón (Alfa + Beta)	300	5
Antibióticos	4.240	10
Pesticidas	100	5-10
Metano	12.572	10
Etanol+Etilen e Propilenglicois	2.737	5-10
Aromáticos (aspirina + Fenol)	1.251	5-10
Inorgánicos (H ₂ e NH ₃)	2.681	15

Táboa 1. Predicción de mercado de produtos obtidos por Enxeñería xenética.

PRINCIPIOS BIOACTIVOS PARA A INDUSTRIA FARMACÉUTICA

O primeiro produto biotecnolóxico de alto poder farmacéutico foi a insulina humana clonada en sistemas bacterianos. Ese fármaco podería considerarse como un 'paradigma biotecnolóxico' e, en liñas xerais, serviu de modelo ós outros produtos farmacéuticos de índole biotecnolóxica.

Xa en 1921, Banting e Best (Toronto) comezaran o traballo sobre a posible relación entre unha hormona pancreática e a diabete inducida en cans, logo de lles extirpar este órgano e comprobar que un extracto proteico de páncreas mitigaba ou eliminaba transitoriamente os síntomas diabéticos. Tras dun intento fallido, o neno Leonard Thompson recibía o 1 de xaneiro de 1922 unha inxección de hormona semipurificada que melloraba sensiblemente

1 Os números entre parénteses representan o número de compostos xa existentes no momento da predicción.

te o seu estado diabético. Nos dous meses seguintes, o grupo de Toronto puido anunciar por fin o descubrimento da hormona pancreática que chamaron insulina. A finais dese ano, Banting e McLeod recibiron o premio Nobel de Medicina; o primeiro compartiuno con Best. Todo foi, case se pode dicir, espectacularmente rápido para a insulina, feito que se ten repetido arreo en todo o que atangue á chamada Biotecnoloxía farmacéutica. Así, en 1923, a empresa estadounidense Eli Lilly & Co empezaba a produci-la comercialmente e ó ano seguinte facíao Novo Nordisk desde Copenhaguen. Foi nesta empresa danesa onde se conseguiu, hai agora cincuenta anos, a insulina cristalina de acción retardada, que tiña como vanta-

xe a diminución do número de inxeccións diarias necesarias para regula-la glicemia.

Tendo en conta os cento corenta millóns de diabéticos existentes no mundo, non é de estrañar a alegría con que a sociedade celebrou a chegada das insulinas recombinantes humanas que representaba, entre outras cousas, a fonte inesgotable deste produto xénico humano. Con toda probabilidade o século XXI vai ver novas insulinas recombinantes, máis eficientes, de absorción lenta ou ben de acción moi rápida (por inversión da orde de codóns no xene), e mesmo se poderá ver reintroducido o xene nos enfermos para que outro órgano produza de novo a hormona.

Producto	Célula hospedadora ¹	Empresas produtoras	Ano	Indicación/aplicación
Insulina humana ²	B	Eli Lilly & Co., Novo Nordisk	1981-82	Diabete
Hormona de , crecemento humana (hGH)	B,M	Genentech, Bio-Tech General, Carbiotech, Eli Lilly/Hybritech	1985	Ananismo
Interferón alfa-2a sarcoma de Kaposi en SIDA	B	Hoffmann-La Roche AG	1986	Leucemia
Vacina anti-hepatite B	L	Merck & Co. Inc./Chiron Corp., SmithKiine Beecham pic	1986	Prevenção da hepatite B
Interferón alfa-2b	B	Schering-Plough AG	1986	Leucemia, verrugas xenitais, arcoma de Kaposi, hepatite non A non B
Activador tisular	M	Genentech Inc.	1987	Infarto crítico de miocardio,

1 Clave: B, bacterias; L, lévedos; M, células de diferentes mamíferos; H, fungos filamentosos.

2 Finalizado o século XX, a diabete afectaba a máis de 140 millóns de persoas no mundo, das cales o 10 % necesitan inxectarse insulina diariamente.

Producto	Célula hospedadora	Empresas productoras	Ano	Indicación/ aplicación
				embolia pulmonar do plasminóxeno
Somatotropina	B, M	Genzyme Transgenics Corp., Genentech Inc.	1987	Deficiencia de hGH en nenos 1
Vacina anti-influenza B	B	Praxis Biologics	1988	Influenza de tipo B
Eritropoyetina	M	Amgen Inc., Ortho Biotech, Genzyme Transgenic Corp.1	1989	Anemia crónica causada por insuficiencia renal
Interferón alfa-n3	B	Interferon Sciences	1989	Verrugas xenitais
Interferón gamma-1b	B, L, M	Genentech Inc.	1990	Enfermidade granulomatosa crónica
Factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)	B	Amgen Inc.	1991	Neutropenia causada por quimioterapia
Factor estimulante de colonias de granulocitos e macrófagos (GM-CSF)	L	Immunex, Hoechst AG-Roussel Uclaf	1991	Infección relacionada co transplante autólogo de medula ósea
Interleuquina-2	B	Cetus Corp., Interferon Sciences	1992	Terapia para o cancro, desordes sanguíneas e de medula ósea
(IL-2)		Synergen		
Factor VIII (da coagulación sanguínea)	M	Varias empresas	1992	Hemofilia A
DNAsa	M	Genentech Inc.	1993	Fibrose quística
Interferón beta-1b (Betaferon)	B	Schering AG Pliarma	1993	Esclerose múltiple
Beta-glicocerebrosidasa	M	Genzyme Transgenics Corp.	1994	Enfermidade de Gaucher

Tabla 2. Productos farmacéuticos recombinantes no mercado.

Seguindo o ronsel deixado pola insulina humana recombinante, tivo lugar un crecemento espectacular do catálogo de produtos farmacéuticos comercializados, como se recolle na táboa 2, tendencia que debería proseguir no século XXI, prevéndose que nos primeiros anos se logren uns cento corenta produtos recombinantes sometidos ás máis estrictas regulacións.

Como se pode apreciar na táboa 3, os sistemas de expresión que se desenvolveron na última vintena dos anos do século XX inclúen bacterias (dominado por *E. coli*, seguido cada vez máis de preto por outras que claramente posúen un status GRAS —*Generally Recognized As Safe*— como é o caso de *Bacillus subtilis* e en menor grao aínda *Corynebacterium glutamicum*/*Brevibacterium lactofermentum*), lévedos (*S. cerevisiae*, *K. lactis*, *P. pastoris* e *H. polymorpha*) e fungos filamentosos (*Phycomyces*, *Aspergillus*). Durante a década de 1960 e principios da seguinte, traballouse activamente con dous lévedos metilotróficos: *Pichia pastoris* e *Hansenula polymorpha* (sin. *Pichia polymorpha*) como microorganismos de fermentación robustos (especialmente a primeira)

destinados a transformalos residuos industriais das petroleiras en proteína unicelular. Logo dunha crise duns quince anos, ámbalas especies máis *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* e máis recentemente *Yarrowia lipolytica* (sin. *Candida lipolytica*) foron configurándose como alternativas (ás veces moi superiores) á todopoderosa *S. cerevisiae* no apartado de Biotecnoloxía das fermentacións para a produción de fármacos recombinantes de calidade (véxanse as táboas 2 e 3).

Unha das principais vantaxes que presentan os lévedos en relación con produtos de xenos humanos ou implicados directamente na terapia humana, é a súa capacidade de glicosilación dos produtos xénicos, ás veces imitando as glicosilacións realizadas por células de mamífero como é o caso de *S. pombe*. A xeito de exemplo, a táboa 4 resume os niveis de produtividade en fermentadores para algúns xenos humanos expresados en lévedos. No século entrante desenvolveranse sistemas, hoxe incipientes, de arqueobacterias (*Halobacterium* e *Haloarcula*) que son capaces de glicosilar dun modo moi similar ós sistemas eucarióticos.

Lévedo hospedador	Producto	Ano
<i>Pichia pastoris</i>	Antíxeno de superficie do virus da hepatitis B	1987
	Estreptoquinasa	1989
	Factor de necrose tumoral humano	1989
	Lisozima bovina	1989
	Aprotinina	1991
	Fragmento C da toxina do tétanos	1991
	gp 120 do HIV	1991

Lévedo hospedador	Producto	Ano
	Receptor de IgE humano	1992
	Transferrina	1995
	Inhibidor da proteínasa 6 humano	1995
	Alérxenos herbáceos	1996
	Diversas amilasas	1996
	Opsina bovina	1997
	Lacasa	1997
	Alérxeno Bla g4	1998
	Factor humano tisular	1998
	Lipasa biliar humana	1998
	Patatinas	1998
	Gonadotropina coriónica humana e activa	1999
	Proteína atrapaolores da abella	1999
<i>Hansenula polymorpha</i>	Antíxeno de superficie mediano do virus da hepatitis B	1989
	Seroalbúmina humana	1990
	Antíxenos de superficie S e L do virus da hepatitis B	1991
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Activador tisular do plasminóxeno	1990
	Interleuquina-I b humana	1991
	Seroalbúmina humana	1991
	Antíxeno de superficie do virus da hepatitis B	1992
	Lactoglobulina beta ovina	1996
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Antitrombina III humana	1987
	Factor XIIIa humano	1989
	Factor estimulador de colonias de macrófagos (truncado)	1994
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Interferón porcino	1990
	Factor de coagulación XIIIa	1992
	b-Glicuronidasa	1993
	Antíxeno de superficie hepatitis B	1994
	Caseín quinasa II	1997

Táboa 3. Produtos terapéuticos (ou relacionados) recombinantes expresados en lévedos diferentes a *Saccharomyces cerevisiae*

Producto	Lévedo hospedador	Promotor	Productividade	Ano
Seroalbúmina humana	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CUPI	0,6 mg/L	1986
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	UYPI	35-45 mg/L	1990
		PGK/LAC4	300-400 mg/L	1991
Monómero de AgsHB	<i>S. cerevisiae</i>	PGK1	1-2 mg / 100 mg de proteína	1982
	<i>Hansenula polymorpha</i>	MOX1	2,7-3,6 mg / 100 mg de proteína	1989
		AOX1	2,3 mg / 100 mg de proteína	1987

Producto	Lévedo hospedador	Promotor	Productividade	Ano
Seroalbúmina humana	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CUPI	0,6 mg/L	1986
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	UYPI	35-45 mg/L	1990
		PGK/LAC4	300-400 mg/L	1991
Monómero de A _g sHB	<i>S. cerevisiae</i>	PGK1	1-2 mg/100 mg de proteína	1982
	<i>Hansenula polymorpha</i>	MOX1	2,7-3,6 mg/100 mg de proteína	1989
	<i>Pichia pastoris</i>	AOX1	2,3 mg/100 mg de proteína	1987
Interleuquina-1 β humana	<i>S. cerevisiae</i> <i>K. lactis</i>	PGK PH05	1-2 mg/L 80 mg/L	1987 1991
Interferón alfa humano	<i>S. cerevisiae</i>	PGK1	5 mg/L	1982
IGF-1	<i>S. cerevisiae</i>	ADH2/GAPDH	25 mg/L	1989
Lactoferrina humana	<i>S. cerevisiae</i>	Chelatin	1,5-2 mg/L	1993
Lactoglobulina beta ovina	<i>S. cerevisiae</i>	PGK	40-50 mg/L	1996
	<i>K. lactis</i>	PGK	40-50 mg/L	1996
Hirudina	<i>S. cerevisiae</i>	GAL10	59 mg/L	1995
Fibrinóxeno	<i>S. cerevisiae</i>	GAL1	30 mg/L	1995

Táboa 4. Productividade para determinados compostos terapéuticos, recombinantes, sintetizados en distintos lévedos.

Unha área de enorme importancia económica e social que previsiblemente se acrecentará durante o primeiro cuarto do século XXI é o desenvolvemento de vacinas para previlas enfermidades infecciosas que provocan dezasete dos cincuenta millóns de falecementos que ocorren cada ano no mundo. Delas, as dez máis preocupantes, pola súa incidencia, son as infeccións respiratorias agudas, a tuberculose, as enfermidades diarréicas, a malaria, a hepatite B, a SIDA, o sarampelo, o tétano neonatal, a tose ferina, a lombriga intestinal e a anquilostomiasis.

Segundo a Organización Mundial da Saúde (OMS), cada ano morren des-

tas enfermidades infecciosas case nove millóns de nenos menores de catorce anos e polo menos tres millóns salvaríanse se as vacinas xa existentes se utilizasen máis amplamente. Os demais necesitarían doutras vacinas aínda inexistentes para sobrevivir. Resulta dramático comprobar que nos postremos tempos do século XX falecían aínda setecentos cincuenta mil nenos ó ano debido a unha enfermidade tan clásica como o sarampelo.

A elaboración de vacinas está impulsada por, como pouco, tres factores: I) a necesidade de salvar vidas; II) o descubrimento científico e a innovación tecnolóxica propia da nosa sociedade; e III) o concepto de que os

microorganismos causantes de enfermidades son tamén seres xenéticos e, como tales, suxeitos ás mesmas forzas evolutivas có home. Como ben sinalou Joshua Lederberg, este último aspecto delimita unha vía de dous sentidos e han vixiarse constantemente os patóxenos emerxentes, as cepas resistentes, etc.

A produción industrial de produtos de alto valor engadido representou, baixo o punto de vista tecnolóxico, un importante reto no campo de deseño de dispositivos de fermentación. Así, a necesidade de prove-los cultivos de altas velocidades de aireación propiciou o desenvolvemento de novos sistemas tanto para a subministración de aire (difusores, membranas), como para a homoxeneización do equipo. Especialmente delicados son os equipos destinados a cultivos de células animais, cun elevado cociente respiratorio e que, ó tempo, presentan unha elevada fragilidade. Entre os sistemas que se mostraron máis eficaces destacan os fermentadores *air lift*, os equipos con perfusores e os encaixes fermentadores/membranas, con diferentes tecnoloxías e campos de aplicación.

Os sistemas de monitorización e control do proceso experimentaron un extraordinario avance nos últimos anos, tanto no equipamento coma nas estratexias de control. Hoxe en día non é infrecuente a instalación de equipos relativamente sofisticados, como espectrómetros de masas conectados *on line* ó sistema de fermentación. A análise detallada do caudal e, sobre

todo, da composición dos gases desprendidos, permiten precisar polo miúdo o estado metabólico do cultivo e, deste xeito, caracterizar con exactitude a fase de fermentación. Con isto lógrase non só maximiza-la produción senón, ademais, evitar situacións non desexadas como a derivación do fluxo metabólico a rutas diferentes.

Introduciuse con éxito, ademais, o concepto de control do proceso baseado en sistemas expertos (*expert systems*), moitas veces combinado co uso de 'lóxica borrosa' (*fuzzy logic*) que permitiu efectuar un adecuado control sen necesidade dun modelo matemático preciso, que en moitas ocasións resulta complexo ou inviable formular (figura 1).



O algodón de tubo de ensaio é un interesante resultado biotecnolóxico. Cada célula convértese nunha fibra de algodón e o proceso é máis rápido có cultivo tradicional.

Mención á parte merece o desenvolvemento dunha serie de 'biosensores' capaces de detectar tanto parámetros de tipo xenérico (ATP...) como produtos específicos (glicosa, lactosa, ácidos, proteínas...), o cal permitiu un eficaz proceso de monitorización *on line*. O desenvolvemento máis espectacular consiste nos biosensores producidos con tecnoloxía *chip* que permitirán unha moi complexa instrumentación incluso a baixo prezo, nos puntos máis sensibles do equipo.

Tamén houbo que desenvolver técnicas de concentración e purificación (*dowstream*) sofisticadas para lograr, a un tempo, a recuperación do produto desexado e a eliminación de compoñentes indesexados, bioloxicamente inactivos. É destacable que moitos dos produtos obtidos se encontran no caldo de cultivo a uns niveis extremadamente baixos, se ben o seu elevado valor fai interesante a súa recuperación (ver táboa 3). Entre as diferentes

metodoloxías máis innovadoras destacan as técnicas cromatográficas (de intercambio iónico, de afinidade, por exemplo), xa a escala industrial, e as técnicas de concentración-separación por membranas.

A Biotecnoloxía farmacéutica estivo desde o seu inicio sometida á dobre vertente de tratar de obter produtos bioactivos que contribúan a paliar a dor e a enfermidade pero, ó tempo, de desenvolver procesos que abaraten custos de produción e xeren beneficios ás empresas correspondentes (ha considerarse que, á marxe do apoio prestado por entes gobernamentais a través de plans específicos, a investigación en Biotecnoloxía foi financiada, especialmente, por compañías farmacéuticas. Neste sentido, as táboas 5 e 6 resumen as fusións máis recentes entre empresas e as líderes por cotas de mercado das empresas a finais do século XX.

Comprador	Adquisición	Data	Tamaño (millóns de USD)
American Home	Monsanto	6/98	34400
Sandoz	Ciba-Geigy	3/96	30100
Glaxo Holdings	Weicome	1/95	14300
Bristol-Myers	Sqtjibb	7/89	12100
Roche Holding	Corange	5/97	10200
American Home Products	American Cyanamid	8/94	9600
Hoechst	Marion Merrell Dow	2/95	7800
Accionistas	Zeneca	6/92	7000
Upjohn	Pharmacia	8/95	7000

Táboa 5. Algunhas das grandes fusións de empresas biotecnolóxicas.

	Consortios	Mercado (%)
1	Glaxo-Wellcome	4,70
2	Novartis	4,40
3	Merck + Co.	3,50
4	Hoechst Marion Roussel	3,50
5	Bristol-Myers-Squibb	3,10
6	American Home	3,00
7	Johnson & Johnson	2,90
8	Pfizer	2,90
9	Hoffmann-La Roche	2,60
10	SmithKline-Beecham	2,50
Total (de vendas do sector farmacéutico)		33,10

Táboa 6. As dez empresas farmacéuticas líderes a finais do século XX.

A BIOTECNOLOXÍA E A PROTECCIÓN DO MEDIO

O uso de microorganismos para a eliminación de materia orgánica en augas residuais domésticas lévase aplicando durante moitos anos, primeiro nas chamadas 'fosas sépticas' e logo en unidades mellor controladas. A 'lagoaxe estendida' é tamén unha técnica tradicional que, aínda con melloras de tipo operacional e de deseño, segue sendo útil.

Sen embargo, o desenvolvemento espectacular dos procesos industriais, especialmente no século XX, xerou a produción de residuos tanto en fase líquida como gasosa e sólida. Nestes efluentes atópanse adoito materiais xenobióticos que, en numerosas oca-

sións, resultan dificilmente biodegradables (ou biodisponibles), polo que se acumulan en solos, sedimentos e, por veces, en seres vivos. Por outra parte, un número considerable destes produtos resultan tóxicos para os organismos vivos, polo que se requiriu a aplicación de novas técnicas e procesos tanto para o tratamento de augas como de solos e, en menor medida, de gases contaminados.

Un dos procesos con máis éxito, hoxe empregado masivamente na industria, é o de eliminación de augas residuais; palíase así o preocupante problema da eutrofización das augas. O proceso baséase na acción combinada de microorganismos autótrofos, que oxidan a materia amoniacal a nitrato (proceso de *nitrificación*) e heterótrofos, que utilizando materia orgánica carbonada reducen o nitrato formato a nitróxeno atmosférico (proceso de *desnitrificación*). Co fin de mellora-la eficacia desenvóléronse equipos para acadar unha máis rápida transferencia de materia (osíxeno) e procedementos para lograr unha maior densidade celular no reactor (sistemas de inmovilización bacteriana ou equipos de membrana).

A eliminación de fósforo —segundo macronutriente de importancia— conséguese mediante un proceso no que se alternan etapas de liberación de fosfato con etapas de acumulación intracelular, mediante o establecemento de ciclos anóxicos/aerobios no equipo.

Sen dúbida, a eliminación biolóxica de materiais tóxicos en augas residuais foi un campo no que se lograron resultados notables. A combinación de técnicas de enriquecemento en determinados grupos tróficos coa aplicación en equipos especiais (reactores de membrana, sistemas de elevada densidade celular con microorganismos inmobilizados...), fixo posible a eliminación de compostos xenobióticos considerados, ata hai pouco, como materiais recalcitrantes.

O abandono de espazos industriais e a súa transformación en zonas residenciais ou de lecer requiriu a recuperación de solos e acuíferos. Tamén os derramos de petróleo no mar, especialmente no caso de accidentes de superpetroleiros (na mente de todos están os casos do *Torrey Canyon*, *Exxon Valdez* e, máis próximo, o do *Aegean Sea*) incentivaron o estudo deste problema. As técnicas de biorremediación, baseadas na acción de microorganismos 'naturais' ou 'especializados', tiveron, por este motivo, un enorme desenvolvemento. En ocasións efectúase simplemente unha 'fertilización' do terreo, engadindo nutrientes para permiti-lo nacemento de microorganismos 'naturais', ás veces complementando o proceso coa adición de materiais que aumenten a 'biodisponibilidade' do contaminante. Noutras faise unha sementeira de microorganismos previamente seleccionados para realiza-la metabolización especializada destes contaminantes específicos.

A aplicación de microorganismos recombinantes no medio natural está, aínda, nunha fase moi previa. As regulacións legais á liberación ó medio de microorganismos manipulados xeneticamente son moi restrictivas pois aínda non se coñece con precisión o impacto que exercerían fóra do seu ámbito de aplicación inmediato. Pénsese, por exemplo, qué sucedería de se producir un escape de microorganismos resistentes (ou mesmo que metabolicen) antibióticos... Un campo de actuación de grande interese consiste en introducir nestes microorganismos unha sonda que, en ausencia do material contaminante, produza a lise celular, tras disparar un mecanismo auto-destrutivo. Hai ben pouco permitiuse a liberación controlada nun terreo contaminado de microorganismos *enxeñerados* segundo estas ideas; a avaliación dos seus resultados está aínda pendente.

Tamén se prestou moita atención á degradación microbiana de residuos industriais aparentemente non-biodegradables. Un exemplo significativo é a aplicación á mineralización de TNT, almacenado por toneladas en recintos militares ou a biodegradación de isómeros de lindano (hexaclorociclohexano), un insecticida empregado profusamente ata os anos sesenta; a súa produción ía inexorablemente asociada á dos seus isómeros, menos activos, que se vertían libremente en solos e vertedoiros.

Por último, cabe destaca-lo esforzo dedicado ó tratamento de

gases contaminados, especialmente con materiais xofrados (H_2S , mercaptanos) ou compostos orgánicos volátiles (VOC's). Para iso estanse a desenvolver biofiltros, bioabsorbedores ou biolavadores con diferentes configuracións e modos de actuación distintos e excelentes perspectivas de utilidade práctica.

O TRIÁNGULO BIOTECNOLOXÍA, PRODUCCIÓN VEXETAL E BIODIVERSIDADE

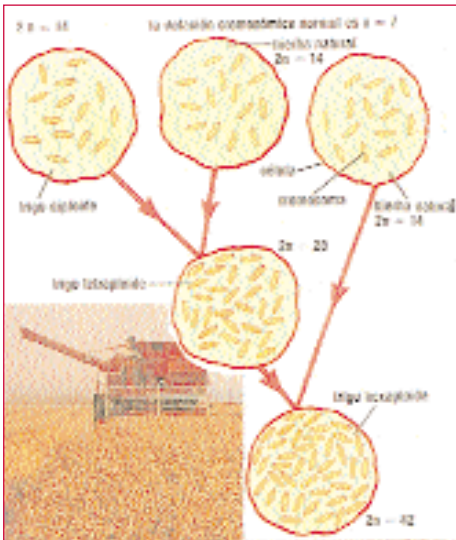
O futuro da Biotecnoloxía no século que empeza estará previsiblemente ligado ós seres fotosintéticos (fundamentalmente plantas e en menor medida algas microscópicas). Deséxase que as sementeiras produzan máis, que sexan máis resistentes a enfermidades, que non necesiten (ou necesiten un mínimo) de pesticidas, que consuman pouca auga, e ata que a manipulación produza froitos non só máis grandes, coma na actualidade, senón tamén máis saborosos.

É evidente que a medida que se foi poboando o planeta aumentaron as necesidades de alimentos, os cales, conforme se incrementaba o grao de benestar, tiñan que ser mellores en calidade alimentaria, presentación e hixiene. Isto conseguíuse en parte nas últimas duascenas xeracións humanas (aproximadamente equivalente a uns catro mil anos da vida do home) mediante a manipulación xenética que chamaremos 'convencional' e permitiu a obtención dunha enorme variedade

de híbridos. O século XIX e os dous primeiros tercios do XX son sen dúbida típicos neste aspecto. Púidose así alimentala Humanidade, agás en certas grandes fames debidas especialmente a unha imperdoable falta de previsión e, sobre todo, de sensibilidade na repartición dos excedentes alimentarios do chamado 'primeiro mundo'.

Este proceso, sen embargo, levou consigo unha drástica diminución do número de plantas utilizadas para a alimentación (o mesmo se podería dicir, incluso en maior grao de redución, para o caso dos animais utilizados na alimentación humana), o que xerou, ó principio de vagar e logo de xeito máis evidente, unha notable diminución da biodiversidade. A Humanidade, ó longo de toda a súa historia, utilizou unhas tres mil plantas das oitenta mil estimadas comestibles que aínda quedan no planeta na actualidade. Destas tres mil, o home cultiva a grande escala só cento cincuenta e, destas, vintenove proporcionan o noventa por cento dos alimentos: 7 cereais (arroz, trigo, millo, sorgo, cebada, millo miúdo e tritcale, que proporcionan o 52 % da enerxía total); 3 tubérculos (mandioca, pataca e batata); 8 leguminosas (cacahuets, chícharos, garavanzos, soia, fabas, feixóns, feixóns varados e chícharos de Angola); 7 oleaxinosas; 2 azucreiras (cana e remolacha) e 2 froiteiras (bananeira e coco).

O noventa e nove por cento das necesidades alimenticias dos humanos procede do medio terrestre e só o un por cento do medio acuícola (incluída a



Moitas plantas teñen a rara propiedade de duplicar ou triplicar os seus cromosomas (poliploidía). A colleita do trigo moderno, por exemplo, é moito máis doada cá tradicional.

pesca en mar aberto). A tendencia, segundo os observadores da UNESCO, é que esta cifra permaneza igual ou mesmo aumente cara ó medio terrestre no século que comeza, por canto a produtividade dunha hectárea de terra é moito máis alta cá parte equivalente de medio acuático. Xa que logo, ¿cara a onde debe ser canalizado o esforzo investigador de índole biotecnolóxica? Posiblemente cara ó medio terrestre, xa que é alí onde maioritariamente se atopan os recursos alimentarios máis estendidos. Por outro lado, non sería desatinado tratar de aunar esforzos públicos de investimento transnacional para tentar aumentar ese baixo un por cento da produción acuícola.

A conclusión é inevitable: o home é (foino sempre) un manipulador primario de seres vivos e, ó facelo no seu proveito, induce a perda da biodiversidade do planeta, xa que favorece a selección dunhas poucas especies ou razas que necesita. Existe unha serie de exemplos xa clásicos que inciden nesta idea. Así, entre 1945 e 1986, Grecia abandona o noventa e cinco por cento de variedades nativas de trigo e moitas delas pérdense; entre 1970 e 1973 España perde sete de dez cultivos primitivos de melóns; na actualidade, a República Sudafricana perdeu o noventa e nove por cento de variedades nativas de sorgo e Francia só conta doce variedades de maceira fronte ás dúas mil que tiña no século XIX.

Por outra parte, esta manipulación conduciu a un aumento de enfermidades por dexeneración xenética dos cultivos e, concomitantemente, un aumento espectacular do consumo de produtos fitosanitarios. Os exemplos clásicos inclúen a acción de *Phytophthora infestans* que destruíu a metade da produción de pataca en Irlanda en 1846 (cunha extraordinaria incidencia social, como foron as emigracións masivas do Vello ó Novo Mundo) e houbo que recorrer a cruzamentos con reserva xenética silvestre (*Solanum demissum*). O mesmo podería dicirse para filoxera, que en 1860 arrasou os viñedos europeos ou a destrución de millo sudista por *Helmintosporium maydis*. Tense recorrido sistematicamente na historia a retrocruzamentos co fondo xenético silvestre para recupera-la resistencia a

pragas e factores ambientais, mesmo a sabendas do coñecido axioma de que os híbridos acabarían por desenvolver os seus propios parasitos/patóxenos específicos e que outra volta haberá que recorrer ó retrocruzamento nun ciclo permanente e repetitivo.

Nos quince ou vinte últimos anos do século XX, a Biotecnoloxía conseguiu introducir infinidade de características dominantes en cultivos de plantas importantes na alimentación humana que as fan resistentes a unha gran variedade de factores ambientais adversos e que van desde a resistencia a patóxenos tales como virus, viroides, bacterias e fungos filamentosos ata resistencia á auga de rega rica en sal ou resistencia á maduración rápida de certos froitos. Esta serie de movementos de manipulación xenética dos xenomios principais das plantas (tamén coñecida como *transxénese*) foi motivada por dous factores clave: o esgotamento paulatino dos recursos e do potencial da xenética convencional e a curiosidade inherente ó científico. Con ser isto importante, a achega da Biotecnoloxía no capítulo de biodiversidade está aínda por vir e desenvolverase neste século que comeza. Debido a que as técnicas de Bioloxía molecular que utiliza son moi poderosas, é labor relativamente simple protexe-la biodiversidade de calquera ser vivo (entendéndose como un todo, tal e como ocorre na natureza); pero tamén pode entenderse por biodiversidade a preservación da característica ou conxunto de características máis importantes da especie

de que se trate e traspasar estas a outra receptora. Deste xeito garantiríase que non se perda de vez o positivo que a natureza seleccionou mediante evolución natural durante millóns de anos. Tal práctica, sempre que se poida, debe realizarse mediante 'paratransxénese', é dicir, clonación sobre xenomios secundarios (mitocondrias ou cloroplastos) das células de animais ou plantas, respectivamente, para distorsionar o menos posible a marcha evolutiva propia da especie receptora.

	Actual ¹	Potencial ²
Cana de azucre	70-90	150-200
Mandioca	60	100
Tomate	70-150	150-200
Aceite de palma	2-5	10-12
Cacahuete	1,6	4,0
Aceite de ricino	0,6	2,5
Coníferas temperadas	6-8	20-30
Coníferas tropicais	12-20	40-60
Fronzosas tropicais	10-20	40-100

Táboa 7. Producións actuais e potenciais dalgunhas plantas cultivadas e especies forestais (Tm/Ha).

1 Esta estimación enténdese só para cultivos realizados por procedementos clásicos, incluíndo a mellora xenética.

2 As producións potenciais teñen en conta: a) aumento de reforestación, si pertinente; b) mellora xenética por manipulación de células xerminais; c) desenvolvemento de plásmidos centroméricos e plantas transxénicas (non inclúe, sen embargo, o desenvolvemento que poida conseguirse segundo as estimacións con plantas paratransxénicas); d) optimización de procesos; e) educación laboral do traballador; f) política empresarial.

O outro factor importante que acompaña a achega da Biotecnoloxía á produción vexetal, mediante accións ABP (accións biotecnolóxicas posibles) ten que ver evidentemente co aumento da produción pura da biomasa vexetal. A xeito de exemplo amósanse na táboa 7 as estimacións realizadas por expertos da ONU para o século entrante nalgúns cultivos mediante ABP.

Un aspecto relativamente pouco desenvolvido pola Biotecnoloxía para o mundo de produción vexetal relacionado coa Bioenerxética é a obtención de novas estirpes ou variedades con maior rendemento na formación de biomasa. Os factores que inflúen no rendemento da conversión enerxética da fotosíntese de plantas superiores son os seguintes: da enerxía solar incidente, dado que as plantas non utilizan a zona IR (43 %) e a reflexión de enerxía por follaxe e transmisión ó chan (34,4 %) e tendo en conta a redución intrínseca debida ó ciclo de Calvin (Rubisco) (9,8 %) e á corrección respiratoria (6,5 %), só se aproveita entre un seis e un sete por cento da enerxía solar incidente. Ademais, se se ten en conta o rendemento real interanual, esta cifra resulta aínda inferior (pode baixar ata un 2,5 % para a cana de azucre). Un simple cálculo indica que serían necesarias cincuenta hectáreas de bosque para acumular a mesma enerxía que acumularía unha hectárea de espellos. As ABP a longo prazo incluírían: *a*) o incremento da zona do espectro electromagnético de captación enerxética para as plantas verdes e *b*) o incremen-

to no rendemento do Ciclo de Calvin, ben aumentando o número de moléculas de ribulosa 1,5-di-fosfato-carboxilasa (Rubisco), aumentando as reservas intracelulares de ribulosa 1,5-di-fosfato, aumentando o número de cloroplastos por célula, etc.

As ABP máis evidentes —moitas das cales xa foron desenvolvidas por transxénese— derivan de eliminar as perdas que sobre os cultivos xeran enfermidades causadas por microorganismos (incluíndo as provocadas por fungos fitopatóxenos) e por insectos; só controlando estas perdas aumentaría considerablemente o rendemento medio das plantas cultivadas.

A parte negativa é que as plantas de alto rendemento poden causar efectos negativos no medio natural como son lixivación de fertilizantes e deterioración da calidade das augas, aumento do consumo de biocidas non degradables, diminución da pesca, aumento da construción de silos e outros almacéns e baixada das hectáreas dedicadas ó cultivo do algodón e de leguminosas. En países como a India comprobouse que este tipo de cultivos con variedades de moi alto rendemento incidiu negativamente tamén en aspectos socioeconómicos como son o aumento drástico dos créditos bancarios, a autarquía alimenticia, o aumento do traballo asalariado e a diminución de propietarios de terra cultivable e o aumento do prezo da terra, entre outros.

A mediados dos anos oitenta do século XX, calculábase nunha media de

cinco a dez anos anos o tempo necesario para conseguir aumentar notablemente mediante transxénese (sen incluír a paratransxénese) a produción dos compostos listados. En moitos casos (especialmente naqueles en que o produto é codificado por varios xenes que definen unha ruta bioquímica complexa, caso da maioría dos antibióticos), a previsión foi lamentablemente curta e nos casos nos que se logrou a clonación da ruta completa, a produción non era significativamente superior á conseguida coas estirpes que os xenéticos clásicos desenvolveran ó longo de miles de mutacións e selección posterior.

Rematando o século XX, en concreto en 1995, realizouse un interesante balance (táboa 8) sobre a incidencia que a Biotecnoloxía molecular de plantas cultivadas tivera na economía daqueles países en vías de desenvolvemento que, ou ben importaran as novas plantas transxénicas ou ben realizaran un esforzo orzamentario adicional para desenvolve-las súas propias.

A. Por técnicas de cultivo celular e de tecidos		
Ata 1995	20,9	Café (8), bananas (16), arroz (6), goma (5), tabaco (2), vainilla (2), patacas (1)
1995-2000	21,2	Cana de azucre / remolacha azucreira (16), cacao (15), té (4), soia (3), aceite de palma (3), trigo (3), millo (1), aceite de xirasol (1)
Século XXI	3,4	Algodón (15), coco (10)

B. Por plantas transxénicas		
Ata 1995	6,4	Goma (5), tabaco (2), millo (1), patacas (1)
1995-2000	17,5	Remolacha azucreira (16), bananas (16), algodón (15), arroz (6), soia (3), xirasol (1)
Século XXI	21,7	Café (27), cana de azucre (16), cacao (15), coco (10), té (4), aceite de palma (3), trigo e fariña (3)
C. Por plantas paratransxénicas		
Non existen predicións		

Táboa 8. Incidencia da Biotecnoloxía clásica e molecular nas economías de países en vías de desenvolvemento a finais do século XX e previsións para a primeira década do XXI (medido como exportacións x 10⁵ millóns de USD)¹.

¹ Os números entre parénteses aluden ó número de países incluídos no estudo.

CONCLUSIÓN

Con estas notas pretendemos reflexionar sobre os logros e potencialidades da Biotecnoloxía en diferentes campos de aplicación. A pesar dos seus poucos anos, a Biotecnoloxía contribuíu á resolución de problemas importantes para a Humanidade, dando respostas eficaces en campos tan variados como a saúde, a alimentación e o medio natural.

As contribucións achegadas pola Biotecnoloxía son, ata o de agora, de enorme relevancia, se ben quizais nos encontremos simplemente no principio dunha verdadeira revolución que

permitirá cambia-los sistemas produtivos e que afectará decisivamente a calidade de vida dos cidadáns.

REFERENCIAS

- Bolívar, F., e outros, *Construction and characterization of New Cloning Vehicles. II*, Multipurpose System. Gene II, 1997, 95-113.
- Cohen, J., e outros, *Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids in vitro* PNAS 70, 1973, 3240-3244.
- Cohen, J., "The genomics Gamble", *Science*, 275, 1997, 767-776.
- Correa, C. M., *Innovación y producción en América Latina*, Bos Aires, Arxentina, Colección CEA-CBC, 1996.
- "Private Biopharmaceutical Capacity in Developing Countries", *Biotechnology and Development Monitor*, 9, 1999, 7-8.
- Glick, B. R., e J. P. Pasternak, *Molecular Biotechnology. Principles & Applications of Recombinant DNA*, American Society for Microbiology, EUA, ASM Press, 1994.
- Sasson, A., *Biotechnologies in Developing Countries: Present and Future*, volume 1, Regional and National Survey, France, ONU Publishing, 1993.
- *Bioteecnoloxías aplicadas a la producción de fármacos y vacunas*, Cuba, Elfos Scientiae, 1998.
- Tombs, M. P., *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, Reino Unido, Intercept Ltd., 1997.
- Villa, T. G., e J. Abalde, *Profiles on Biotechnology*, Santiago de Compostela, Servicio de Publicacións da Universidade de Santiago de Compostela, 1992.

