

IICA-CIDIA



**IICA**



GUIAS PARA LA LIBERACION  
EN EL MEDIO AMBIENTE  
DE ORGANISMOS MODIFICADOS  
GENETICAMENTE

IICA  
PM-A1/  
SC-91-  
09

ORGANIZACION DE LOS ESTADOS AMERICANOS  
ORGANISMO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS

PROGRAMA II:  
GENERACION Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA





# GUIAS PARA LA LIBERACION EN EL MEDIO AMBIENTE DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE

ORGANIZACION DE LOS ESTADOS AMERICANOS  
ORGANISMO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS

PROGRAMA II:  
GENERACION Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA

BV 15372

IICA  
PM-A1/SC  
no. 91-09

00000718

SERIE PUBLICACIONES  
MISCELANEAS

ISSN-0534-5391  
A1/SC-91-09

Mayo, 1991  
San José, Costa Rica

"Las ideas y planteamientos contenidos en los artículos firmados son propios del autor y no representan necesariamente el criterio del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura".

PROYECTO INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA/  
AGENCIA CANADIENSE DE DESARROLLO INTERNACIONAL

El objetivo general del Proyecto IICA/ACDI es fortalecer el desarrollo conceptual y operativo de los cinco Programas del IICA, en las áreas temáticas más importantes de su Plan de Mediano Plazo y en el contexto del PLANALC. A través de los Programas, el Proyecto IICA/ACDI, con la colaboración de Agriculture Canada, apoya los esfuerzos de los países por modernizar y revitalizar sus sectores agropecuarios, en el marco del fortalecimiento de las relaciones entre Canadá, América Latina y el Caribe.

## CONTENIDO

<b>PROLOGO.....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>9</b>
<b>2. ASPECTOS GENERALES DE LA REGULACION DE LA BIOTECNOLOGIA.....</b>	<b>11</b>
<b>3. DEFINICION Y PRINCIPIOS GENERALES DE LA LIBERACION INTENCIONAL EN EL MEDIO AMBIENTE .....</b>	<b>14</b>
<b>4. INVESTIGACIONES DE CAMPO EN PEQUEÑA ESCALA .....</b>	<b>16</b>
<b>5. INVESTIGACIONES DE CAMPO EN GRAN ESCALA O ESCALAMIENTO DE PRUEBAS DE CAMPO.....</b>	<b>28</b>
<b>6. OTORGAMIENTO DE LICENCIAS PARA PRODUCTOS MODIFICADOS GENETICAMENTE .....</b>	<b>30</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>32</b>
<b>APENDICE I: Clasificación de productos veterinarios biotecnológicos de origen biológico .....</b>	<b>33</b>
<b>APENDICE II: Requisitos para el desarrollo, prueba de campo y concesión de licencias a organismos vivos modificados genéticamente para ser utilizados como vacunas veterinarias .....</b>	<b>37</b>
<b>APENDICE III: Ejemplos de métodos para reducir los niveles de población de microorganismos en el medio ambiente .....</b>	<b>41</b>
<b>APENDICE IV: Principios científicos para las investigaciones de campo con plantas .....</b>	<b>45</b>
<b>APENDICE V: Principios científicos para las investigaciones de campo con microorganismos .....</b>	<b>55</b>

<b>APENDICE VI:</b>	<b>Información exigible en las solicitudes para pruebas de campo de plantas modificadas genéticamente.....</b>	<b>81</b>
<b>APENDICE VII:</b>	<b>Requisitos de Información para la supervisión de las pruebas de campo de microorganismos modificados genéticamente .....</b>	<b>87</b>
<b>APENDICE VIII:</b>	<b>Requisitos para la evaluación ambiental de productos veterinarios vivos de origen biológico, producidos mediante biotecnología .....</b>	<b>99</b>
<b>APENDICE IX:</b>	<b>Criterios propuestos para Prácticas Industriales Adecuadas de Gran Escala (GILSP) con respecto a microorganismos derivados del ADNr .....</b>	<b>107</b>
<b>APENDICE X:</b>	<b>Marco para la evaluación de las pruebas de campo con plantas modificadas genéticamente.....</b>	<b>111</b>
<b>APENDICE XI:</b>	<b>Marco para la evaluación de pruebas de campo con microorganismos modificados genéticamente.....</b>	<b>119</b>
<b>APENDICE XII:</b>	<b>Requisitos para la concesión de licencias de productos veterinarios de origen biológico, fabricados mediante nuevas técnicas de biotecnología.....</b>	<b>131</b>
<b>ANEXO I:</b>	<b>Miembros del Grupo de Estudio Interamericano de la Nueva Biotecnología en Salud y Agricultura, que participaron en la reunión realizada en Brasilia, del 30 de mayo al 1ro de junio de 1990 .....</b>	<b>137</b>

## PROLOGO

Los avances de la biología molecular continúan a ritmo acelerado. Cada día se identifican más genes causantes de enfermedades específicas y, en los Estados Unidos ya se autorizó el primer programa de terapia genética en seres humanos. Se ha procedido asimismo a la introducción de genes en diversas plantas para hacerlas resistentes a los herbicidas e insectos, e incluso se han producido pollos resistentes a la enfermedad de Marek, mediante la inserción de ADN del virus en las células germinales de los pollos.

Estos hechos extraordinarios no son más que algunos ejemplos de lo que puede lograrse por medio de la biotecnología y muestran cuán cerca del mercado se encuentran algunos de ellos. De hecho, varios organismos modificados genéticamente se encuentran en el proceso regulatorio requerido para su aplicación a gran escala y producción comercial. Se espera que varias plantas transgénicas concluyan con los requisitos regulatorios este año.

La evaluación regulatoria de productos de la biotecnología, especialmente organismos vivos, se ha convertido en una de las fases más importantes y costosas del desarrollo de productos comerciales. Ello a pesar de que las garantías y requisitos exigidos han sido simplificados y reducidos significativamente, al demostrar la experiencia que los temores iniciales respecto a la seguridad de la tecnología del ADN recombinante y de otras pueden haberse exagerado.

En América Latina y el Caribe no existen regulaciones de la biotecnología, con excepción de unos pocos institutos de investigación que cuentan con procedimientos internos de evaluación de la bioseguridad para el trabajo con algunas técnicas. Esto se debe a que las actividades de investigación que actualmente se realizan en la región son en pequeña escala, aunque también a que no se ejerce presión en el nivel político o público para lograr que se establezcan esas reglamentaciones. Pero con la rápida aparición de productos vivos asignados a usos comerciales, obtenidos mediante la biotecnología, urge establecer en cada país de la región mecanismos y normas adecuados con el fin de proteger la salud pública y el medio ambiente de cualquier riesgo importante y previsible. El logro de un tratamiento similar al que aplican los países desarrollados constituye un objetivo importante, a fin

de mantener la confianza de los científicos y del público en general en las nuevas tecnologías.

Ello es también del mejor interés de las compañías y los institutos de investigación, que requieren normas de orientación claras para su trabajo. El rápido acceso a la tecnología más moderna por parte de los países de América Latina y el Caribe, esencial para poder mantener y aumentar la productividad y la competitividad de su agricultura y su industria, dependerá mucho de la existencia de este marco reglamentario.

La política y los enfoques con respecto a la bioseguridad de los países desarrollados no son necesariamente los más adecuados para los países en desarrollo. Por lo tanto, es necesario adaptarlos a las circunstancias locales, teniendo en cuenta la experiencia de los países más adelantados. En vista de la falta de conocimientos técnicos y recursos en el nivel nacional, la mejor forma de lograrlo es dentro de un marco regional, como lo demuestran las actividades de cooperación que realizan el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, la Oficina Sanitaria Panamericana, la Organización de los Estados Americanos, el Organismo Internacional de Epizootias y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos en la materia.

La primera reunión del Grupo Interamericano de Estudio de la Nueva Biotecnología, creado por estas organizaciones, que se celebró en San José de Costa Rica en 1988, elaboró unas normas relativas al uso y la seguridad de las técnicas de ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante, que fueron ampliamente distribuidas en la región. En la segunda reunión, celebrada en Brasilia, del 30 de mayo al 1 de junio de 1990, se elaboraron y recomendaron las normas generales para la liberación en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente que figuran en el presente documento. Estas representan la opinión general del distinguido grupo de expertos que participaron en la reunión y constituyen una base sólida para establecer cualquier mecanismo reglamentario en el nivel nacional de la región.

Los métodos moleculares son fascinantes y muy eficaces; además, permiten el movimiento de genes a través de las barreras biológicas. Al mismo tiempo, la información de que se dispone sobre los aspectos ecológicos de dichos organismos y la experiencia en cuanto a su introducción en el medio ambiente es escasa. Esta incertidumbre en

materia ecológica deberá abordarse de manera científica. Los posibles efectos adversos pueden reducirse al mínimo o eliminarse con la aplicación de medidas apropiadas para evaluar y limitar la introducción inicial en un medio específico. En estas Guías se ofrece un marco para evaluar tales riesgos antes de la liberación limitada o general de productos en el medio ambiente. Confiamos en que la forma de abordar estos temas, aprobadas por el Grupo Interamericano de Estudio, sirvan de base para iniciar en la región los correspondientes procesos de toma de decisiones.

**Dr. Carlyle Guerra de Macedo**  
Director  
Organización Panamericana  
de la Salud  
Washington, D.C.

**Dr. Martin Piñeiro**  
Director General  
Instituto Interamericano  
de Cooperación para la  
Agricultura  
San José, Costa Rica

**Dr. Miguel Laufer**  
Director  
Departamento de  
Asuntos Científicos  
y Tecnológicos  
Organización de los  
Estados Americanos  
Washington, D.C.

**Dr. Louis Blajan**  
Director General  
Oficina Internacional de  
Epizootias  
Paris, Francia



## 1. INTRODUCCION

La liberación en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente es un tema de gran actualidad en muchos países. La investigación y desarrollo en biotecnologías ha avanzado, en muchos casos, hasta la fase de las pruebas de campo de los organismos modificados obtenidos, fase previa a la etapa final de su comercialización. Surgen, en consecuencia, preocupaciones acerca de los potenciales impactos negativos de estos organismos modificados sobre el medio ambiente y la salud pública, lo que ha llevado a regular estas pruebas y, en general, la liberación en el medio ambiente de estos organismos en muchos países.

Aún cuando la investigación y desarrollo de nuevas biotecnologías en América Latina y el Caribe es de menor magnitud que la que se realiza en los países integrantes de la OCDE, existen al menos ocho proyectos que tienen como objetivo el desarrollo de organismos transgénicos (planta y microorganismos). Es decir, organismos que contienen material genético foráneo incorporado por técnicas de ingeniería genética, que fueron identificados en una reciente encuesta realizada por el IICA. Por otro lado, compañías multinacionales han manifestado interés en realizar pruebas de sus productos transgénicos en algunos países de la región, que muy pronto estarán disponibles en el mercado internacional, dado que muchos están cercanos a la aprobación por parte de agencias regulatorias de los países de origen, particularmente en los EEUU. A título de ejemplo, el Departamento de Agricultura de los EEUU había autorizado, hasta mayo de 1990, 78 pruebas de campo de plantas transgénicas. Estos dos hechos justifican la introducción rápida en la región de mecanismos adecuados para la evaluación y aprobación de pruebas de campo y para el otorgamiento de licencias de importación y comercialización para estos nuevos productos.

Las presentes Guías tienen el objetivo de ofrecer a las autoridades competentes y a la comunidad científica y empresarial de los países de América Latina y el Caribe un marco de referencia técnico y operacional detallado para la evaluación de los riesgos ambientales de la liberación en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente. Están basadas en la experiencia mundial más reciente en esta materia, particularmente el enfoque seguido por el Canadá, la que

fue analizada y adaptada a los requerimientos regionales por el Grupo Interamericano de Estudio de la Nueva Biotecnología en su reunión de Brasilia en mayo de 1990. Parten del principio general de que la evaluación debe centrarse en el producto, independientemente del proceso por el que fue obtenido. Recomiendan una evaluación y decisión caso por caso, dada la relativamente limitada experiencia internacional a la fecha, lo que sugiere un máximo de flexibilidad para la incorporación de los cambios y nuevas concepciones que surgirán a medida que se vaya avanzando en el tema.

La metodología seguida para la elaboración de estas Guías fue la siguiente. Una primera propuesta de guías, elaborada por el IICA, fue sometida a la consideración del Grupo Interamericano de Estudio de la Nueva Biotecnología, que se dividió en cuatro grupos de trabajo (salud humana, salud animal, plantas y microorganismos) para analizarla durante dos días de trabajo. Las recomendaciones y conclusiones de cada grupo de trabajo fue sometido a la consideración de la plenaria, donde se hicieron una serie de recomendaciones adicionales. Todas las conclusiones fueron incorporadas al documento original por Jerry Callis y Walter Jaffé, y esta segunda versión de las guías fue enviada a cada uno de los integrantes de Grupo de Estudio para su consideración. La presente versión definitiva de las Guías incorpora las observaciones realizadas en esta segunda revisión.

No existen en America Latina y el Caribe mecanismos ni experiencia de evaluación y regulación de liberaciones de organismos modificados genéticamente en el medio ambiente, con la sola excepción de un caso correspondiente a México. Es de esperar que las presentes Guías puedan constituir un marco común y coordinado para la regulación de esta importante fase en el desarrollo de productos, con base en las nuevas biotecnologías en América Latina y el Caribe. Esta oportunidad de desarrollar una política armónica entre los países de la región facilitará la integración y el libre comercio en lo que atañe a los productos e industrias basadas en las biotecnologías.

## **2. ASPECTOS GENERALES DE LA REGULACION DE LA BIOTECNOLOGIA**

### **DEFINICIONES**

- 2.1. Para los fines de este documento, "regulación" se define en el sentido más amplio posible como un término global que abarca principios, directrices y normas, así como legislación.
- 2.2. Las "plantas" incluyen: gimnospermas, angiospermas; y plantas menores, que comprenden hongos que forman esporóforos, algas y microalgas, excluidas las cianobacterias.
- 2.3. Los "microorganismos" incluyen : virus, bacterias que comprenden cianobacterias, protozoos y hongos, excluidos los hongos que forman esporóforos y otros organismos unicelulares no fotosintéticos.
- 2.4. Los "productos biológicos veterinarios" incluyen vacunas animales, reactivos para diagnósticos y anticuerpos monoclonales usados en el tratamiento de enfermedades y comprenden los que se producen mediante técnicas convencionales y técnicas nuevas de biotecnología.

### **OBJETIVOS DE LA REGULACION**

- 2.5. Entre los principales objetivos que deben tenerse en cuenta para la elaboración de políticas, normas y pautas reglamentarias se cuentan los siguientes:

**proteger la salud pública y el medio ambiente;**

**abordar las legítimas preocupaciones del público en general con respecto a la seguridad de la biotecnología;**

**promover el comercio y la cooperación internacionales;**

**desarrollar la capacidad nacional en biotecnología, incluidas las actividades de investigación y desarrollo, la capacitación y la industria.**

## AMBITO DE APLICACION Y PRINCIPIOS GENERALES DE LA REGULACION

- 2.6. El presente documento se aplica en general a los organismos modificados genéticamente; es decir, los organismos que se han obtenido tanto mediante técnicas clásicas como moleculares de modificación genética.
- 2.7. No existe distinción conceptual entre las modificaciones genéticas de plantas y microorganismos por medio de métodos clásicos o por métodos moleculares que alteran el ADN y transfieren genes.
- 2.8. Desde el punto de vista de la introducción en el medio ambiente, no existe distinción conceptual entre un organismo modificado genéticamente y uno exótico (organismos que no están presentes en el ecosistema o en la localidad geográfica). Por lo tanto, estas normas generales se aplican en ambos casos.
- 2.9. Las actividades de ingeniería genética realizadas en el laboratorio, en condiciones de contención, son reguladas en muchos países mediante una notificación voluntaria a alguna autoridad competente en el nivel institucional o nacional. Las actividades de ingeniería genética que no se realizan en condiciones de contención, como las pruebas de campo de microorganismos producidos con técnicas de ingeniería genética, en algunos países, son reguladas por instituciones legalmente competentes, bajo leyes vigentes y, en unos pocos casos, mediante leyes especiales. Esta regulación se realiza generalmente por medio de permisos para efectuar pruebas de campo o la concesión de licencias para desarrollar productos.
- 2.10. El uso del ADN recombinante (ADNr) o de otras técnicas de ingeniería genética no presenta en sí riesgos especiales que no puedan manejarse de acuerdo con criterios relacionados con prácticas adecuadas de laboratorio. Por lo tanto, la regulación de la biotecnología deberá referirse a los productos obtenidos mediante dichas técnicas. La evaluación del aspecto de la seguridad de un organismo modificado con la técnica del ADNr deberá basarse en la naturaleza del organismo y el medio en el cual será introducido, no en el método por medio del cual fue

modificado.

## REGULACION DE LA BIOTECNOLOGIA VEGETAL

- 2.11. Las plantas transgénicas, independientemente de donde se produzcan, deberán ser evaluadas en cuanto a su seguridad con el fin de determinar los efectos que pueden tener en los seres humanos y en el medio ambiente.
- 2.12. Los países de América Latina y el Caribe, en su mayoría, disponen de sistemas de cuarentena para plantas y de normas para la introducción de plantas que deben ser complementados, tanto desde el punto de vista de la infraestructura como de la capacitación, con el fin de que puedan hacer frente a las exigencias de las nuevas biotecnologías.
- 2.13. Los países de América Latina y del Caribe deberán llegar a un consenso con respecto al enfoque y características de sus normas para facilitar la evaluación de esos efectos.
- 2.14. Se recomienda fuertemente a los países de América Latina y el Caribe obtener en las Instituciones nacionales o internacionales donde se desarrollaron las plantas, de gobierno a gobierno, toda la información necesaria para la evaluación de plantas transgénicas antes de realizar cualquier prueba o liberación.

## REGULACION DE LA BIOTECNOLOGIA VETERINARIA

- 2.15. En la mayoría de los casos, la regulación de los productos de biotecnología veterinaria cae dentro del ámbito de la legislación existente. Por lo tanto, es conveniente elaborar normas generales para regular los productos de biotecnología en lugar de proponer nuevas leyes.
- 2.16. Sobre la base de las características biológicas de los nuevos productos y de los aspectos de seguridad, los productos veterinarios de origen biológico creados por biotecnología pueden clasificarse de la siguiente manera:

**Clase I:**

Vacunas virales desactivadas, obtenidas con tecnología del ADN recombinante.

Vacunas bacterianas desactivadas, obtenidas con tecnología del ADN recombinante.

Productos virales, bacterianos, citocinas u otros productos.

Productos con anticuerpos monoclonales (hibridomas).

Vacunas que contienen organismos vivos, modificados mediante la supresión o la inserción de genes (sin ADN extraño).

**Clase II:**

Vacunas que utilizan un vector vivo para transportar genes extraños recombinantes.

Vacunas que contienen organismos vivos modificados mediante la inserción o supresión de genes (Introducción de ADN extraño).

La definición de cada uno de estos productos figura en el Apéndice I.

### **3. DEFINICION Y PRINCIPIOS GENERALES DE LA LIBERACION INTENCIONAL EN EL AMBIENTE**

#### **DEFINICION DE LIBERACION INTENCIONAL**

- 3.1. Se considera una "liberación intencional" cualquier experimento, producción comercial o utilización de algún producto que involucre el uso de organismos vivos (organismos nuevos para el ecosistema, modificados genéticamente o de otra manera), en condiciones de contención, tales como:
- i. en campo abierto, un potrero o un ecosistema natural;
  - ii. en instalaciones cerradas pero que no sean de contención, como invernaderos y cobertizos y corrales para animales.
- 3.2. Se pretende que estas guías generales también se apliquen a

trabajos cuyo objetivo no sea la liberación en sí, pero que hayan de realizarse en instalaciones que no son de contención o en lugares restringidos del campo, puesto que tales trabajos podrían dar lugar a liberaciones incidentales en el ambiente.

### 3.3. Etapas en la introducción de organismos:

Laboratorio/invernadero.  
Investigaciones de campo en pequeña escala.  
Investigaciones de campo en gran escala.  
Producción y distribución comercial.

En el caso de productos veterinarios biotecnológicos vivos:

Investigación y desarrollo en el laboratorio.  
Experimentos controlados en condiciones de contención.  
Pruebas de campo limitadas con uso de especies determinadas.  
Otorgamiento de licencias para la manufactura del producto.

En el caso de investigación con seres humanos, las siguientes etapas son comunes:

Pruebas en el laboratorio.  
Estudios preclínicos.  
Estudios clínicos; Fase I, Fase II, Fase III.

## REGULACION DE LAS LIBERACIONES

- 3.4. Los límites para cada etapa deben determinarse caso por caso, según la naturaleza del organismo. "Caso por caso" significa hacer un examen individual de cada propuesta en relación con criterios de evaluación pertinentes a esa propuesta en particular.
- 3.5. Se recomienda a los gobiernos establecer mecanismos para supervisar las distintas etapas; por ejemplo, la de laboratorio/invernadero, la de investigación de campo, la de la progresión hacia una mayor escala y la de comercialización. Los gobiernos decidirán el grado de control que se vaya a adoptar para cada etapa.

- 3.6. El procedimiento de supervisión deberá guardar relación con el grado de riesgo asociado en cada caso, según la naturaleza de los organismos, el alcance de la prueba y si implica o no experimentación clínica con humanos.
- 3.7. El análisis de los riesgos potenciales deberá realizarse caso por caso antes de la liberación. No se pretende con esto que cada caso requiera un análisis por autoridades nacionales o de otra índole, porque pueden quedar excluidas determinadas clases de propuestas.
- 3.8. Las condiciones reglamentarias a cumplirse en cada etapa, en el caso de los productos veterinarios biotecnológicos aparecen resumidas en el Apéndice II.
- 3.9. Se recomienda que en el caso de pruebas clínicas con seres humanos se aplique el Código de Ética de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
- 3.10. El examen y control de liberaciones en el medio ambiente será de responsabilidad de los Comités Institucionales de Bioseguridad (CIB), en el plano institucional, y del Comité Técnico Asesor Nacional de Bioseguridad (CTANB) en el plano nacional.
- 3.11. Para la definición y términos de referencia de los CIB y los CTANB deberán usarse las Guías para el Uso y Seguridad de las Técnicas de Ingeniería Genética o Tecnología del ADN Recombinante, preparadas por el Grupo Interamericano de Estudio de la Nueva Biotecnología y publicadas por IICA/OPS/OEA/OIE.

#### **4. INVESTIGACIONES DE CAMPO EN PEQUEÑA ESCALA**

##### **PRINCIPIOS Y PRACTICAS PARA INVESTIGACIONES DE CAMPO EN PEQUEÑA ESCALA: PRACTICAS ADECUADAS DE DESARROLLO**

- 4.1. En el caso de pruebas de campo en pequeña escala con plantas y microorganismos se deberá usar el concepto de Prácticas

**Adecuadas de Desarrollo para investigaciones de campo en pequeña escala, propuesto por la OCDE.**

- 4.2. El propósito de las Prácticas Adecuadas de Desarrollo (PAD) es servir de guía científica para la realización de investigaciones de campo que presenten poco riesgo o riesgos insignificantes, para cualquier fin, incluidas investigación básica e investigación aplicada. No pretenden excluir enfoques nacionales particulares de la regulación de la investigación de campo con plantas y microorganismos.**
- 4.3. El concepto básico de las PAD es que resulta posible determinar una serie de condiciones de experimentación, a partir de las cuales se pueden efectuar investigaciones de campo en pequeña escala, que presenten pocos riesgos o riesgos insignificantes, con un organismo específico genéticamente modificado. Los principales factores para determinar la seguridad de un experimento específico son:**
- i. las características de los organismos utilizados;**
  - ii. las características del sitio donde se realiza la investigación; y**
  - iii. la utilización de prácticas de experimentación apropiadas, científicamente aceptables y adecuadas desde el punto de vista ambiental.**
- 4.4. El primer supuesto de trabajo de las PAD es que ciertos principios científicos relativos al organismo, el sitio donde se realiza la investigación y las prácticas de experimentación tienen diferente importancia relativa en la determinación de si un experimento presenta poco riesgo o riesgos insignificantes.**
- El segundo supuesto es que se puede llegar a una conclusión sobre el riesgo de un experimento por medio de la evaluación de los factores pertinentes y su interacción, de acuerdo con las condiciones del experimento.**
- El tercer supuesto es que resulta más fácil abordar la interacción de esos factores en experimentos de campo en pequeña escala, debido a su limitado alcance.**

- 4.5. **Ciertos organismos pueden tener determinadas características que, si son utilizadas dentro de una amplia gama de condiciones, podrán considerarse de poco riesgo o de riesgo insignificante. Otros organismos, que producen efectos adversos conocidos, podrán ser aceptables para experimentos de campo, siempre que el diseño de experimentación permita mantener el control sobre tales efectos adversos. Para dicho propósito, se aplicarán métodos de mitigación o la confinación del organismo que es objeto de investigación, o de su material genético, a un sitio de investigación restringido.**
- 4.6. **Se formulan asimismo varios supuestos con respecto a los principales factores que determinan la seguridad de un experimento específico. A continuación se describen dichos supuestos en relación con las características del organismo, las características del sitio y las prácticas de experimentación.**

#### **Características de los organismos**

- 4.7. **Plantas - Las plantas con que probablemente se experimente son domesticadas, pueden ser aisladas reproductivamente y, probablemente, no perduren en un medio ambiente no cultivado o ni siquiera en el sitio de la prueba. Las características de las plantas que se considerarán comprenden :**
- i. la biología reproductiva de la planta, como sus flores, los requisitos de polinización y las características de las semillas, además de un amplio historial sobre control de la reproducción, en el que no haya diseminación ni establecimiento en un medio ambiente comparable al del sitio de la investigación;**
  - ii. el modo de acción, la persistencia y la degradación de cualquier compuesto tóxico nuevo introducido recientemente en ella;**
  - iii. la naturaleza de los vectores biológicos utilizados para la transferencia de ADN a las plantas.**
- 4.8. **Microorganismos - A diferencia de las plantas, las pruebas con microorganismos, por lo general, se realizan con grandes**

poblaciones, y puede ser que algunas de ellas subsistan. Los organismos individuales de esa población no siempre pueden aislarse genéticamente. Por ejemplo, la posibilidad de transferencia horizontal de ADN no siempre puede excluirse en los microorganismos. Los microorganismos deben ser considerados en términos estadísticos, teniendo en cuenta la probabilidad de que ocurra un acontecimiento en una población o un ambiente determinados. Las características de los microorganismos que se considerarán comprenden aquéllas que se refieren a:

- i. la dispersión, la supervivencia y la multiplicación;
- ii. las interacciones con otras especies o sistemas biológicos;
- iii. las posibilidades de transferencia de genes.

#### Características del sitio de investigación

- 4.9. El sitio de investigación puede seleccionarse tanto para realizar pruebas de campo que presenten poco riesgo o riesgos insignificantes, como para alcanzar los objetivos de la investigación. El término "sitio" se utiliza de modo que incluya el terreno mismo de la investigación y una parte apropiada del medio ambiente circundante.
- 4.10. En la etapa de pequeña escala de la investigación, en razón de que el medio ambiente afectado en general está más localizado que en otras etapas, el investigador podrá seleccionar el sitio de investigación más adecuado desde el punto de vista de la seguridad, mediante la determinación, por ejemplo, de:
  - i. consideraciones ecológicas o ambientales importantes relativas a la seguridad en el sitio geográfico específico (por ejemplo, alto nivel freático, gran cantidad de escurrimiento de agua);
  - ii. condiciones climáticas;
  - iii. la extensión, es decir, la superficie física;

iv. una ubicación geográfica apropiada en relación con la proximidad de biota específica que pudiera verse afectada.

La seguridad de la investigación puede incrementarse si se escoge un sitio que tenga un amplio historial de investigaciones pertinentes y en donde no se haya observado diseminación ni establecimiento más allá del sitio.

#### Prácticas de experimentación

- 4.11. Como cualquier otra investigación, para que una investigación de campo sea científicamente aceptable y adecuada desde el punto de vista ambiental, es necesario diseñar cuidadosamente el experimento. Habrá que formular una hipótesis y establecer los objetivos; elaborar metodologías específicas para la introducción de los organismos, la supervisión y la mitigación; describir de manera precisa el diseño de los experimentos, incluyendo la densidad de plantación y los tipos de tratamiento; y describir los datos específicos que se han de reunir y los métodos de análisis para examinar la significación estadística.
- 4.12. Las prácticas adecuadas desde el punto de vista ambiental para realizar estas investigaciones comprenden: la elección de un sitio geográfico apropiado en relación con la proximidad a una importante biota que podría verse afectada; caracterizar el sitio de investigación incluyendo, por ejemplo, la dimensión y la preparación, aspectos climáticos; el diseño de protocolos de introducción, incluyendo la cantidad y la frecuencia de la aplicación; la selección de métodos para la preparación y el cultivo del terreno; la selección de métodos para el aislamiento, la descontaminación, la vigilancia y la mitigación; el diseño de tratamientos aplicables a la investigación; la elaboración de procedimientos adecuados de seguridad y de manipulación para la aplicación de planes de contingencia en caso de que sea necesario suspender anticipadamente un experimento.

#### **FUNCIONAMIENTO DE LAS PAD**

- 4.13. En la presente sección se expone a grandes rasgos el

funcionamiento de las PAD para realizar, en condiciones de seguridad, investigaciones de campo en pequeña escala con plantas y microorganismos modificados genéticamente, y para ayudar en el diseño de experimentos de campo de bajo riesgo o riesgos insignificantes. El propósito de las PAD es proporcionar conceptos generales que permitan aplicar enfoques nacionales flexibles en el diseño y la evaluación de las Investigaciones de campo.

### Prácticas apropiadas de experimentación

**4.14.** En esta parte se presentan una serie de prácticas que deberán tenerse en cuenta cuidadosamente al realizar investigaciones de campo en pequeña escala con plantas y microorganismos. Los investigadores que diseñan y dirigen estos experimentos de campo deberán elaborar protocolos y códigos de prácticas que muestren la forma en que pretenden, por ejemplo:

1. Mantener el número apropiado de organismos modificados, en el mínimo nivel posible, acordes con el experimento.
2. Poner en práctica medidas para limitar la dispersión y el establecimiento desde la fuente y, cuando proceda, complementar esas medidas.
3. Vigilar adecuadamente el organismo en el sitio de investigación y estar dispuesto a aplicar medidas de control o de mitigación si se considera apropiado y necesario, con el fin de evitar efectos ambientales adversos y no intencionales durante el experimento o al concluir el experimento.
4. Efectuar pruebas para determinar la presencia de organismos establecidos o, cuando proceda, información genética transmitida, fuera del sitio de investigación original.
5. Aplicar medidas de control o mitigación (véase Apéndice III), si se considera apropiado y necesario para evitar efectos ambientales adversos fuera del sitio de

investigación original.

6. Desarrollar procedimientos para la conclusión del experimento y la eliminación de desechos.
7. Proporcionar medidas de seguridad, educación y capacitación apropiadas para todo el personal que participa en la investigación.
8. Llevar un registro de los resultados y realización de pruebas.

#### *Experimentos con plantas*

- 4.15. La seguridad de las investigaciones de campo en pequeña escala con plantas puede determinarse mediante un análisis de las características del organismo y del sitio de investigación; también mediante la utilización de prácticas de experimentación apropiadas, científicamente aceptables y ambientalmente adecuadas. La siguiente discusión de las PAD con respecto a las plantas incluye características del organismo y supone una prudente elección del sitio de investigación y de las prácticas de experimentación.
- 4.16. El propósito de las PAD es diseñar experimentos de campo de manera que: (1) las plantas experimentales genéticamente modificadas permanezcan aisladas reproductivamente del *pool* de genes de plantas sexualmente compatibles localizadas fuera del sitio de experimentación; (2) los genes o los organismos modificados genéticamente no sean liberados en el medio ambiente más allá del sitio de la investigación; o (3) se utilicen plantas que, aun sin aislamiento reproductivo, no produzcan efectos adversos involuntarios y no controlados.
- 4.17. Los principios científicos de las PAD con respecto a las plantas, como se presentan en el Apéndice IV, se derivan de la experiencia adquirida en investigaciones de campo con nuevas variedades de plantas, obtenidas mediante técnicas nuevas y convencionales de fitomejoramiento.
- 4.18. Las PAD pueden lograrse de una o de las dos maneras

siguientes:

(1) El diseño del experimento permite controlar la reproducción.

(a) Una restricción del experimento o una limitación biológica intrínseca hace que la planta sea incapaz de reproducirse; o,

(b) El aislamiento reproductivo, o un equivalente práctico, reduce al mínimo la probabilidad de reproducción fuera del terreno de experimentación.

(2) El diseño del experimento limita la probabilidad de causar daños (o afectar significativamente) al medio ambiente.

(a) Hay una mínima probabilidad de que la planta sobreviva, se disperse o se establezca más allá del sitio de la investigación;

(b) Cualquier compuesto tóxico, recién introducido o aumentado en la planta, tiene mínimas probabilidades de producir efectos perjudiciales para los ecosistemas manejados o naturales; o

(c) Los vectores de transferencia de genes que presentan un riesgo de perjuicio, enfermedad o daño para la planta han sido adecuadamente desactivados o eliminados de la planta.

#### *Experimentos con microorganismos*

4.19. La seguridad de las investigaciones de campo con microorganismos, en pequeña escala, puede determinarse mediante el análisis de las características del organismo, el sitio de investigación y el empleo de prácticas apropiadas de experimentación.

4.20. El propósito de las PAD es diseñar experimentos de campo con el fin de que (1) se controle la transferencia de material genético de interés; (2) se controle la diseminación de microorganismos que contienen ese material genético; o (3) no se produzcan

efectos adversos no intencionales y no controlados sobre otros organismos, aunque pueda haber transferencia y diseminación.

- 4.21. El término diseminación incluye los conceptos de "movimiento/dispersión" y "establecimiento" fuera del sitio de la prueba.
- 4.22. La capacidad de un microorganismo de diseminarse en el medio ambiente y transferir material genético a otros organismos, sumado a la disponibilidad de hábitats/nichos adecuados y asequibles en las cercanías del sitio de la investigación, serán por lo tanto factores importantes para evaluar las condiciones de seguridad. En el Apéndice V se examinan específicamente principios científicos con respecto a los microorganismos.
- 4.23. Se pueden lograr PAD de las siguientes formas:

(1) El diseño del experimento permite controlar la transferencia de material genético y la diseminación más allá del sitio de investigación:

(a) La probabilidad de transferencia horizontal de genes se reduce al mínimo dada la biología del organismo o porque se la previene o minimiza en la medida de lo posible;

(b) La biología del organismo limita su capacidad de competir; y

(c) Se adoptan medidas para reducir al mínimo el movimiento/dispersión del microorganismo desde el sitio de la prueba; o

(d) Se adoptan medidas para prevenir o mitigar (véase el Apéndice III) el establecimiento del organismo más allá del sitio de la prueba si fuere necesario.

(2) El diseño del experimento limita la probabilidad de que se produzcan daños (o efectos significativos) en las zonas que se encuentran más allá del sitio de la investigación:

(a) No deberán producirse efectos adversos para el

medio ambiente más allá del sitio de la investigación, aunque el microorganismo se disemine fuera del sitio, como lo muestran los conocimientos y experiencias anteriores (por ejemplo, la biología del organismo, las condiciones ambientales, los resultados obtenidos de estudios controlados y de pruebas de campo anteriores que fueron evaluadas dentro del marco establecido en el informe de la OCDE de 1986, titulado Consideraciones de Seguridad relativas al ADN Recombinante); y

(b) El experimento deberá diseñarse con el fin de vigilar los efectos que se producen en otros organismos (por ejemplo, la sanidad vegetal y animal, las comunidades microbianas, los procesos de los ecosistemas y otros sistemas biológicos), y de controlar o mitigar esos efectos en caso de que se produzcan.

#### **EXAMEN Y SUPERVISION**

- 4.24. Se recomienda que la planificación de pruebas de campo de pequeña escala se ajuste a las Consideraciones de Seguridad relativas al ADN Recombinante y con las Prácticas Adecuadas de Desarrollo, elaboradas por la OCDE.
- 4.25. Las solicitudes referentes a pruebas de campo de pequeña escala deberán ser examinadas y aprobadas en primera instancia por el CIB. El comité puede consultar, en caso necesario, con el CTANB, así como solicitarle las aprobaciones del caso. También deberán velar para que los procedimientos y prácticas especificados en estas normas se pongan en práctica, asegurarse de que todo el personal que interviene tenga suficiente capacitación y experiencia y mantener un archivo referente a estas pruebas.
- 4.26. El CTANB examina las propuestas de pruebas de investigación de campo de pequeña escala presentadas por el CIB, las consulta con las entidades gubernamentales y otras organizaciones pertinentes, según sea el caso, y presenta un informe sobre las pruebas a la entidad gubernamental responsable.

- 4.27. Si bien es recomendable que se establezcan los CIB y los comités de supervisión, conforme se indica en *supra*, en los casos en que esto no sea práctico o factible se sugiere que se obtenga asesoramiento de otras organizaciones regionales o internacionales.

## EVALUACION

- 4.28. Para la evaluación de pruebas de campo en pequeña escala deberá utilizarse el siguiente marco de referencia para la toma de decisiones, propuesto por el Consejo Nacional de Investigaciones de los Estados Unidos de América (US NRC):

¿Conocemos las propiedades del organismo y del ambiente en el que podría introducirse?

¿Podemos aislar o controlar el organismo de manera eficaz?

¿Cuáles serían los efectos probables en el ambiente si el organismo en él introducido o algún rasgo genético suyo perdura por más tiempo de lo que se previó o se extiende a otros ambientes no seleccionados para ello?

- 4.29. Las principales preocupaciones con respecto a las plantas, producidas por técnicas de ingeniería genética, son la "característica de maleza", la toxicidad de las plantas comestibles, la producción de plantas con características no deseables y los efectos de la transferencia de rasgos no deseables a otras plantas. El aislamiento es la condición primordial para garantizar la seguridad de la prueba en esta categoría.
- 4.30. En el caso de microorganismos, la influencia de la alteración genética en el fenotipo y la movilidad del rasgo modificado son aspectos que deberían evaluarse con especial cuidado.
- 4.31. En el caso de las plantas, se requiere la siguiente información para el examen y la evaluación de pruebas de campo de pequeña escala (esto se presenta con mayor detalle en el Apéndice VI):

### 1. Características del material vegetal.

2. Donante del gen, especificación de la inserción, vector de expresión y producto del gen.
3. Sistema de transformación.
4. Resultados de las pruebas de laboratorio y en el invernadero, cuando sean del caso.
5. Sitio(s) propuesto(s) para la prueba.
6. Medidas de aislamiento reproductivo o de contención biológica.
7. Tratamiento de la tierra post-cosecha y monitoreo del sitio.
8. Destino del material vegetal cosechado.

4.32. En el caso de microorganismos, se requiere la siguiente información para el examen y la evaluación de pruebas de campo de pequeña escala (esto se presenta con mayor detalle en el Apéndice VII):

1. Identificación y caracterización del microorganismo silvestre y del receptor.
2. Caracterización del material genético insertado o del microorganismo producido por ingeniería genética.
3. Evaluación de los impactos en el medio ambiente.
4. Evaluación de patogenicidad y toxicidad.
5. Seguridad de calidad/control de calidad.
6. Observación en el campo.

4.33. En el caso de productos veterinarios biotecnológicos de origen biológico, las pruebas de campo de pequeña escala requieren una evaluación ambiental que se describe en el Apéndice VIII bajo el título Requisitos para la Evaluación Ambiental.

## MONITOREO

- 4.34. En el caso de plantas, las pruebas de campo de pequeña escala deberán ser monitoreadas teniendo en cuenta los siguientes factores:
1. Aislamiento de la cosecha genéticamente alterada de especies afines, por medios físicos o culturales.
  2. Presencia de especies similares y malezas en el sitio de la prueba.
  3. Eficacia de los procedimientos de monitoreo usados durante la prueba.
  4. Apariencia y condiciones generales de la prueba.

## 5. INVESTIGACION DE CAMPO EN GRAN ESCALA O ESCALAMIENTO DE PRUEBAS DE CAMPO

- 5.1. El escalamiento de las pruebas de campo debe examinarse sobre la base de los resultados de pruebas de campo en pequeña escala. Las condiciones se determinarán caso por caso.
- 5.2. En el caso de microorganismos, los principios básicos de las Prácticas Adecuadas Industriales de Gran Escala (GILSP), propuestas por la OCDE, podrán extenderse o aplicarse al escalamiento industrial y la producción comercial.
- 5.3. Los peligros que se presenten con microorganismos de ADN recombinante pueden determinarse y manejarse de la misma forma que los relacionados con otros organismos. Debería reconocerse que, en el caso de organismos considerados de bajo riesgo, sólo se requieren controles y procedimientos de contención mínimos. Este es el caso de la gran mayoría de los organismos de ADN<sub>r</sub> utilizados en la producción industrial de gran escala. Por esta razón, avalamos el concepto de las Prácticas Industriales Adecuadas de Gran Escala (GILSP) en

relación con organismos que pueden ser manejados con un mínimo grado de control.

En el caso de organismos manipulados por medio de técnicas de ADNr, pueden identificarse criterios que hagan posible el uso de las GILSP (ver el Apéndice IX) para el organismo original (huésped), para el organismo construido mediante tecnología del ADNr y para el vector de inserción empleado:

1. El organismo original deberá ser no patógeno; no deberá contener agentes adventicios y deberá tener un amplio historial de uso industrial seguro o limitaciones ambientales inherentes que permitan un crecimiento óptimo en el entorno industrial, pero reducidas consecuencias adversas en el medio ambiente.
2. El organismo construido por tecnología del ADNr deberá ser no patógeno, deberá ser seguro en el entorno industrial como organismo huésped y no deberá tener consecuencias adversas en el medio ambiente.
3. El vector de inserción deberá estar bien caracterizado y libre de secuencias perjudiciales conocidas; deberá ser tan reducido en tamaño como fuese posible en relación con el ADN requerido para realizar la función deseada; no deberá aumentar la estabilidad del producto en el ambiente, a menos que esto sea un requerimiento de la función deseada; deberá ser escasamente movilizable y no deberá transferir marcadores de resistencia a microorganismos que hasta dónde se sabe no los adquieren naturalmente, si tal adquisición pudiera comprometer el uso de alguna droga para controlar agentes de ciertas enfermedades en medicina humana o veterinaria, o en la agricultura.

## **6. OTORGAMIENTO DE LICENCIAS PARA PRODUCTOS MODIFICADOS GENETICAMENTE**

### **PRINCIPIOS GENERALES**

- 6.1. La concesión de licencias dependerá de las pruebas de campo en gran escala y será examinada caso por caso.
- 6.2. Un nuevo producto que ingresa en un país y ya ha sido aprobado previamente en otro sitio, o un producto desarrollado dentro del país, debe cumplir con las disposiciones reglamentarias vigentes de este país antes de que pueda ser usado comercialmente.
- 6.3. El mecanismo que existe en los países para otorgar licencias, en relación con otros productos, puede ser adecuado para los organismos modificados genéticamente cuando hay un grado aceptable de familiaridad con la propuesta.
- 6.4. La familiaridad con la propuesta puede determinarse usando el marco de referencia para la toma de decisiones, establecido por el US NRC, que figura en el Apéndice X para plantas y en el Apéndice XI para microorganismos.

### **REQUISITOS DE INFORMACION**

- 6.5. Para otorgar licencias en el caso de productos veterinarios biotecnológicos de origen biológico, la presentación debe contener, además de información para la evaluación del impacto ambiental, los resultados de las pruebas de campo restringidas, con el fin de demostrar que el producto es puro, seguro, potente y eficaz. Estos requisitos se enumeran en el Apéndice XII, junto con los referentes a las condiciones físicas, la higiene y la seguridad de las instalaciones.
- 6.6. En el caso de plantas transgénicas que contienen o expresan toxinas en grados que podrían ser peligrosos para la salud de seres humanos o animales, deberán tomarse las correspondientes precauciones de etiquetado y empaque.

- 6.7. Cuando se solicita el registro de un producto en un país determinado, deberá informarse a la institución nacional reguladora competente lo referente a la concesión de licencias o el registro del producto en el país de origen.
- 6.8. Los países que exportan un organismo genéticamente modificado, con el cual no se permitieron realizar pruebas de campo en dicho país, deberán comunicar las razones y toda la información al respecto, a cualquier otro país al que se pretenda exportarlo, cuando ello sea solicitado por este.

#### **NECESIDAD DE PRUEBAS LOCALES**

- 6.9. Puede que sea necesario efectuar pruebas y evaluaciones locales para la concesión de una licencia o permiso para el uso comercial de un organismo que ha de ser introducido en un país determinado. Esto deberá decidirse caso por caso. El marco de referencia para la toma de decisiones, propuesto por el US NRC, puede ser utilizado para decidir si estas pruebas locales son necesarias.

#### **PAPEL DE LOS INSTITUTOS DE INVESTIGACION Y DE LAS ORGANIZACIONES INTERNACIONALES**

- 6.10. Los institutos de investigación no deberán desempeñar papel alguno durante esta etapa, a menos que así lo exigieran las autoridades reguladoras.
- 6.11. Las organizaciones regionales deberán participar en la armonización de los principios y procedimientos para la comercialización y otorgamiento de licencias, en relación con organismos modificados genéticamente y utilizados en los países de la región.
- 6.12. Para los casos en que no exista una infraestructura reglamentaria, deberá obtenerse asesoramiento, según sea requerido, de otras autoridades nacionales o regionales.

## 7. BIBLIOGRAFIA

AGRICULTURE CANADA (1989). Guidelines for the Regulation of Veterinary Biologics produced by Biotechnology, Nepean, Ontario, Canada.

INTER-AMERICAN INSTITUTE FOR COOPERATION ON AGRICULTURE (1988). Guidelines for the Use and Safety of Genetic Engineering Techniques or Recombinant DNA Technology. Wash. D.C.

KALOUS M.J.; DUKE L.H. (1989). The Regulation of Plant Biotechnology In Canada, Part 2, The Environmental Release of Genetically Altered Plant Material. Seed Division, Agriculture Canada. Ottawa, Ontario, pp. 20-26.

MAJOR D.W.; HART D.R.; LUSH D.L. (1988). Release of Genetically Engineered Microorganisms into the Environment. Beak Consultants Limited. Canada.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1989). Field Testing Genetically Modified Organisms: Framework for Decisions. Wash. D.C.

OECD (1990). Good Developmental Practices for Small Scale Research with Genetically Modified Plants and Microorganisms. Paris.

OECD (1986). Recombinant DNA Safety Considerations. Paris.

## **APENDICE I**

### **CLASIFICACION DE PRODUCTOS VETERINARIOS BIOTECNOLOGICOS DE ORIGEN BIOLOGICO**

**Fuente: Agriculture Canada (1989), Guidelines for the  
Regulation of Veterinary Biologics Produced by Biotechnology.**



### CLASE I

- Vacunas virales desactivadas obtenidas mediante ADNr.
- Vacunas bacterianas desactivadas obtenidas mediante ADNr.
- Citocinas u otras subunidades virales o bacterianas.
- Productos de anticuerpos monoclonales (hibridomas).
- Vacunas que contienen organismos vivos modificados por inserción o supresión de genes (sin introducción de ADN "extraño").

### CLASE II

- Vacunas que utilizan un vector vivo para transportar genes recombinantes extraños.
- Vacunas que contienen organismos vivos modificados por inserción o supresión de genes (con introducción de ADN "extraño").

La Clase I comprende productos preparados a partir de organismos recombinantes desactivados, tales como virus, bacterias, toxoides de bacterias, subunidades virales o bacterianas, citocinas, productos de anticuerpos monoclonales usados en profilaxis o terapéuticamente o en componentes de equipos para diagnóstico. Estos productos no viables no implican riesgo alguno para el ambiente, ni preocupaciones nuevas o inusuales en cuanto a seguridad. En el caso de los productos vivos de esta clase, que contienen organismos resultantes de supresiones, cambios de base única y reorganizaciones dentro de un único gen, podría requerirse información para establecer la seguridad ambiental. Estos productos son casi equivalentes a las vacunas vivas modificadas, que han sido utilizadas durante decenios sin riesgos inesperados.

La Clase II comprende productos que contienen microorganismos vivos que han sido modificados con la introducción de ADN de diferentes organismos o diferentes variedades del mismo organismo; esta clase consiste en productos que usan vectores vivos para transportar un gen recombinante extraño o más de uno, que codifican

los antígenos inmunizantes o los estimulantes inmunológicos. Los vectores vivos pueden transportar múltiples genes recombinantes extraños y son capaces de infectar e inmunizar eficazmente a los animales huéspedes. Los genes suprimidos en productos vivos en la Clase I o en la Clase II pueden codificar la virulencia, la oncogenicidad, alguna actividad enzimática u otras funciones bioquímicas. La adición de genes puede dar lugar a la expresión de antígenos marcadores únicos o a la producción de subproductos bioquímicos novedosos.

Deben tomarse precauciones para garantizar que esta adición o supresión de información genética específica no aporte mayor virulencia, patogenicidad o ventajas de supervivencia a estos organismos que las que se presentan en sus formas naturales o silvestres. La modificación no debe aportar factores adhesivos o invasivos no deseables, nuevos o más numerosos, propiedades colonizadoras o diferentes condiciones de supervivencia dentro del huésped. Es importante que los genes que se agregan o se suprimen no pongan en peligro las características de seguridad de estos organismos. En la mayoría de los casos se mejoran sus características de seguridad, de manera de no presentar nuevos peligros para humanos, otras especies animales o el medio ambiente.

La información genética agregada o suprimida debe consistir en segmentos de ADN bien caracterizados. Los datos requeridos para la concesión de licencias pueden comprender análisis de pares de bases, información sobre secuencias, sitios de restricción de endonucleasas y la caracterización fenotípica del organismo alterado. Se requiere también una comparación entre el organismo creado por ingeniería genética y la variedad de origen en cuanto a vías bioquímicas, rasgos de virulencia u otros factores que afecten la patogenicidad. Cuando se usan como vectores vivos de genes extraños, los nuevos organismos derivados del ADNr deben ser totalmente caracterizados de nuevo y comparados con el virus de origen. Las preocupaciones, en cuanto a seguridad para los humanos y animales y los efectos en el ambiente, deben ser abordadas en un estudio de evaluación ambiental o efectos en el medio ambiente, a cargo de un comité especial, antes de que puedan tomarse en consideración productos vivos para efectos de pruebas de campo limitadas o la concesión de licencias.

## **APENDICE II**

### **REQUISITOS PARA EL DESARROLLO, PRUEBA DE CAMPO Y CONCESION DE LICENCIAS A ORGANISMOS VIVOS MODIFICADOS GENETICAMENTE PARA SER UTILIZADOS COMO VACUNAS VETERINARIAS**

**Fuente: Agriculture Canada (1989), Guidelines for the  
Regulation of Veterinary Biologics Produced by Biotechnology.**



### **ETAPA I**

**Investigación y desarrollo en el laboratorio, observando las normas de seguridad de la OCDE.**

### **ETAPA II**

**Experimentos de contención controlada tanto con especies animales objetivo y no objetivo.**

### **ETAPA III**

**Presentación de datos para la evaluación ambiental y las pruebas de campo ante el organismo regulador.**

**La negociación, caso por caso, podría requerir una evaluación de un Comité *Ad-Hoc*.**

**Pruebas de campo limitadas con especies objetivo.**

### **ETAPA IV**

**Presentación completa, incluyendo los resultados de la prueba de campo, para el otorgamiento de la licencia al producto.**

**Emisión de la licencia si se cumple con los requisitos.**

**La autorización de los procedimientos y normas para el estudio de la solicitud hecha para la experimentación, en las etapas 2-4, será evaluada caso por caso por el organismo regulador pertinente.**

**Las instalaciones físicas de contención para la segunda etapa serán casi equivalentes a las de la Etapa I, pero las condiciones pueden ser negociadas con sujeción al estudio de la información obtenida durante la Etapa I.**

**El movimiento del producto de ADN recombinante vivo de la Etapa II a la Etapa III, para pruebas de campo limitadas fuera de las instalaciones con condiciones de contención controladas, hará necesaria una presentación de información completa acerca del producto, que incluya datos sobre seguridad provenientes de los experimentos de la**

Etapa I y la Etapa II. En esta etapa se decidirá si se necesita o no un Comité *Ad-Hoc* para la evaluación de esta información y para evaluar el efecto en el medio ambiente que tendría la autorización de tales pruebas. El fabricante debe proporcionar información apropiada, de manera que los reguladores y miembros del Comité puedan determinar si las condiciones de la prueba de campo propuesta son seguras para el ambiente y adecuadas para prevenir la propagación de enfermedades.

### **APENDICE III**

## **EJEMPLOS DE METODOS PARA REDUCIR LOS NIVELES DE POBLACION DE MICROORGANISMOS EN EL MEDIO AMBIENTE**

**Fuente: OECD (1990), Good Developmental Practices for  
Small Scale Field Research with Genetically Modified  
Plants and Microorganism, Paris.**



<u>Hábitat</u>	<u>Inmediato(a)</u>	<u>Corto Plazo(b)</u>	<u>Largo plazo(c)</u>
Organismos de vida libre	Fumigación Inundación Químicos	Fumigación Inundación Químicos Control de erosión Enmiendas del suelo	Fumigación Inundación Control de la erosión Enmiendas del suelo
Plantas	Químicos (erradicación) Cuarentena Preparación del suelo Químicos(f) Control biológico Riego/inundación Control insectos vectores Sanidad de maquinaria Control de aguas superficiales Asoleo (cubrir con plástico)	Fitomejoramiento para resistencia(d) Control biológico(e) Cuarentena Químicos Rotación de cultivos Rotación de cultivares Riego/inundación Tratamiento térmico Asoleo del suelo Resistencia inducida Cultivo de meristemas/tejidos Control de insectos vectores Control de malezas/húspedes naturales Control de la erosión	Fitomejoramiento para resistencia Control biológico Rotación de cultivos Rotación de cultivares Enmiendas de suelo Control de malezas/húspedes naturales Control de la erosión

(a) Tratamiento efectivo dentro de un plazo de horas a varios días.

(b) Tratamiento efectivo dentro de un plazo de semanas a tres años.

(c) Tratamiento efectivo después de más de tres años.

(d) Desarrollo rápido si el germoplasma se identifica adecuadamente; de lo contrario el proceso dura normalmente de 5 a 10 años.

(e) Aún hay pocos agentes de control biológico disponibles para uso generalizado.

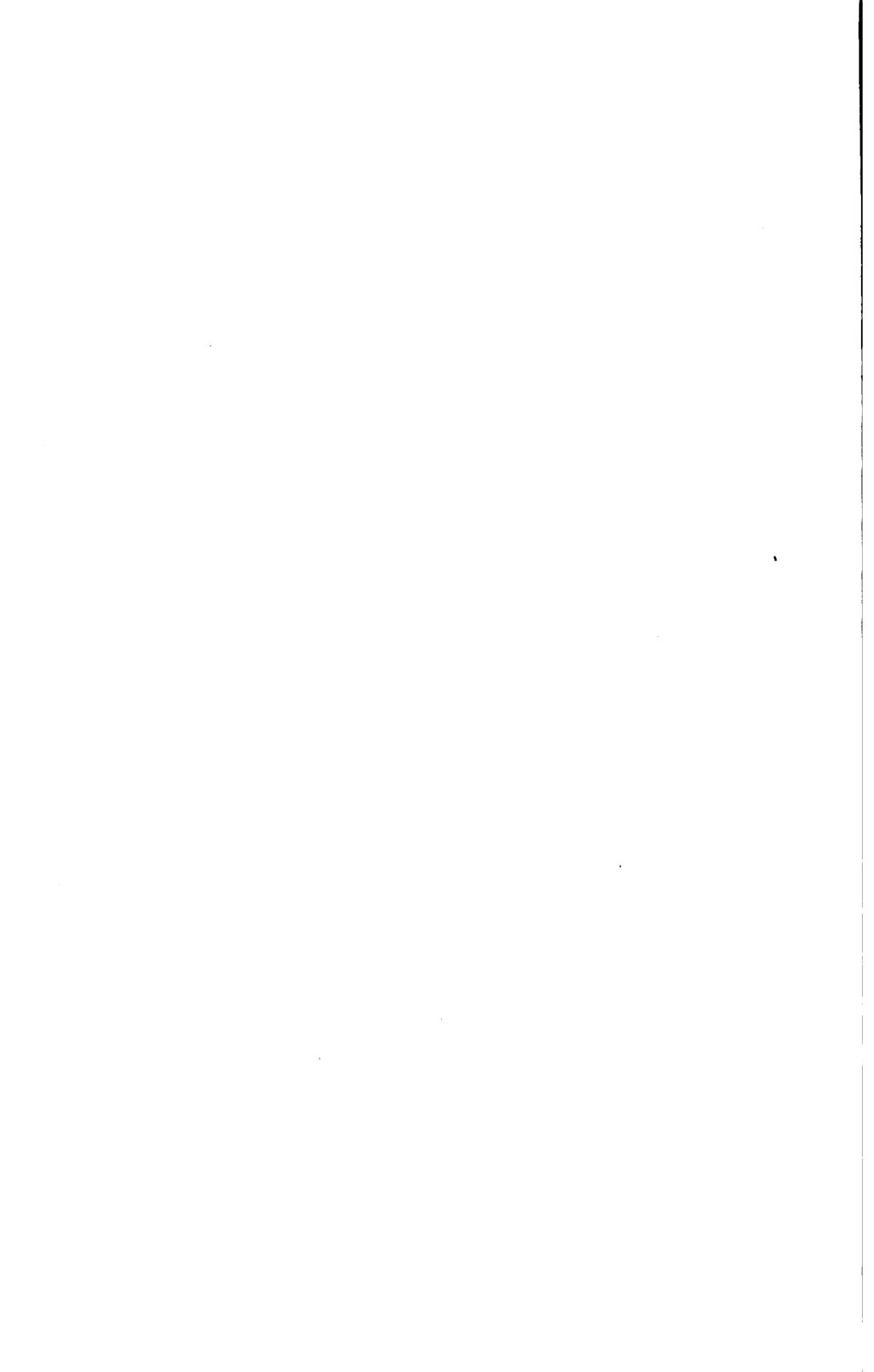
(f) La elección y la disponibilidad de los productos químicos para los microorganismos a ser tratados determina la viabilidad y el método.



**APENDICE IV**

**PRINCIPIOS CIENTIFICOS PARA LAS INVESTIGACIONES  
DE CAMPO CON PLANTAS**

**Fuente: OCDE (1990), Good Developmental Practices for  
Small Scale Field Research with Genetically Modified  
Plants and Microorganisms, Paris.**



En las secciones siguientes se presentan los principios científicos que constituyen la base de las condiciones para lograr PAD en las investigaciones de campo con plantas modificadas genéticamente. Es muy probable que la extensión de las parcelas para realizar estos experimentos esté determinada por las características de las plantas que se utilizarán en el experimento (por ejemplo, para huertas de frutales se necesitarán parcelas más extensas, mientras que los cultivos de cereales pueden evaluarse adecuadamente utilizando parcelas de experimentación más pequeñas). Si bien durante miles de años se ha venido practicando de alguna manera el fitomejoramiento selectivo, no fue sino hasta que se volvió a descubrir el trabajo de Gregor Mendel, en 1900, que se generalizó el tipo de modificación genética científica que practican actualmente los fitogenetistas. Las observaciones formuladas por científicos, basadas en un conocimiento de la fitogenética, la morfología, la biología de la reproducción y la fisiología de las plantas han dado por resultado las prácticas empleadas actualmente por los fitogenetistas con el fin de garantizar la integridad genética de su material de experimentación. Dicha experiencia, y la que se ha adquirido en pruebas de campo controladas con plantas modificadas genéticamente, contribuyen a determinar características de las plantas y condiciones de los experimentos que permiten realizar sin riesgos investigaciones de campo en pequeña escala.

1. Las investigaciones de campo en pequeña escala con plantas modificadas genéticamente son análogas a las investigaciones de campo ya realizadas por fitogenetistas para la evaluación de nuevas variedades potencialmente útiles. Las modificaciones genéticas logradas mediante técnicas convencionales de fitomejoramiento han producido mutaciones de uno o de múltiples genes y cambios en el número de cromosomas, mediante: tratamientos químicos o radiaciones ionizantes; cruces entre cultivares de una especie de cultivo; y cruces interespecíficos, incluidos los cruces entre especies cultivadas, y cruces entre especies cultivadas y especies no cultivadas afines. Cuando se realizan investigaciones convencionales en genética vegetal, con frecuencia se presta atención a la prevención de posibles interacciones genéticas entre las plantas de la parcela de la investigación y cualquier planta compatible sexualmente que se encuentre cerca. No se ha demostrado la transferencia natural de material genético de plantas a otros organismos.

2. En las investigaciones de campo en pequeña escala se evalúan las características de una nueva variedad de planta y su interacción con el medio ambiente. Los experimentos de campo con nuevas variedades de plantas, producidas mediante métodos convencionales de fitomejoramiento, han demostrado que la mayoría de plantas nuevas, por lo general, son inferiores o, en el mejor de los casos, no son mejores que las variedades originales. Muchas plantas no son de utilidad práctica y son desechadas, sin que ello tenga efecto alguno sobre el medio ambiente ni sobre las actividades subsiguientes de fitomejoramiento. Solamente una proporción muy reducida de nuevas líneas de germoplasma, producidas por los fitogenetistas, permite la realización de más investigaciones o una posible comercialización.
3. Se han registrado algunos casos en que la introducción intencional o accidental de una especie de planta extranjera en un nuevo ambiente produjo efectos desfavorables desde el punto de vista ambiental. Algunos ejemplos de ello son : el sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*) que se introdujo en Carolina del Sur, EE.UU., como planta forrajera en el decenio de 1930; y el jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*) que se introdujo en Florida, EE.UU., como planta ornamental acuática. Muchas otras malas hierbas importantes (*Cirsium arvense*, *Cardus arvensis*, las *compositae* y las *convuláceae*), que existen actualmente en los EE.UU., son el resultado de la introducción accidental de especies de plantas extranjeras. En Europa, han surgido problemas similares debido a la introducción intencional o accidental de especies de plantas extranjeras tales como el girasol (*Helianthus annuus*) y las ambrosías comunes (*Ambrosia artemisiifolia*). Estos ejemplos suponen la liberación no controlada de un genoma completo, más que la transferencia controlada a las plantas de uno o varios genes, que es lo que sucede actualmente con los organismos genéticamente modificados. Por lo tanto, las pruebas de campo con plantas genéticamente modificadas, que se realizan de acuerdo con los principios para lograr PAD, no deberían ser consideradas análogas a la introducción de plantas extranjeras en un ambiente totalmente nuevo.

## **AISLAMIENTO REPRODUCTIVO DE PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS**

- 4. Con el objeto de prevenir efectos sobre el medio ambiente en los experimentos convencionales de fitomejoramiento se ha procedido al aislamiento reproductivo de las plantas en las parcelas de investigación, además de limitar la extensión de las parcelas. El empleo de prácticas para asegurar el aislamiento genético o reproductivo de las plantas modificadas constituye un excelente método para impedir la diseminación accidental de material genético de la planta del experimento hacia otros miembros de la misma especie o de especies afines.**
- 5. Al examinar los mecanismos naturales para el aislamiento genético o reproductivo en la evolución de especies de plantas, Stebbins (1950) destacó las características identificadas como "precigóticas" (que se manifiestan antes del apareamiento), ya que éstas, por lo general, pueden ser controladas manipulando las plantas del experimento o el ambiente en el que se han de introducir las plantas. Con esta forma de manipulación se puede lograr que la planta sea incapaz de producir o diseminar cualquier tipo de material genético (por vía de polen, semillas, etc.) que permitiría la incorporación permanente de nuevos genes en la reserva de genes de la especie.**
- 6. Al final de este apéndice, se presenta una lista de ejemplos que proporcionan cierta orientación para determinar los tipos de prácticas apropiadas en el aislamiento reproductivo. Al examinar estos ejemplos de prácticas utilizadas actualmente para lograr el aislamiento genético, deberá prestarse atención en cada caso a la forma en que una determinada práctica compensa una característica, ya sea de la planta, ya sea del medio ambiente, de la Investigación de campo. El resultado final del empleo de tales prácticas será el aislamiento reproductivo de las plantas experimentales genéticamente modificadas.**
- 7. La práctica de mantener un grado considerable de aislamiento reproductivo es utilizada actualmente por los fitogenetistas para llevar a cabo experimentos en genética vegetal y por los productores de semillas autorizados para producir semillas genéticamente puras. En estas prácticas se pone de relieve la**

prevención de la contaminación de las plantas utilizadas en el experimento o de las plantas utilizadas para la reproducción con material genético externo (en la mayoría de los casos por medio del polen), con el fin de mantener la pureza genética de la población que se utiliza en el experimento o de las plantas utilizadas en la reproducción con material genético. Si bien las prácticas utilizadas para proteger la pureza genética de una línea de reproducción difieren de aquellas utilizadas en las investigaciones de campo, donde se concede importancia al control de la dispersión del material genético de las plantas utilizadas en el experimento fuera de la parcela de la prueba, se aplican los mismos principios. Esos principios pueden ser utilizados para controlar con éxito la dispersión de material genético fuera de la parcela del experimento.

8. Las prácticas empleadas actualmente por los fitogenetistas y los productores autorizados de semillas, ofrecen modelos útiles para el aislamiento reproductivo en investigaciones de campo con plantas genéticamente modificadas. Dichas prácticas dan lugar al aislamiento espacial, mecánico, temporal y genético, que los biólogos evolucionistas utilizan para definir el aislamiento reproductivo de las poblaciones de plantas. En la mayoría de los casos, si la investigación de campo se realiza de manera que las plantas experimentales, genéticamente modificadas, permanezcan aisladas reproductivamente de la agrupación de plantas sexualmente compatibles fuera del sitio del experimento, se habrán logrado los objetivos de las PAD. Al utilizar PAD, las investigaciones de campo en pequeña escala con plantas genéticamente modificadas pueden realizarse con la relativa seguridad de que no producirán efectos perjudiciales significativos en el medio ambiente.
9. Si bien el aislamiento reproductivo probablemente constituya la principal preocupación en cuanto a seguridad, en la mayoría de experimentos de campo en pequeña escala, es posible que en algunos casos se tengan que tomar en cuenta algunas medidas para garantizar el aislamiento reproductivo, así como también otros factores. Por ejemplo, puede ser que las plantas utilizadas en las pruebas de campo hayan sido modificadas con el fin de que contengan o emitan toxinas, o que contengan vectores biológicos capaces de transferir material genético. En las dos

secciones siguientes se expone la naturaleza de los problemas que pueden surgir en los casos de las toxinas y de algunos vectores biológicos. Se señalan, asimismo, los factores que deberán evaluarse cuando se proyecta realizar ese tipo de prueba de campo.

## **PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS PARA CONTENER O EXPRESAR TOXINAS**

10. Muchas plantas contienen compuestos tóxicos. Algunos sirven de defensa contra los agentes patógenos y los predadores. Las técnicas de modificación genética pueden aumentar o reducir los mecanismos de defensa de una planta o pueden agregar a la planta nuevos componentes en cuanto a la defensa. Puede ser deseable desarrollar variedades de plantas que contengan compuestos tóxicos o que produzcan compuestos tóxicos naturales de la planta en niveles mucho más elevados de los que alcanzan naturalmente. En muchos casos, las investigaciones de campo con plantas que producen esas toxinas no suponen peligro, ya que se dispondrá de suficiente información acerca de la toxina que se introduce, la forma en que actúa, los posibles efectos de la toxina en organismos a los que está destinada y a los que no está destinada, y las técnicas para incorporar el gen o los genes que codifican características de la toxina en la planta.
11. Existen algunas posibilidades de riesgo ambiental en las investigaciones de campo, en pequeña escala, con plantas modificadas para que contengan toxinas, aunque el material genético de la planta se mantenga restringido al sitio del experimento. Esas plantas pueden afectar a los organismos que entran en el sitio, o pueden producir algunos efectos remanentes o no intencionales sobre los organismos a los que no estaban destinados y que se han visto expuestos a las plantas o a sus productos, después de que las plantas mismas han sido removidas del lugar del experimento. Es posible realizar investigaciones sin riesgos con plantas genéticamente modificadas para que contengan algún compuesto tóxico o para que emitan cierto compuesto tóxico natural en niveles más altos. Se debe disponer de suficiente información acerca de puntos como la forma de actuar, la persistencia y la degradación de la

toxina, con el fin de poder limitar sus efectos en los organismos susceptibles, en el sitio del experimento. Se pueden tomar otras precauciones tan sencillas como cercar el sitio. O tan complejas como situar el terreno del experimento en un lugar aislado, enjaular las plantas con que se realiza la prueba de campo o establecer medidas rigurosas que permitan dar razón de todo el material vegetal producido en la investigación de campo.

## PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS DE VECTORES BIOLÓGICOS

12. Existen diversos medios físicos, químicos y biológicos disponibles para transformar plantas con material genético nuevo. Estas técnicas incluyen el uso de la electroporación, la microinyección, los microproyectiles balísticos y los organismos biológicos o porciones de organismos biológicos (plásmidos). Las tres primeras técnicas citadas son procedimientos mecánicos que hacen improbable la transferencia accidental de material genético en cualquier momento que no sea el de la inserción inicial. Sin embargo, con los vectores biológicos existe la posibilidad de que el vector actúe posteriormente como agente infeccioso, a menos que pase a un estado biológicamente inactivo o sea eliminado de la planta transformada.
  
13. La seguridad de las investigaciones de campo en pequeña escala, con plantas que han sido transformadas mediante la utilización de vectores biológicos, aumenta cuando no hay probabilidad de que el sistema del vector transfiera material genético después de que se ha producido la transformación inicial. Si el vector presenta un riesgo de plaga para la planta (es decir, un riesgo de perjuicio, enfermedad o daño), ese riesgo debe eliminarse adecuadamente. En la mayoría de los casos, el vector deberá ser eliminado de la planta o desactivado una vez que se haya realizado la transformación. El ADN a utilizarse para desarrollar una planta genéticamente modificada debe: (a) estar bien caracterizado y no deben existir probabilidades de transmisión después de insertarse en la planta (el plásmido TI desarmado de *Agrobacterium tumefaciens* cumple esa condición); (b) transferirse de la misma especie (de la planta receptora) o de especies estrechamente relacionadas; o (c) transferirse de plantas procariontas no patógenas o de plantas

inferiores eucariotas no patógenas); o (d) transferirse de los agentes patógenos de las plantas solamente si se han eliminado las secuencias capaces de producir enfermedades o daños en las plantas.

14. Actualmente el sistema de vectores que más se utiliza para transferir ADN a las células de las plantas está presente de manera natural en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y usualmente se le conoce como plásmido TI. Se dispone ahora de un considerable caudal de información basada en experimentos realizados en condiciones de laboratorio e invernadero que demuestran la seguridad de este sistema de vectores. En la mayoría de las investigaciones de campo, realizadas hasta la fecha con plantas producidas a partir de técnicas de ingeniería genética, los sistemas de vectores derivados de *A. tumefaciens* han contribuido a suprimir físicamente los genes relacionados con la respuesta patológica a la infección. Además, las transformaciones se han llevado a cabo de manera tal que no se encuentra, en la planta transformada, ninguna secuencia de los vectores con poder patógeno y el agente vector, la bacteria, no sobrevive. De esta manera se elimina la posibilidad de que el vector pueda ocasionar alguna transferencia de material genético desde la planta modificada.
15. A continuación figuran ejemplos de prácticas utilizadas actualmente en experimentos con el fin de mantener el aislamiento reproductivo en las plantas:
  - i. El método más común utilizado para aislar a plantas, con respecto a poblaciones de plantas sexualmente compatibles, es la separación espacial. La mayoría de requisitos para cultivar semillas autorizadas incluyen ciertas condiciones referentes a la distancia entre terrenos donde existan plantas de la misma especie. La distancia específica que se requiere dependerá de la biología de las especies de que se trata. En el caso de las especies de autopolinización, cuyo polen es frágil, se requerirán distancias relativamente cortas, mientras que algunas especies de polinización abierta, o indirecta y con polen resistente, experimentarán cierto grado de contaminación

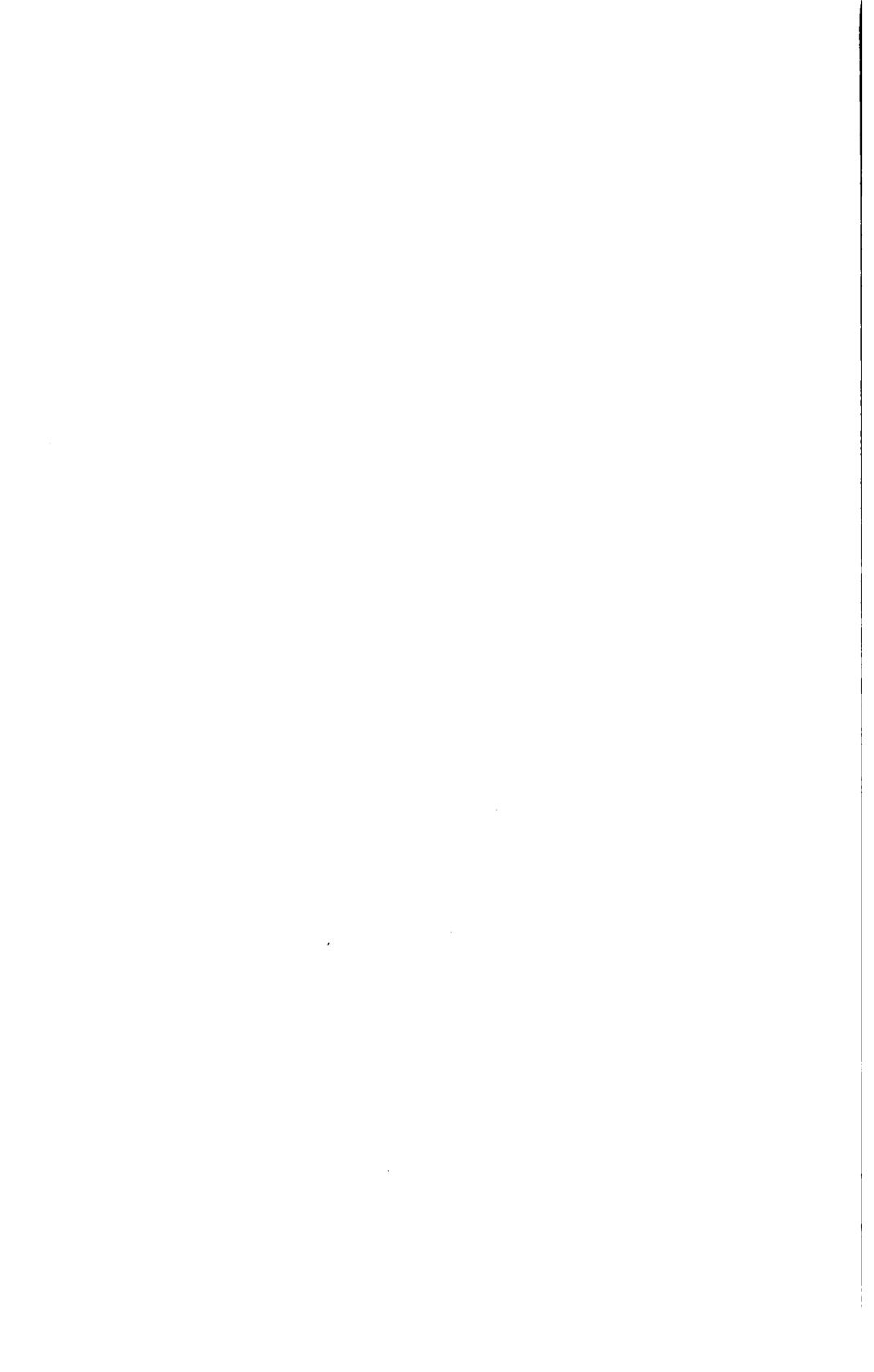
cuando se les separa de plantas compatibles por una distancia de varias millas.

- ii. En el caso de algunas plantas dioicas, la eliminación de las estructuras reproductoras masculinas o femeninas puede permitir, sin riesgo, el cultivo de plantas muy cerca de plantas compatibles. Un ejemplo, en que se utiliza este método, es la eliminación mecánica de las espiguillas en la producción de semilla para maíz. Con la eliminación de la espiguilla (que contiene el polen que producen las flores masculinas) se puede eliminar por completo la fuente de material genético masculino capaz de transferirse por medio del polen.
- iii. Una variación de la técnica mencionada consiste en incorporar en la planta de que se trata una característica citoplasmática de esterilidad masculina. Cuando esta característica está presente casi no se produce polen viable y la planta permanece prácticamente aislada, reproductiva y biológicamente hablando.
- iv. Sería posible cultivar las plantas en cuestión de modo tal que la floración se produzca antes o más tarde de lo que se espera en las plantas de cultivos compatibles o especies de plantas silvestres que se encuentran cerca. Este uso del aislamiento reproductivo temporal puede ser potencialmente tan eficaz como la separación espacial para limitar el movimiento del material genético. La diseminación del polen puede también prevenirse cubriendo físicamente las flores (con bolsas) en el momento previo de la antesis.
- v. Cuando los objetivos de un experimento de campo no requieren de la producción de semillas, como cuando se están evaluando las calidades forrajeras de la alfalfa, es posible cosechar plantas antes de la floración. En este caso, el aislamiento reproductivo podría lograrse en algunos cultivos de difícil aislamiento (normalmente por causa de la polinización entomógama).

**APENDICE V**

**PRINCIPIOS CIENTIFICOS PARA LAS INVESTIGACIONES DE CAMPO  
CON MICROORGANISMOS**

**Fuente: OECD (1990), Good Developmental Practices for Small  
Scale Field Research with Genetically Modified Plants and  
Microorganisms, Paris.**



## APLICACION EN EL MEDIO AMBIENTE

1. Uno de los principales supuestos para lograr las PAD, es que ciertos experimentos de campo en pequeña escala presentan una situación en que las cuestiones que se deben abordar se ven limitadas por la extensión relativamente pequeña del terreno del experimento, en comparación con las pruebas o la utilización en gran escala, o con una aplicación ilimitada. En investigaciones en pequeña escala, la frecuencia de la aplicación y el número de organismos aplicados, por lo general, serán más reducidos que durante pruebas en gran escala o la utilización comercial, y la investigación normalmente se realizará solamente en uno o en pocos lugares geográficos. Los resultados de la investigación de agentes de control biológico, como medio de control de plagas agrícolas, indican que la escala y la frecuencia de introducción parecen ser factores importantes para determinar si el microorganismo se establecerá y el efecto que tiene sobre el medio ambiente el microorganismo que se introduce.
2. En un experimento de campo restringido, el medio ambiente potencialmente afectado está, por lo general, más localizado y, por lo tanto, resulta más fácil identificar las consideraciones ecológicas y ambientales importantes que deberán evaluarse con el fin de diseñar un experimento sin riesgos. Además, debido a la pequeña dimensión del experimento, los procedimientos y diseños experimentales para aislar a los organismos pueden ser utilizados eficazmente.
3. Los métodos para aplicar el organismo y la cantidad de inóculo son consideraciones importantes para determinar las condiciones de seguridad de investigación de campo. La ubicación y naturaleza del sitio de aplicación y la magnitud de la aplicación son importantes para evaluar el aspecto de la seguridad.
4. Generalmente, los microorganismos se aplican en investigaciones de campo en pequeña escala como enmiendas del suelo, como rociado foliar o como inóculos que se introducen en los tejidos vasculares de las plantas. Si bien los organismos pueden ser introducidos mediante otros métodos, se espera que el proceso para evaluar las consideraciones de seguridad pertinentes sean similares en todos los casos. Por lo tanto, el debate sobre los

principios científicos puede centrarse en estos pocos, ya que son los que se utilizan usualmente.

5. Es de esperar que con la aplicación de métodos que suponen la creación de aerosoles haya una mayor dispersión de los microorganismos fuera del terreno del experimento. Por consiguiente, es posible que haya que tener en cuenta en el diseño de la investigación, zonas de demarcación relativamente amplias (fajas de tierra que sirvan de *buffer*) para un experimento en que se utilicen rociadores foliares. Por otra parte, podría reducirse al mínimo la formación de aerosoles, si se opta por el goteo en lugar de las aplicaciones o el riego por aspersión.

#### DISEMINACION, INCLUIDA LA SUPERVIVENCIA Y LA MULTIPLICACION EN EL MEDIO AMBIENTE

6. "La relativa capacidad del organismo de sobrevivir y multiplicarse en el ambiente en que se aplica, y de diseminarse a nuevos ambientes, es una consideración importante al evaluar las condiciones de seguridad de la liberación" (OCDE, 1986).
7. La mayor parte de los datos que constituyen la base para examinar las consideraciones siguientes y, por lo tanto, para elaborar un diseño apropiado de la investigación de campo, se basan en principios derivados de los estudios de agentes patógenos (sean plantas o mamíferos) o especies rizobíaceas. Se dispone de escasa información sobre la diseminación de organismos saprófitos (con excepción de algunos que interactúan con patógenos de las plantas, por ejemplo, *Agrobacterium rhizogenes*).
8. Estos estudios muestran que la diseminación depende de tres factores: (1) la tasa de crecimiento de la población (es decir, la supervivencia y la multiplicación); (2) las propiedades respecto del movimiento/dispersión de la población; y (3) la disponibilidad de hábitats o nichos adecuados. La diseminación se compone de los conceptos de "movimiento/dispersión" y "establecimiento". El "establecimiento" comprende "supervivencia y multiplicación", así como "movimiento/ dispersión".
9. En la evaluación de las investigaciones de campo, resulta

Imposible separar completamente el concepto de "dispersión" del concepto de "establecimiento"; más bien estos conceptos deben examinarse conjuntamente. Por ejemplo, si se admite que un organismo no llegará a establecerse, la dispersión fuera del terreno de experimentación será menos inquietante y los métodos para controlar la dispersión adquieren menor importancia. Por otra parte, si la dispersión fuera del terreno de experimentación es reducida, ya sea debido a las características del organismo del experimento o porque se han aplicado medidas para controlar el movimiento/dispersión, la probabilidad de establecimiento será menor.

#### **a. Tasa de crecimiento de la población**

10. La tasa de crecimiento de la población de un microorganismo utilizado en un experimento depende de diversos factores. Por el momento, no es posible describir todos los factores que influyen en la tasa de crecimiento de un microorganismo en el medio ambiente. Sin embargo, pueden formularse algunas predicciones en cuanto a un probable comportamiento, basadas en conocimientos existentes y observaciones empíricas obtenidas de varias fuentes: pruebas en invernadero, pruebas en microcosmos, conocimientos sobre el comportamiento de organismos estrechamente relacionados -por ejemplo, organismos originales(madre) y la función que se espera de la característica introducida, si el organismo del experimento ha sido modificado genéticamente-.
11. La posibilidad de que el número de microorganismos aumente en el sitio de aplicación es un factor importante que influye en la diseminación. Si un microorganismo no está en condiciones de aumentar su número en el sitio de la investigación de manera considerable, probablemente no tenga muchas posibilidades de diseminarse hacia otros sitios.
12. Esta predicción se basa en los supuestos de que los microorganismos deben existir en cantidades suficientemente elevadas en el sitio de la investigación, para poder dispersar hacia otros sitios el mínimo inóculo efectivo, y que se producirá cierto grado de dilución del inóculo cuando el microorganismo abandone el sitio de la investigación. La dilución probablemente

aumente a medida que el microorganismo se vaya alejando del lugar del experimento sin encontrar un hábitat adecuado. Estos supuestos se apoyan en estudios de patología de las plantas que han demostrado que la diseminación es directamente proporcional a la dimensión de la fuente de microorganismos (en este caso, se considera que la fuente es equivalente al número de microorganismos de la cepa de comprobación del sitio original de la investigación).

13. Cabe señalar que el número que constituye una inoculación mínima efectiva puede variar considerablemente de un organismo a otro y, por lo tanto, no se puede citar un número fijo de organismos como inóculo mínimo efectivo. Cabe suponer que para algunos organismos un número reducido de organismos constituiría un inóculo efectivo, mientras que para otros organismos será necesario un número mucho mayor.

El número de organismos que constituyen una inoculación mínima efectiva varía por diversas razones. En algunos casos, por ejemplo, la competencia u otras presiones (por ejemplo, la conducta predatoria) pueden ser superadas únicamente con el ingreso de una población numerosa. Por lo tanto, lo que constituye una inoculación mínima efectiva deberá determinarse en cada caso.

14. Sin embargo, con el establecimiento de medidas para reducir el número de microorganismos que abandonan el sitio de investigación, se reducirá la probabilidad de que el número de organismos suficientes para un inóculo mínimo efectivo llegue a otros sitios. Se puede diseñar un experimento, utilizando esas medidas en las investigaciones de campo en pequeña escala.

#### **b. Propiedades del movimiento/dispersión**

15. El ritmo de la diseminación es sumamente sensible a la eficacia del movimiento/dispersión. En general, parece que cuanto más eficaz sea el movimiento/dispersión, más rápido se producirá la diseminación.
16. La eficacia del movimiento/dispersión generalmente depende de varios factores. Entre ellos cabe destacar: la forma de

**movimiento/dispersión, el mecanismo empleado para lograr el transporte (incluida la capacidad de adherirse al suelo u otras partículas); la capacidad de infectar a vectores; la capacidad de adherirse a posibles medios de transporte mecánico (por ejemplo, animales, seres humanos y sus herramientas); la capacidad de sobrevivir durante el transporte. Estos factores dependen de las características biológicas del organismo utilizado en el experimento. Por lo tanto, al evaluar la seguridad de la investigación de campo deberán tenerse en cuenta las características biológicas del microorganismo utilizado en el experimento.**

- 17. Los microorganismos son transportados por diversas vías: (1) el viento; (2) el agua; (3) medios mecánicos (por ejemplo, seres humanos, insectos, animales); y (4) vectores biológicos.**
- 18. Si bien algunos microorganismos se dispersan por diferentes medios, puede ser que otros se limiten a uno o algunos medios de movimiento. En general, cuanto más se adapte el microorganismo a trasladarse por una vía, tendrá menos posibilidades de moverse mediante otras. La comprensión de las posibles vías de movimiento/dispersión, y el conocimiento y aplicación de métodos para limitar el movimiento/dispersión por estas vías, pueden utilizarse para diseñar investigaciones de campo seguras y ponen de relieve la necesidad del monitoreo.**

#### **(1) Dispersión por el viento**

- 19. En la eficacia de la dispersión aérea influyen varios factores; entre ellos, los mecanismos para entrar en la atmósfera (punto de partida), la forma de la partícula, la capacidad de sobrevivir a las tensiones impuestas por el medio ambiente (por ejemplo, la disecación, la luz ultravioleta), la capacidad de adherirse al suelo y a otras partículas. Algunos microorganismos tienen adaptaciones que les permiten dispersarse por el aire. Los ejemplos predominantes de microorganismos bien adaptados a la dispersión por el viento se encuentran entre los hongos. Muchos hongos normalmente producen propágulos en forma de esporas protegidas de daños, son elevados fácilmente por el aire cuando se dispone de una pequeña cantidad de energía y proporcionan suficientes reservas de energía para la penetración**

y la infección, una vez que el propágulo encuentra un blanco adecuado. Generalmente los hongos tienen adaptaciones estructurales que les permiten entrar en la atmósfera y dispersarse con el viento.

20. Estas adaptaciones son diversas. Varían desde procesos pasivos tales como la caída por gravedad hasta la transportación a grandes distancias. Otros microorganismos se dispersan por vía aérea utilizando medios pasivos. Por ejemplo, algunos microorganismos se adhieren a partículas del suelo. El viento levanta grandes cantidades de partículas de tierra o de polvo cuando el suelo se calienta con la radiación solar. Los microorganismos unidos a las partículas de tierra son transportados cuando el viento arrastra estas partículas. Algunos microorganismos se adhieren a insectos o ácaros, que luego pueden ser dispersados por las corrientes de viento.
21. La determinación de la posición del terreno de investigación puede ser utilizada para abordar y limitar la posible transmisión por vía aérea. Por ejemplo, puede prestarse atención a la ubicación del sitio de experimentación, de modo que las características naturales del paisaje, tales como los árboles, las colinas, los grupos de árboles para cortar el viento o los setos puedan ser utilizados para que influyan en las corrientes de viento.
22. Además, pueden utilizarse en el sitio de experimentación otros procedimientos, como asegurar que el suelo contenga suficiente humedad con el fin de evitar que el viento levante grandes cantidades de partículas de tierra.

## (2) Dispersión por el agua

23. En el agua, la dispersión se ve influenciada principalmente por las propiedades de transmisión del medio de suspensión. Por lo tanto, la hidrología del agua de los suelos, de las corrientes de agua subterránea, la proximidad de extensiones abiertas de agua (lagos, ríos, arroyos) y los sistemas de abastecimiento de agua para riego, se encuentran entre los principales factores físicos que determinan la dispersión por medio del agua desde el terreno donde se realiza el experimento.

24. La lluvia o el agua de riego pueden servir también como medios de transmisión. Las bacterias, los virus y las esporas, los esclerocios y los fragmentos micélicos de los hongos se pueden dispersar con la lluvia o el agua para riego que lavan la superficie de las plantas o corren sobre el suelo o a través de éste.
25. La lluvia al caer puede hacer que las gotas, que se encuentran en la superficie de las plantas, se diseminen en el aire, posiblemente cargadas de microorganismos. La dispersión por las salpicaduras de la lluvia ocurre cuando las gotas de agua caen con fuerza en la superficie de las plantas cubiertas con microorganismos. Por ejemplo, ciertas bacterias patógenas de las plantas, como *Xanthomonas malvacearum*, pueden dispersarse a lo largo de kilómetros con una lluvia torrencial.
26. El terreno de investigación puede diseñarse de modo que se pueda abordar y limitar la dispersión por esas posibles vías. Por ejemplo, se pueden utilizar zonas "tope", alrededor del sitio de investigación para aislar a las plantas dentro de la parcela de investigación. De ese modo, se puede prevenir que los microorganismos que están en las gotas de lluvia encuentren hábitats apropiados cerca del terreno del experimento. Hay que en cuenta también aspectos de diseño, tales como evitar un sistema de riego por aspersión o la inclusión de tuberías de drenaje en el terreno de la prueba.
27. Además, el terreno de investigación podría estar ubicado de modo que limitara el acceso del microorganismo hacia las aguas subterráneas o extensiones de agua, en condiciones climáticas normales o excepcionales.

### (3) Dispersión por medios mecánicos

28. Actividades humanas - Los seres humanos dispersan de diferentes maneras todo tipo de microorganismos, ya sea lejos o cerca de sí mismos. Dentro de un terreno, el ser humano dispersa microorganismos mediante el manejo continuo de plantas, el uso de herramientas y otro tipo de equipo contaminado, mediante el transporte de tierra, plantas, semillas

y material de viveros contaminados.

29. Las perturbaciones mecánicas, como la preparación del terreno, podrían levantar masas de tierra con una serie de microorganismos y dispersarlos en el aire. Con el viento, estas masas podrían llegar hasta el terreno de experimentación. Del mismo modo, cualquier actividad que genere aerosoles puede también crear una posible vía de dispersión para los microorganismos que se encuentran en las gotas del aerosol.
30. En las investigaciones de campo en pequeña escala se puede procurar limitar la dispersión de microorganismos mediante actividades humanas. Por ejemplo, el acceso al terreno de experimentación puede restringirse a las personas que hayan recibido capacitación con respecto a los procedimientos apropiados para limitar la dispersión. Las perturbaciones mecánicas pueden limitarse de diferentes maneras, como por medio de la selección del cultivo (por ejemplo, variedades que no requieren preparación del terreno) o de los procedimientos. Por último, el transporte de materiales contaminados puede restringirse mediante la aplicación de procedimientos apropiados.
31. Animales - En la naturaleza, diversos animales pueden entrar en contacto con vectores o servir de vectores de los microorganismos. Por ejemplo, las bacterias pueden transmitirse por los mamíferos al pastar y excavar la tierra, por los artrópodos terrestres, por las lombrices de tierra, por los terrones que se adhieren a las patas de los patos.
32. En las investigaciones en pequeña escala, se pueden adoptar medidas apropiadas para limitar el acceso de los animales a la zona del experimento. Por ejemplo, algunas de estas medidas podrían consistir en alambrear o cercar el sitio del experimento.
33. Otros - Los insectos pueden transportar microorganismos foréticamente. Sus cuerpos pueden cubrirse con bacterias o esporas micóticas pegajosas y, a medida que circulan entre las plantas, los insectos transportan los microorganismos en la superficie de sus cuerpos de una planta a otra. Luego, los microorganismos son depositados en la superficie de las plantas o en las heridas que los insectos ocasionan a las plantas cuando

se alimentan. Las heridas con frecuencia dan lugar a una mayor eficiencia en el establecimiento.

34. Existen otros métodos mediante los cuales puede producirse la dispersión pasiva. Por ejemplo, los microorganismos que colonizan flores y botones se pueden dispersar por medio del polen de las plantas. En vista de que los hongos y las bacterias están estrechamente asociados en la superficie de las plantas, existe la posibilidad de contaminación de los propágulos micóticos por medio de bacterias y éste podría ser un medio de dispersión aérea pasiva para las bacterias.
35. Estos posibles tipos de vectores pueden tenerse en cuenta, a menudo, en el diseño del experimento de campo. Por ejemplo, como se indica en la sección del presente documento que trata sobre las plantas, existen varios métodos para tratar la producción y la dispersión de polen.

#### (4) Vectores biológicos

36. Los microorganismos pueden ser transmitidos por los insectos durante la alimentación y el traslado del insecto de una planta a la otra. Por definición, el insecto vector y el microorganismo establecen una relación específica. El vector transporta al microorganismo de un lugar a otro y lo deposita eficazmente (usualmente al herir a la planta) donde éste puede establecerse. Si bien existen algunas excepciones, cuanto más adaptada y específica sea la relación vector/microorganismo, hay menos probabilidades de que el microorganismo sea transportado por otros vectores.
37. La relación entre el vector y el microorganismo puede ser persistente (circulativa y propagativa) o no persistente. El tipo de relación vector/microorganismo persistente o circulativa se produce cuando el insecto está en condiciones de transportar al microorganismo durante un período de tiempo prolongado, y el microorganismo puede multiplicarse en el insecto. El tipo no persistente se refiere a una relación en que el vector adquiere el microorganismo después de un corto período de alimentación en la planta, transmitiendo el agente a otra planta en forma inmediata después de la alimentación y luego, rápidamente (en

minutos), pierde al microorganismo.

38. Los insectos vectores comunes son: los áfidos y las chicharritas (*Cicadelledae*, *Jassidae*), aunque las mosquitas blancas (*Aleyrodidae*), los cóccidos, los coleópteros, los dípteros, las moscas (*Psilidae*), los trips, los ácaros y otros insectos han sido documentados como vectores. Los áfidos y las chicharritas son, con mucho, los vectores más importantes de los virus de las plantas y los micoplasmas (bacterias sin paredes celulares).
39. Los insectos pueden transportar microorganismos recorriendo distancias cortas o largas. Los insectos como las chicharritas son fuertes voladores. Algunos insectos, como los ácaros, no pueden volar pero pueden ser transportados pasivamente por el viento. Aun los insectos que no son fuertes voladores pueden dispersar microorganismos a grandes distancias, ya que estos insectos recorren cientos de kilómetros transportados por el viento.
40. El diseño de investigaciones de campo es útil para tratar el posible transporte de microorganismos empleados en el experimento por los insectos. Por ejemplo, si se sabe que el microorganismo de que es objeto el experimento se transmite por áfidos, una elección sensata del sitio permitirá ubicar el experimento a una altura en que los áfidos no estén presentes o cuando el nivel de la población de áfidos sea bajo. Además, en el diseño del experimento se podrían utilizar también métodos como el de usar repelentes contra los áfidos o impedir el acceso de vectores a las plantas, mediante el uso de mallas.

### c. Disponibilidad de hábitats adecuados

41. Una de las consideraciones más importantes para determinar si un microorganismo será diseminado consiste en saber si existen los hábitats o nichos en que el microorganismo podría establecerse.
42. La distribución y el número de posibles hábitats en una zona a la que posiblemente se traslade/disperse el microorganismo son importantes factores que determinan el establecimiento. El número, la distribución, la dimensión y la susceptibilidad de los

hábitats influyen en la probabilidad de que un microorganismo logre encontrar y establecerse en un hábitat adecuado.

43. Si la densidad de los posibles hábitats es baja y los hábitats están separados por distancias relativamente importantes, la probabilidad de que se logre con éxito la diseminación se verá considerablemente reducida y, de hecho, quizás se aproxime a cero. En la agricultura se utilizan estrategias basadas en la densidad del hábitat con el fin de controlar la diseminación de agentes patógenos. Por ejemplo, se pueden sembrar terrenos con "multilíneas" de un cultivo. Las "multilíneas" consisten en muchas variedades diferentes de la especie del cultivo, donde cada variedad posee un gen diferente para resistir al agente patógeno. En vista de que no existe una densidad suficiente de hábitats adecuados (plantas susceptibles) para el patógeno, éste no se disemina en forma epidémica.
44. La fase de diseño del experimento en una prueba de campo en pequeña escala puede aprovecharse para abordar, en cierta medida, la cuestión de la densidad y la distribución de los hábitats potenciales. Por ejemplo, la ubicación del sitio de la prueba puede seleccionarse sobre la base de la distribución y la dimensión de los probables hábitats potenciales de la región donde se ha de realizar el experimento. Esta táctica se emplea con frecuencia en los estudios de campo de fitomejoramiento con patógenos de las plantas. Por lo tanto, en el diseño del experimento se puede emplear la estrategia de "aislamiento geográfico".
45. Se pueden emplear otras estrategias en la zona próxima al sitio de la investigación que ayuden a limitar los posibles hábitats adecuados y controlar así la diseminación. Por ejemplo, en un reciente experimento de campo realizado con una especie rizobiácea, las plantas leguminosas silvestres que podrían haber sido huéspedes/hábitats adecuados fueron eliminadas de un radio de 50 metros alrededor del sitio de la investigación.

#### **d. Multiplicación y supervivencia**

46. Como se indicó en la sección anterior, la supervivencia y la multiplicación del microorganismo utilizado en el experimento son

importantes para producir una reserva de microorganismos que permita la diseminación. Para poder aumentar su número en el lugar de introducción, el microorganismo del experimento deberá estar en condiciones de competir eficazmente con otros organismos del sitio de la investigación, o deberá buscar un nuevo nicho sin competidores o con menos competidores eficaces.

47. El fenómeno de (1) competencia y (2) selección son consideraciones importantes para evaluar una propuesta y diseñar investigaciones de campo sin riesgos. En el presente documento, el fenómeno de "buscar un nuevo nicho" se abordará como un aspecto de la selección.

#### (1) Competencia

48. Se llama "competencia" a las interacciones negativas dentro de una comunidad microbiana de un hábitat. El término competencia se emplea aquí en un sentido amplio, de modo que incluya la competencia por los substratos disponibles y otras interacciones negativas, como las que resultan de la producción de sustancias tóxicas. Los miembros de una comunidad microbiana de un hábitat pueden utilizar los mismos substratos y ocupar el mismo nicho. La competencia se produce cuando varias poblaciones luchan por el mismo recurso, ya sea espacio, luz, huéspedes o una limitada sustancia nutritiva. En los hábitats naturales, donde la concentración de substratos disponibles es muy baja, se produce una intensa competencia.
49. Microorganismos del suelo de vida libre. La mayor parte de la información sobre microorganismos del suelo de vida libre se ha obtenido de la experiencia con especies rizobiáceas y enmiendas microbianas utilizadas como agentes de control biológico. Esta experiencia muestra que, al final de la temporada de cultivo, el microorganismo agregado por lo general no predomina. Para explicar estas observaciones, se ha formulado la hipótesis de que los organismos de la enmienda microbiana deben competir con una flora autóctona debidamente adaptada a las condiciones locales, y no resultan eficaces en esta competencia.

50. Un microorganismo debe enfrentarse a numerosos factores cuando se le coloca en el ambiente del suelo. Esos factores incluyen: numerosos competidores debidamente adaptados (ya que el suelo es un ambiente complejo en que abundan diversos tipos de organismos); las tensiones impuestas por el medio ambiente (por ejemplo, las sustancias químicas, el agua y la temperatura); varios niveles de predación; la competencia por los recursos; y la antibiosis.
51. Los microorganismos proliferan cuando hay elementos nutritivos disponibles y cuando los niveles de temperatura y humedad son adecuados. Sin embargo, aun cuando los elementos nutritivos abundan, los habitantes del suelo deben competir por ellos. En una situación de relativa abundancia, aquellos que experimentan la tasa de crecimiento más alta tienen ventaja en la competencia. La situación más frecuente es que los elementos nutritivos sean escasos y, con frecuencia, los organismos pueden sobrevivir a largos períodos de hambre. En esta situación, las poblaciones de mayor capacidad para sobrevivir en las condiciones de tensión serán generalmente las que lleven la ventaja en la competencia. Los organismos que producen estructuras resistentes (como las esporas y los esclerocios) son los que mejor se adaptan para subsistir en condiciones adversas que resultan de períodos prolongados de hambre y tensiones impuestas por el medio ambiente. Algunas especies han desarrollado estrategias mediante las cuales sobreviven durante largos períodos de tiempo como células vegetativas.
52. La antibiosis ocurre cuando una población microbiana produce una sustancia inhibitoria para otras poblaciones. Algunos ejemplos de antibiosis comprenden la producción para eliminar a los competidores y la producción de sustancias como ácido láctico o sulfúrico, alcohol, ácido acético y ácidos orgánicos de bajo peso. La producción de antibióticos probablemente tenga una función significativa en las interacciones competitivas en los microambientes. La estrategia complementaria de competencia consistiría en poseer una resistencia inherente a los antibióticos producidos por otros organismos. Las bactericinas y las toxinas biológicas pueden también eliminar a las poblaciones de fitopatógenos del suelo, y probablemente existan estrategias microbianas para hacer frente a esas sustancias.

53. La predación puede ser también un factor que influya en la supervivencia microbiana y los niveles de población. Los nemátodos y protozoos de vida libre están presentes en muchos suelos y probablemente sean predadores de microorganismos. Si bien no se ha determinado el efecto de estos predadores sobre las poblaciones microbianas, es probable que tales microorganismos hayan desarrollado estrategias para hacer frente a la predación.
54. El suelo es una matriz compleja que presenta un ambiente sumamente competitivo. La interacción de los factores anteriormente descritos, y la respuesta de las especies ante ellos, crea un equilibrio de vida en el suelo que afectará la capacidad de competencia comparativa de los microorganismos aplicados.
55. Microorganismos ligados al huésped. En el presente documento se llama microorganismos ligados al huésped a los microorganismos que dependen de un huésped para sobrevivir. La mayor parte de la información disponible, relativa a los factores que afectan la capacidad de competencia de los microorganismos ligados al huésped, ha sido obtenida de estudios de microorganismos como agentes de control biológico y de la patología de las plantas, así como del fitomejoramiento.
56. En la interacción microorganismo/planta, los microorganismos ligados al huésped pueden ser epifitos (en la superficie de la planta) o endófitos (dentro de los tejidos de las plantas) o de ambos tipos.
57. Los endófitos tienen pocos competidores (otros patógenos de las plantas o posiblemente invasores secundarios de los tejidos enfermos), cuando se comparan con los epifitos o microorganismos del suelo de vida libre. Los endófitos como los virus, viroides y algunas procarlotes (por ejemplo, las bacterias similares a la rickettsia, micoplasmas y espiroplasmas) existen solamente dentro de su huésped o vector y raras veces, si acaso, sobreviven cuando se ven expuestas al ambiente externo. Por lo tanto, el ambiente en el que deben competir está determinado en gran medida por el huésped. Aunque es posible que tengan menos competidores microbianos, los endófitos

tienen que hacer frente a las defensas de los huéspedes.

58. Los microorganismos epífitos ligados a las plantas se pueden clasificar por categorías según el tipo de relación nutricional que mantienen con el huésped. Durante su permanencia o fase epífita sobre las hojas o las raíces, ciertos microorganismos ligados a los huéspedes existen principalmente, si no completamente, en un aparente estado de comensalismo con la planta. Estos obtienen sus elementos nutritivos de la planta (cuando la hoja o la raíz exuda) pero no le causan ningún daño. Sin embargo, si se dan las condiciones apropiadas, pueden matar y destruir los tejidos del huésped mediante la acción de toxinas y enzimas y luego multiplicarse en el tejido muerto.
59. En el segundo tipo de relación nutricional, el microorganismo ligado al huésped obtiene los elementos nutritivos de una planta, matando el tejido del huésped antes de la colonización.
60. Muchos de los factores que afectan la competencia entre microorganismos del suelo de vida libre pueden observarse en los microorganismos ligados a un huésped. Esos factores comprenden la competencia por el espacio, la competencia por los elementos nutritivos, la predación, las presiones impuestas por el medio ambiente y la antibiosis. Además de hacer frente a esos factores, los microorganismos tanto epífitos como endófitos ligados a un huésped deben también encontrar y colonizar/infectar huéspedes apropiados. La necesidad de que los microorganismos ligados a un huésped encuentren huéspedes apropiados es un factor que se puede tener en cuenta para la elaboración de un protocolo de experimentos, con el fin de realizar pruebas sin riesgos con dichos organismos.

## (2) Selección

61. La presión de selección se ejerce por el medio ambiente y favorece a los organismos que poseen características adaptativas. Los ejemplos más conocidos de selección en los microorganismos es la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos. La selección de cepas resistentes se estimula por el uso de antibióticos por parte de médicos clínicos, en el alimento de animales y con fines agrícolas. Otro ejemplo de

selección es el aumento en el número de microorganismos capaces de degradar ciertos compuestos orgánicos sintéticos creados por el hombre (como los pesticidas). En este caso, la selección es promovida por la introducción en el medio ambiente de grandes cantidades de esos compuestos artificiales.

62. Para los fines del presente documento, el "descubrimiento de un nuevo nicho" se trata como una forma de selección. Ello ocurre cuando un microorganismo desarrolla la capacidad de desempeñar una "nueva" función dentro de un ecosistema. Esto puede ocurrir, también, cuando se introduce en un ecosistema un microorganismo que desempeña una función que la comunidad autóctona no desempeña (por ejemplo, la introducción de *Ceratocystis ulmi* en el continente norteamericano).
63. Las presiones de selección afectan la capacidad de los organismos de sobrevivir, multiplicarse y aumentar su proporción relativa en la comunidad. Por lo tanto, la selección puede ejercer una influencia importante en el movimiento/dispersión y el establecimiento, así como en la supervivencia y la multiplicación del organismo.
64. Resulta obvio que al evaluar la probabilidad de que un microorganismo que se introduce sea un competidor eficaz, se vea favorecido por la selección o encuentre un nuevo nicho, deban examinarse varios factores. Estos incluyen la fuente del organismo del experimento y la fuente del gen añadido, si lo hubiere, y el medio ambiente en que se realizará el experimento. En muchos casos, se realizarán experimentos con el microorganismo en el agro-ecosistema del que habían sido aislados sus microorganismos originales. En este caso, ni el gen introducido ni el microorganismo introducido serán nuevos o únicos en su género en ese ambiente, aunque la frecuencia con que se produzca la combinación gen/microorganismo en el sitio, después de la aplicación, quizás sea diferente de la que generalmente se ha observado.
65. La combinación gen agregado/microorganismo entrará a competir con la población autóctona de microorganismos. Si bien esto no garantiza que la combinación gen

agregado/microorganismo sea un competidor eficaz en el ambiente del experimento, de hecho establece ciertos límites con respecto al tipo de situaciones hipotéticas de riesgo que deben tenerse en cuenta. En este tipo de investigación, el conocimiento de la función del gen agregado y el comportamiento de los organismos originales pueden ser utilizados para predecir la reacción probable de la combinación gen/microorganismo ante factores como la competencia por elementos nutritivos, la predación y las tensiones impuestas por el medio ambiente, la selección y la antibiosis.

66. Sin embargo, habida cuenta de los conocimientos actuales, la capacidad de competencia del microorganismo utilizado en el experimento deberá, con frecuencia, probarse empíricamente. Por lo tanto, los datos que se obtengan en laboratorios, invernaderos o microcosmos posiblemente constituyan un importante elemento en una evaluación de las investigaciones de campo en pequeña escala.
67. El hecho de que el inóculo empleado en las investigaciones de campo limitadas, en pequeña escala, a menudo sea insignificante cuando se compara con la población autóctona, también desempeña un papel en la determinación del probable resultado final de la combinación gen/microorganismo. Cuando se añaden cantidades relativamente pequeñas de la combinación gen/microorganismo a un sitio de experimentación, es probable que la población autóctona obtenga la ventaja en la competencia. Además, cuando la aplicación comprende un número relativamente reducido de microorganismos, es menor la probabilidad de que exista suficiente variación genética de la que se puedan seleccionar genotipos.
68. En algunos casos, el microorganismo o el gen agregado puede aislarse de otros ambientes que no sean el del sitio de la investigación. En esta situación, la cuidadosa comparación de la capacidad de competencia de la combinación gen/microorganismo puede basarse en investigaciones realizadas en ambientes controlados (invernaderos, microcosmos, etc). La función que se espera del gen agregado y el comportamiento del microorganismo original receptor también son consideraciones importantes. Un diseño ambiental apropiado deberá tener en

cuenta tales consideraciones.

69. El siguiente ejemplo permite ilustrar el método. En 1987/88, en los EE.UU. se realizó un experimento de campo con *Pseudomonas aureofaciens* modificadas, con el fin de que tuvieran genes de *Escherichia coli* K-12 que codifican la característica para la producción de lactosa permeasa y beta-galactosidasa (lacZY). Esta modificación permite que el organismo crezca sobre lactosa, a diferencia de otras pseudomonas. Durante la evaluación del riesgo del experimento de campo limitado, se evaluó la probabilidad de que la modificación concediera una ventaja a esas pseudomonas en la competencia o la selección. Una predicción, según la cual la modificación no concedería una ventaja en la competencia, se basó en parte en: (1) la expectativa de que los genes insertados proporcionan la capacidad de metabolizar sólo una cantidad limitada de azúcares (principalmente lactosa, con la posibilidad de que la manosa y la xylosa sirvan de sustratos); (2) el hecho de que pocos sitios favorecerán al organismo del experimento (es decir, los sustratos usualmente disponibles serán limitativos, pero la lactosa será abundante en caso de que el organismo se disperse fuera del terreno del experimento); (3) los estudios que documentan bajos niveles de supervivencia de la cepa madre y los estudios realizados en invernaderos indican que no hay diferencia en la capacidad de supervivencia de las cepas utilizadas en la prueba y las cepas madre, lo que indica que el organismo modificado no será un competidor muy eficaz; y (4) la naturaleza restringida del experimento en pequeña escala.
70. La dimensión del experimento de campo fue un aspecto importante en la evaluación de la capacidad de competir y la probabilidad de que la selección favoreciera a las pseudomonas lacZY. Se establecieron varias condiciones para el experimento de campo con el fin de controlar las posibles vías de dispersión y se puso en marcha un programa de supervisión.

#### INTERACCIONES DEL MICROORGANISMO CON OTRAS ESPECIES O SISTEMAS BIOLÓGICOS EN EL MEDIO AMBIENTE

71. Los microorganismos utilizados en las investigaciones de campo en pequeña escala pueden interactuar de diferentes formas con

otras especies. En el informe sobre "Consideraciones de Seguridad Relativas al ADN Recombinante" de la OCDE, se señalan dos tipos concretos de interacción que son: 1) los efectos de los microorganismos en los organismos a los que están y a los que no están destinados; y 2) las posibilidades de transferencia horizontal de material genético y sus efectos. En esta sección se examinan esos dos tipos de interacción y se hace un primer intento de describir varios aspectos de ellos. Estas consideraciones también pueden ser aplicadas al diseño de las investigaciones de campo.

**a. Organismos a los que están o no dirigidos los microorganismos**

72. Muchos de los microorganismos con que se experimenta en las pruebas de campo tienen el propósito de producir efectos sobre otro organismo, el organismo al que está dirigido (blanco). Durante décadas, los fitopatólogos han utilizado en el campo microorganismos que causan enfermedades a las plantas, con el objeto de evaluar la resistencia de las plantas a esas enfermedades. Se han realizado también experimentos de campo con otros patógenos de las plantas para adquirir conocimientos fundamentales acerca de la biología y el poder patógeno de dichos microorganismos. Los microorganismos utilizados como agentes de control biológico se seleccionan o se modifican específicamente para que afecten al organismo que produce una plaga determinada. Algunos microorganismos como el *Bacillus thuringiensis* se utilizan habitualmente en el medio ambiente como agentes de control biológico de algunos insectos lepidópteros. Se han realizado investigaciones limitadas, en pequeña escala, utilizando microorganismos no modificados que han tenido pocos efectos adversos para el medio ambiente, aun cuando se tiene información de que esos microorganismos producen efectos conocidos sobre otros organismos de ese mismo ambiente. Las cuestiones que normalmente se estudian en estas pruebas son instructivas para los experimentos con microorganismos genéticamente modificados.
73. Cuando se experimenta con un microorganismo, es importante no sólo evaluar el efecto esperado sobre el organismo al que está destinado sino también los efectos sobre los organismos a los que no está destinado. Cuando se recurre a la Ingeniería

genética para modificar microorganismos para que actúen como agentes de control biológico, los genes que se insertan pueden codificar características de toxinas o pueden ampliar el campo de acción en el huésped o aumentar la virulencia en el microorganismo con respecto a un determinado organismo. El efecto de una nueva característica en el campo de acción del huésped del microorganismo debería ser evaluada en el laboratorio, antes de realizar el experimento de campo. Los posibles organismos a los que no está dirigido deberían determinarse mediante experimentos con especies representativas bajo condiciones controladas. En general, es poco probable que la relativa abundancia de una especie en una comunidad o ecosistema sea modificada significativamente como consecuencia de una investigación de campo en pequeña escala, si el microorganismo puede limitarse eficazmente al terreno y sus alrededores. Sin embargo, es importante que la investigación de campo se lleve a cabo de modo que se limite el efecto sobre especies sensibles a las que no está destinada.

74. Estos conceptos pueden aplicarse a ejemplos concretos. Los experimentos con nuevas cepas de *B. thuringiensis* deberán realizarse en un terreno en que las especies de insectos lepidópteros, amenazadas o en peligro, no se vean expuestas a la endotoxina delta producida por la bacteria. Es indispensable realizar cuidadosamente pruebas con insectos benéficos para determinar su sensibilidad a los microorganismos del experimento y limitar el riesgo de poblaciones significativas de insectos benéficos sensibles.

#### **b. Transferencia de genes**

75. La capacidad de transferencia de genes de un microorganismo producido con técnicas de ingeniería genética o la estabilidad de la estructura genética afectarán la interacción del microorganismo con otros microorganismos. La transferencia de genes se refiere a la diseminación de material genético, mediante mecanismos genéticos naturales.
76. Los factores que han de tenerse en cuenta, al analizar los efectos respecto de la seguridad en la transferencia de genes de un microorganismo genéticamente modificado, son los siguientes:

- (1) ¿Cuál es la probabilidad de transferencia horizontal del material genético?
- (2) Si el gen se transfiere, ¿se mantendrá o expresará la nueva información genética?
- (3) Si se conoce, ¿qué características codifica el material transferible?
- (4) Si el microorganismo transformado se traslada más allá del punto de introducción, ¿cómo afectará esto, como resultado de la transformación, a las poblaciones o comunidades de plantas, animales y microbios autóctonos de los alrededores?

77. La transferencia de genes se refiere a la diseminación de material genético por medio de mecanismos genéticos naturales. Los mecanismos mediante los cuales se transfieren los plásmidos o los genes cromosómicos comprenden: la conjugación, la transformación, la transducción y la fusión celular. Si bien esos mecanismos han sido estudiados en el laboratorio, se dispone de poca información acerca de la frecuencia del intercambio genético en la naturaleza. Se supone, lógicamente, que la frecuencia de la transferencia de genes es menor en la naturaleza si se compara con la del laboratorio, aunque la frecuencia en la naturaleza no ha sido estudiada ampliamente. Se han documentado algunos intercambios de material genético en la naturaleza o en ambientes naturales simulados.
78. Para formular predicciones precisas acerca de la diseminación o la fuga genética, es necesario conocer la frecuencia de la transferencia de genes. Sin embargo, es posible hacer algunas generalizaciones con respecto a la transferencia de genes en hábitats simulados o naturales. La transferencia de genes se produce con menor frecuencia en hábitats terrestres y acuáticos que en los sistemas de cultivo *in vitro*.
79. Otros factores que pueden afectar la transferencia son la presencia o la ausencia de: i) grandes densidades de bacterias que aumentan el apareamiento; ii) ADN libre que puede promover

la transformación; y iii) materiales arcillosos o minerales que pueden promover el crecimiento y la transferencia de plásmidos pero no la transducción. La presencia de un elevado número de copias de plásmidos con un amplio campo de acción en el hésped puede ofrecer más oportunidades de dispersión, y el número relativamente elevado de células donantes facilita la transferencia a los receptores. Además, otros factores que afectan la transferencia son: las separaciones espaciales, temporales y fisiológicas de las bacterias; la inmovilización, mediante la adherencia a las partículas de tierra, materiales orgánicos y otros organismos vivos; las barreras genéticas, tales como los sistemas de restricción y la incompatibilidad de plásmidos; y las condiciones ambientales.

80. Se han formulado, sobre la base de consideraciones similares, estimaciones con respecto a la frecuencia de las transferencias que probablemente se puedan observar en ambientes específicos. Sin embargo, la frecuencia con que probablemente se produzca la transferencia genética y la significación de dicha transferencia, en comparación con las transferencias que se producen en la naturaleza, por el momento quizás tengan que ser evaluadas, en cada caso, por separado.

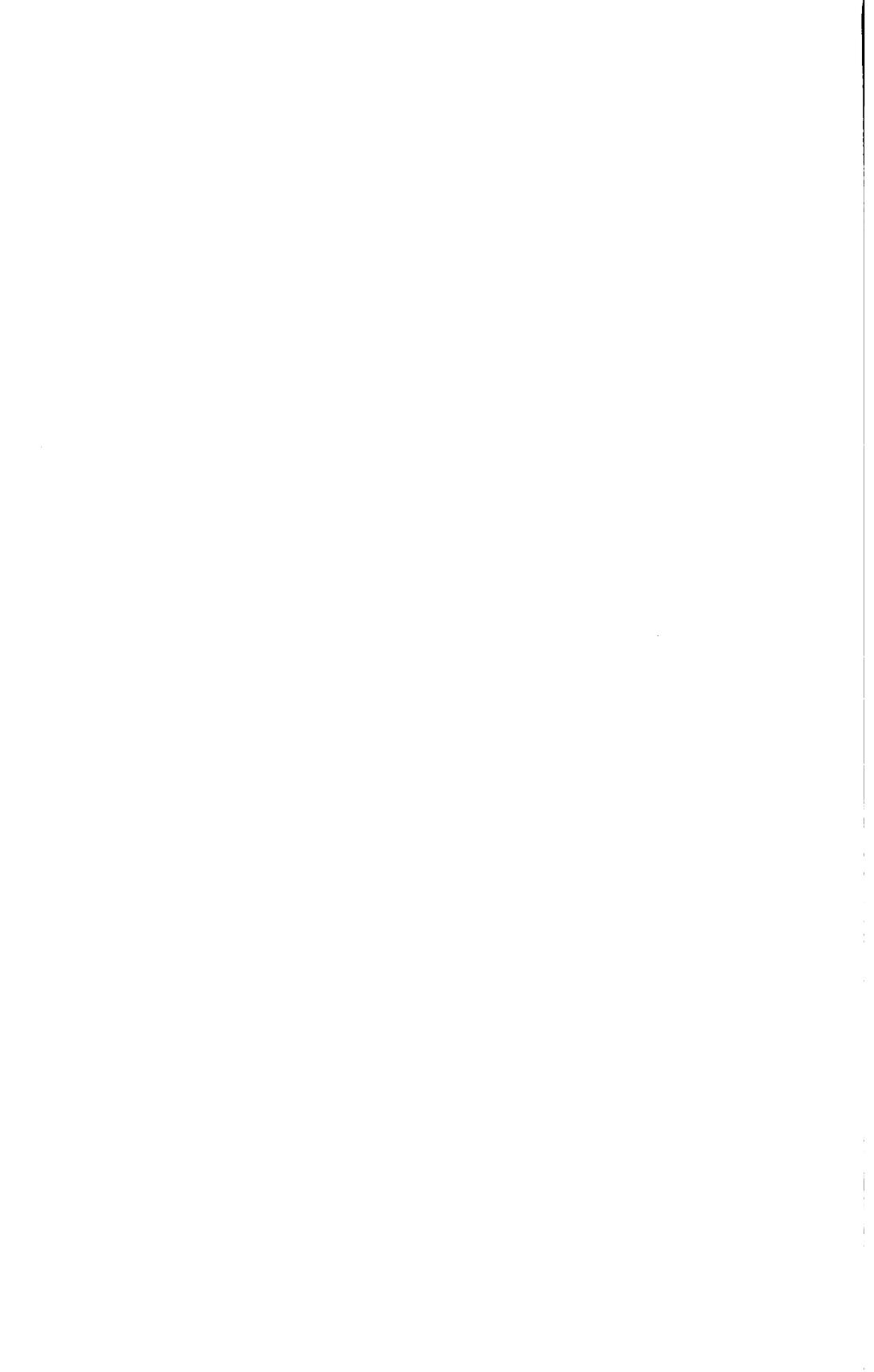
#### EFFECTOS DE LA INVESTIGACION DE CAMPO EN EL MEDIO AMBIENTE

81. El informe titulado "Consideraciones de Seguridad Relativas al ADN Recombinante", de la OCDE, describe los factores que deben tenerse en cuenta al evaluar los efectos potenciales sobre el medio ambiente, tales como : (i) los efectos sobre otros organismos, como el poder patógeno, la infectividad y los efectos sobre los competidores, depredadores, huéspedes, simbiotes, etc.; (ii) la participación conocida o prevista en los procesos biogeoquímicos, tales como los ciclos de los minerales, la fijación de nitrógeno, etc.; (iii) la estabilidad genética o fenotípica de los organismos liberados; (iv) la probabilidad de transferir material genético a otros organismos del ecosistema; (v) el efecto de un excesivo aumento en el número de organismos después de la aplicación.
82. Sin embargo, las restricciones que se impondrán a la investigación de campo tienen como finalidad concreta reducir

la posibilidad de que se produzcan efectos ambientalmente perjudiciales.

#### **VIAS DE TRANSMISION DE LOS VIRUS, BACTERIAS Y HONGOS**

- 83.** Muchas bacterias se adaptan extraordinariamente a la transmisión pasiva por medio de la lluvia que esparce el viento, las semillas, los insectos, el material propagado vegetativamente, el agua de riego, los aperos de labranza u otros agentes. La dispersión atmosférica, en su mayor parte, se produce como consecuencia de perturbaciones físicas accidentales y en gran parte parece equivalente a la dispersión de las partículas y los organismos a los que se adhieren las bacterias. Los micoplasmas pueden ser dispersados por mecanismos similares.
- 84.** Los virus de las plantas se dispersan principalmente por medios mecánicos, ya sea mediante la propagación de las plantas, el contacto humano o por los insectos vectores. La mayoría de virus de las plantas no cuentan con un mecanismo específico para la transmisión aérea.
- 85.** Las algas y los protozoos no disponen de mecanismos especiales para la dispersión aérea, pero son dispersados por animales vectores o perturbaciones físicas accidentales. En general, no se han estudiado los procesos mediante los cuales se dispersan las levaduras por vía aérea, aunque éstas abundan en el aire. Las características del microorganismo utilizado en el experimento afectan la probabilidad de que ese microorganismo sea transportado fuera del terreno de investigación.



## **APENDICE VI**

### **INFORMACION EXIGIBLE EN LAS SOLICITUDES PARA PRUEBAS DE CAMPO DE PLANTAS MODIFICADAS GENETICAMENTE**

**Fuente: Kalous M.J.; Duke L.H. (1989). The Regulation of  
Plant Biotechnology in Canada. Part 2, The Environmental  
Release of Genetically Altered Plant Material. Seed Division,  
Agricultural Canada, Ottawa, Ontario, pp. 20-26.**



## INFORMACION SOLICITADA

La información que se pide en las solicitudes, en lo referente a las pruebas de campo de material vegetal genéticamente alterado, está basada en información que los científicos habrán reunido con base en experimentos de laboratorio y en la preparación del protocolo de liberación en el ambiente. Al excluirse requisitos exagerados para las pruebas, podrá reducirse enormemente la carga financiera que supone llenar una solicitud. La información de una solicitud se considera confidencial y no se revela a otros representantes de la industria o investigadores. En caso de que haya una consulta pública, la compañía o el investigador serán consultados para identificar información propietaria y ella no será revelada.

### 1. Material vegetal

El material vegetal debe ser completamente caracterizado. Debería incluirse en la solicitud el nombre de la especie y una breve descripción botánica. Debe hacerse referencia a la posibilidad de polinización cruzada con miembros de la misma especie y con parientes autóctonos, así como los mecanismos de propagación de semillas y los períodos de vida latente o inactividad.

### 2. Donante del gen, el gen y el producto genético

Debe incluirse, cuando proceda, una breve descripción de la especie donante del gen vegetal. La descripción deberá ser autosuficiente para que el ente regulador pueda determinar posibles problemas, tales como la producción de toxinas o la aparición de rasgos de malezas.

Deberán identificarse el gen insertado y sus promotores y terminadores. Actualmente se desarrolla un debate entre entidades reguladoras nacionales en cuanto a si deben proporcionarse secuencias pares de bases. Existen también ciertas dudas en cuanto a si deberían proporcionarse además secuencias promotoras y terminadoras, puesto que se conoce poco de los posibles efectos de los reguladores integrados virales o microbianos en el ADN integrado o nativo.

Si fuesen conocidos, deberán identificarse el producto genético y la vía afectada. El efecto del producto genético en el material vegetal (por ejemplo: resistencia a los insectos), la especificidad del tejido y los

metabolitos secundarios deberán también identificarse, con el propósito de evaluar el material genético que puede ingresar en la cadena alimentaria.

### 3. Sistema de transformación

El sistema de transformación debe detallarse; por ejemplo: fusión del protoplasto, mutagénesis o transformación del ADN. Deben identificarse los vectores y debe incluirse un mapa de plásmidos, si se ha utilizado este tipo de sistema. Deben incluirse asimismo las características plásmicas, tales como el gen marcador, e indicarse si se ha producido una desactivación (cuál gen ha sido removido).

Las características del sistema de transformación permiten al ente regulador decidir qué preguntas hacer al revisar la solicitud. Esto no implica un intento de regular el proceso, pero es necesario considerar la totalidad de los pasos para hacer una correcta evaluación. Las revisiones genéricas no funcionan, específicamente por esta razón. No sería práctico pedir a todos los investigadores que respondieran a las mismas preguntas, puesto que la pertinencia de las preguntas variaría mucho y resultaría molesto formular una serie de preguntas que abarcara todas las circunstancias posibles.

### 4. Pruebas de laboratorio e invernadero

Deberán describirse las pruebas y análisis químicos, bioquímicos y de progenie que se realicen con material vegetal. Estos tipos de pruebas indicarán el número de copias del gen, la estabilidad y cualquier efecto adverso que pueda sufrir la planta.

El investigador deberá proporcionar información sobre todo experimento que se realice en invernadero. De particular importancia son las pruebas para la detección de características de malezas. En el invernadero, pueden identificarse las características de malezas por una excesiva dehiscencia de las semillas, una baja capacidad de vida latente en las semillas y un alto grado de competitividad.

### 5. Sitio o sitios en los que se realizan las pruebas

Se requiere una descripción del sitio o de los sitios en que se realizarán las pruebas, incluyendo su ubicación exacta en un mapa, el

tamaño y número de parcelas, la cantidad de semillas (en gramos) que han de importarse y sembrarse, las variedades de control propuestas y las distancias de aislamiento. El órgano regulador debe estar informado acerca de las pruebas de campo que se estén realizando en el país con los materiales en cuestión. Si se dejan crecer las plantas hasta su floración, la distancia de aislamiento actual requerida entre el material vegetal genéticamente alterado y las especies similares y malezas relacionadas, será el doble de la distancia de aislamiento requerida en el caso de producción de semillas puras. Estas distancias pueden ser ajustadas para las pruebas individuales, dependiendo del protocolo. Por ejemplo: si se está realizando un estudio de cruces de distintos tipos, el material vegetal genéticamente alterado será parecido a plantas de la especie no transformada. Pero las plantas transgénicas, de todas maneras, tienen que mantener la proporción de dos veces la distancia de aislamiento con respecto a plantas no directamente afectadas por el experimento. Si la distancia de aislamiento tiene que reducirse, la compañía o el investigador tienen que ocuparse de la eliminación apropiada de todo el material vegetal dentro de las distancias de aislamiento. Actualmente se reúne información científica para facilitar una reevaluación de las distancias de aislamiento apropiadas.

## 5. Aislamiento reproductivo

El material vegetal genéticamente alterado puede aislarse reproductivamente, así como físicamente, de especies similares o malezas relacionadas. Esto puede lograrse en diversas formas.

1. El aislamiento reproductivo puede lograrse colocando bolsas de papel transparente sobre las plantas florecidas para prevenir la diseminación del polen.
2. Muchas malas hierbas florecen antes de que florezcan los cultivos agrícolas. Esto permite identificar las malezas y eliminarlas del campo fácilmente, con lo cual se logra el aislamiento. Este tipo de aislamiento requiere más trabajo, porque deben observarse y marcarse los campos continuamente. En este caso, las distancias de aislamiento de especies vegetales no transformadas son aún necesarias, porque florecerán al mismo tiempo que los materiales vegetales genéticamente alterados.
3. El material vegetal genéticamente alterado puede ser cosechado

antes de la floración. En este caso, hay pocas preocupaciones en cuanto al cruce de tipos distintos y no se exigen las distancias de aislamiento recomendadas, siempre y cuando se utilicen procedimientos de monitoreo adecuados para garantizar que el material vegetal no llegue a la etapa de floración.

#### **6. Tratamiento de la tierra y monitoreo del campo post-cosecha**

El material vegetal que queda tras la conclusión de la prueba deberá recibir algún tipo de tratamiento. Normalmente, la zona se trata con herbicidas o se labra para destruir cualquier material vegetal que pudiera haber quedado en el sitio. Esto debe identificarse en el protocolo de pruebas. Es posible que surjan plantas voluntarias en el sitio en que se realizan las pruebas. Con el objeto de garantizar la destrucción de estas plantas, debe existir un procedimiento para observar el sitio tras la conclusión de la prueba. Esto permite la fácil identificación de plantas voluntarias que surgen como resultado de la prueba. Durante este período, los sitios estarán bajo observación, no sólo para detectar plantas voluntarias, sino malezas relacionadas con el material vegetal genéticamente alterado que fue cultivado.

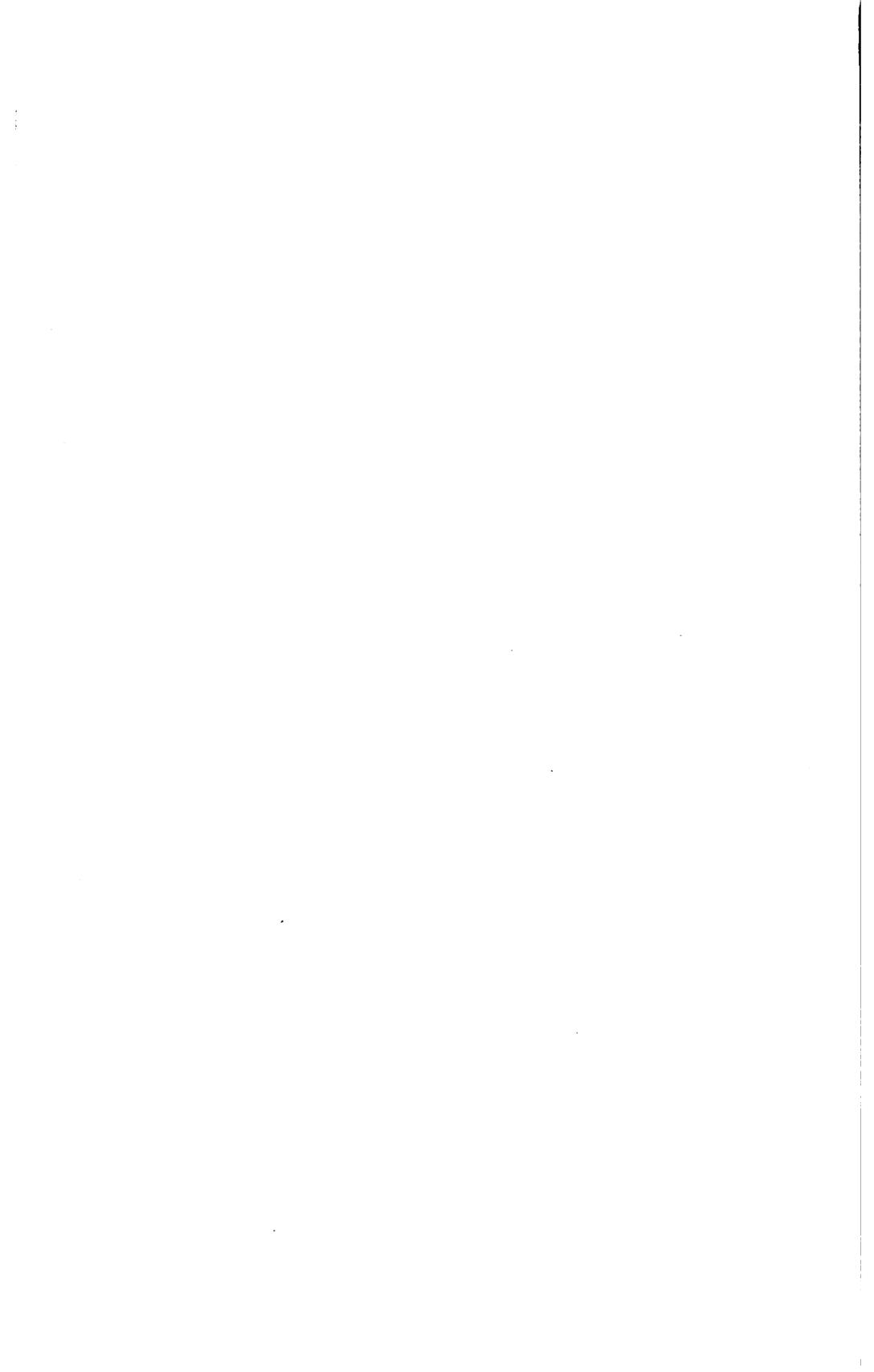
#### **7. Destino del material vegetal cosechado**

Finalmente, el protocolo debe indicar el tratamiento dado al material vegetal y semillas cosechados. Las semillas y el material vegetal se conservan, para pruebas de laboratorio o más pruebas de campo, o son exportados a otro país. Deberá incluirse una breve descripción de los tipos de análisis, tanto del material como de las semillas, que han de realizarse. Esta información permite a la entidad reguladora observar cómo se desecha el material vegetal transgénico que fue objeto de pruebas de campo.

## **APENDICE VII**

### **REQUISITOS DE INFORMACION PARA LA SUPERVISION DE LAS PRUEBAS DE CAMPO DE MICROORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE**

**Fuente: Major D.W.; Hart D.R.; Lush D.L. (1988), Release  
of Genetically Engineered Microorganisms into the Environment,  
Beak Consultants Limited, Canada**



## PROPOSITOS DE ESTOS REQUISITOS DE INFORMACION

El propósito general de esta propuesta de requisitos de información consiste en garantizar la presentación de información suficiente sobre microorganismos genéticamente modificados recombinantes (MGMr) y microorganismos genéticamente modificados (MGM), que permita a la entidad supervisora evaluar la seguridad relativa y además los méritos de una liberación, para efectos de prueba, de MGMr o de MGMs, y ofrecer a los investigadores solicitantes una guía con respecto a los factores que se utilizarán para adoptar una decisión. El término MGMr se aplicará a aquellos microorganismos que han sido alterados por técnicas de ADN recombinante, involucrando la inserción o remoción de secuencias de nucleótidos específicas, de tal forma que estas inserciones/remociones puedan definirse en términos de secuencias de nucleótidos y función. El término MGM se aplicará a microorganismos que han sido genéticamente modificados por fusión celular u otras tecnologías que logren modificaciones genéticas o transferencia, no documentadas en la naturaleza y que no pueden ser descritas o identificadas genotípicamente. "Recipiente" se refiere a un microorganismo al que se le insertará material genético; "donante" se refiere a microorganismos que sirven de fuente de material genético y "padres" se refiere tanto a recipientes como donantes.

Estas normas deberán considerarse sólo como requisitos de información general y los individuos que remiten información deberán hacerlo teniendo en cuenta lo siguiente :

- la naturaleza del producto que tienen la intención producir;
- la aplicación que se pretende hacer del producto; y
- la naturaleza del ambiente abierto en el cual es probable que se pruebe el producto.

Estas tres consideraciones contribuirán a determinar qué información específica es la apropiada para la aprobación de pruebas de campo, lo que, a su vez, determinará qué protocolos son los apropiados para evaluar la seguridad y los riesgos ambientales implícitos en la liberación de microorganismos genéticamente modificados por recombinante o de microorganismos genéticamente modificados. Las evaluaciones serán escalonadas, con la posibilidad de que se exijan

pruebas más amplias de los MGMr o de los MGM, si las primeras pruebas presentan interrogantes en cuanto a seguridad para los humanos/animales o para el ambiente.

Buena parte de la información aquí solicitada debería ya estar disponible para los individuos o empresas que producen los MGMr o los MGM, como resultado de las investigaciones realizadas para lograr el desarrollo del producto. Por lo tanto, el tiempo requerido para que cualquiera que estuviese familiarizado con los MGMr o los MGM proporcionara a la institución la información y los antecedentes solicitados, no debería exceder de unas pocas semanas. Según la naturaleza de los MGMr o los MGM, la alteración genética realizada y la aplicación que se pretende hacer, podrían requerirse pruebas en microcosmos o en invernaderos de contención antes de que se dé la autorización para realizar pruebas de campo.

La liberación de MGMr o MGM se examinará teniendo en cuenta el balance entre el motivo principal para utilizarlos, la viabilidad, la eficacia y los posibles beneficios que ofrece, en comparación con otros enfoques disponibles y el análisis del peligro potencial para seres humanos y el medio ambiente.

La información requerida contribuirá a abordar esas cuestiones y puede organizarse en las siguientes categorías:

- Identificación y caracterización de las variedades silvestres del receptor/donante en términos de fisiología, ecología, genotipo y fenotipo. Esto garantizará también un registro correcto de los MGMr o los MGM;
- descripción del material genético insertado o suprimido (para los MGMr) desde el punto de vista de su fuente, la secuencia de nucleótidos, la función, la expresión, la ubicación actual o anterior en el elemento de origen (por ejemplo: cromosómico o plásmido), los puntos de inserción o supresión (por ejemplo: nucleótidos flanqueantes, marcadores de restricción), la descripción de cualquier otro material genético relacionado con esto; o de propiedades que pueden usarse para la identificación (por ejemplo: genes marcadores que codifican enzimas específicas o que pueden detectarse mediante sondas genéticas), o control ambiental (por ejemplo: genes suicidas);

- comparación de los MGMr o de los MGM con el receptor o el donante, en términos de identificación y caracterización.
- Efectos de los MGMr o los MGM en el ambiente, con énfasis en el contraste ecológico entre el receptor/donante y los MGMr o los MGM; y
- aseguramiento de la calidad/control de calidad (QA/QC).

## REQUISITOS DE INFORMACION ESPECIFICA

### 1. Identificación y caracterización del tipo silvestre o receptor

#### Justificación

Es esencial tener el mejor conocimiento posible de la fisiología, ecología, expresiones genotípicas y fenotípicas del microorganismo receptor, puesto que las características dominantes de los MGMr serán las del receptor. Por lo tanto, toda la información que se pueda obtener sobre el receptor ayudará a predecir el destino de los MGMr tras la liberación en la prueba de campo. Esta información servirá de base para la comparación con los MGMr. Esta información también es aplicable a los microorganismos donantes usados en la fusión celular u otras técnicas que transfieren grandes cantidades de ADN de manera no específica (por ejemplo: los MGM). La información requerida comprenderá lo siguiente:

- **Identificación:** Este es un factor clave, puesto que la identificación exacta permite obtener información ya disponible (hábitat/fisiología, características genéticas, patogenicidad) acerca del organismo, en publicaciones existentes. La identificación del microorganismo debe incluir un nombre taxonómico y una referencia a alguna cepa que esté disponible como parte de una colección de cepas o que se mantenga en la misma organización. Debe incluirse en la documentación de control/aseguramiento de calidad una explicación acerca de cómo se mantiene e identifica el microorganismo receptor. Si el microorganismo huésped es aislado y nuevo, debe ser clasificado y debe colocarse una cepa en una colección de cepas reconocida o mantenerse en la misma organización.

- **Hábitat/Fisiología:** Se requiere información sobre la distribución geográfica, el hábitat, los factores que afectan el crecimiento, tales como el pH máximo y mínimo, el Eh (potencial de reducción-oxidación) y la temperatura, el papel en el ciclo biogeoquímico, los requerimientos nutricionales, los predadores, los competidores, la supervivencia bajo diversas condiciones físico-químicas, los mecanismos de dispersión y el nivel de dispersión. Esta información normalmente puede ser obtenida mediante una revisión de la literatura existente y los experimentos en el laboratorio.
- **Características genéticas** (cuando proceda): Se requieren antecedentes de la cepa en relación con manipulaciones genéticas anteriores, con la presencia o sin la presencia de elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y transposones indicados. Se solicitará también información sobre la tasa de transferencia del material genético insertado entre el receptor y organismos conocidos, cuya existencia se sospecha, y que se conjugan con el receptor o tienen en común los mismos vectores. Igualmente se solicitará información acerca de la tasa de transferencia del material genético insertado entre el receptor y cualquier otro organismo, con el cual el receptor puede formar una relación simbiótica. Se deberá proporcionar información acerca de las condiciones durante la transferencia y los mecanismos de transferencia, junto con la tasa de transferencia.
- **Patogenicidad:** Esta característica del receptor es esencial y sirve de alerta para las pruebas de patogenicidad de los MGMr o MGM. La identificación exacta del receptor o donante determinará si el receptor o donante se sitúa en un grupo de microorganismos que se consideran agentes patógenos o estrechamente relacionados con los patógenos de plantas, animales y humanos. También indicará si el receptor o donante es una variedad no patógena de un organismo patógeno, en cuyo caso se exigirán las pruebas de toxicidad/patogenicidad de los MGMr o los MGM. Si el receptor o donante es un patógeno conocido o está relacionado con un patógeno conocido, deberá proporcionarse información referente a su gama de huéspedes, la vía de transmisión y el mecanismo de infección.

## 2. Caracterización del material genético insertado (cuando proceda)

### Justificación

La Ingeniería genética que utiliza la tecnología del ADN<sub>r</sub> permite la escisión de secuencias específicas de nucleótidos y la inserción de secuencias así removidas o sintetizadas en el microorganismo receptor. Puesto que las nuevas características que se expresarán en el receptor emanan sólo de la información transferida al receptor, es necesario únicamente caracterizar el material genético transferido. No obstante, esto sucede sólo si existe suficiente control/aseguramiento de calidad para garantizar las características del material genético insertado. La información solicitada acerca del material genético incluye lo siguiente:

- descripción de la función (por ejemplo: región regulatoria no codificante, región codificante, proteínas para las que se ha codificado);
- secuencia de nucleótidos, incluido cualquier nucleótido flanqueante;
- fuente del material genético;
- descripción de la expresión esperada o real del material genético en los MGM<sub>r</sub>;
- determinación de que el material genético insertado/suprimido es el número mínimo de nucleótidos necesario para la expresión fenotípica deseada; y
- documentación sobre la localización del material genético insertado en el genoma huésped (por ejemplo: cromosómico, plásmido, nucleótidos flanqueantes, otros genes codificantes cercanos, transposones, elementos genéticos móviles y regiones regulatorias no codificantes que podrían afectar la función, expresión o transferencia del material genético insertado).

## 3. Caracterización del MGM<sub>r</sub> o MGM y comparación con el receptor

### Justificación para el MGM<sub>r</sub>

Lo ideal es que un MGr represente la suma de sus partes (por ejemplo: la expresión fenotípica del MGr debería ser la expresión fenotípica del receptor más la expresión del material genético insertado del donante) o, en el caso de supresión de material genético, la expresión fenotípica sería la del elemento menos la expresión fenotípica del material genético suprimido. Sin embargo, la inserción o supresión de material nuevo puede hacer que el MGr se comporte de manera distinta a la esperada. La información requerida en este sentido es la siguiente:

- comparación de la expresión del material genético insertado en el receptor con su expresión en el donante, y descripción de cualquier diferencia;
- documentación y descripción de cualquier tipo de cambios en el MGr que sean distintos del receptor, desde el punto de vista de la expresión fenotípica de base del receptor, fuesen o no intencionales; y
- clasificación taxonómica del MGr para determinar si el material genético insertado ocasiona un cambio, según se defina en un protocolo taxonómico de referencia, hacia una nueva especie o género del receptor.

#### **Justificación para el MGM**

Puesto que hay poco control sobre el resultado de la modificación genética en la fusión, la microinyección u otras técnicas similares que producen MGMs, actualmente es imposible caracterizar los cambios genotípicos que han ocurrido en el MGM que se ha producido. Por lo tanto, el MGM como producto final debe ser caracterizado en términos de su expresión fenotípica. La información que deberá proporcionarse ha de contrastar al MGM con el organismo de origen, y comprende lo siguiente:

- clasificación taxonómica del MGM para determinar la relación que tiene con microorganismos naturales; y
- documentación y descripción sobre cualquier cambio en el MGM que sea diferente del organismo de origen, en cuanto a la expresión fenotípica de éste, intencional o no.

#### **4. Comparación del MGMr con el receptor o MGM con los organismos de origen en función de consideraciones ambientales**

##### **El destino en el medio ambiente del MGMr o MGM**

Debe hacerse una comparación entre el MGMr y el receptor por un lado, y el MGM y los organismos de origen en cuanto a sus respectivas capacidades de sobrevivir, crecer y propagarse. La información obtenida contribuirá a predecir el destino de los MGMr o MGM en el ambiente. Si los MGMr o MGM pueden sobrevivir y proliferar en el ambiente tan bien como el receptor o el elemento original, respectivamente, o mejor, los rubros que deben abordarse comprenden los siguientes:

- comparación de los MGMr con el receptor o los MGM con los organismos originales en cuanto a supervivencia, proliferación y diseminación en distintos ambientes bajo distintas condiciones físico-químicas; y
- determinación de los factores que permitirán el establecimiento de los MGMr o MGM en el ambiente donde se apliquen.

##### **Efectos en el medio ambiente del MGMr o MGM**

Se debe disponer de información acerca de los efectos de los MGMr o MGM en el ecosistema, en la zona en la que se harán las pruebas de campo. Los aspectos que deben abordarse son los siguientes:

- si la presencia de los MGMr o MGM ocasiona una perturbación considerable y no prevista de la ecología a corto plazo; y
- si se producen efectos no intencionales a largo plazo en importantes procesos ecológicos.

La información para responder a los interrogantes anteriores podrá obtenerse primero mediante pruebas de microcosmos y luego mediante pruebas de campo. Antes de que se dé aprobación para una prueba de campo, la siguiente información deberá haber sido obtenida mediante experimentos de microcosmos o experimentos en condiciones de contención en invernaderos:

- efecto de los MGMr o MGM en las comunidades ecológicas, desde el punto de vista de estructura y función (por ejemplo: diversidad, productividad y procesos biogeoquímicos). La función/objetivo de los MGMr o MGM debe analizarse, puesto que su intención puede dar lugar a perturbaciones de la ecología de alguna manera específica;
- efecto en la frecuencia y magnitud de las aplicaciones de MGMr o MGM, durante largos períodos;
- transferencia y consecuencia de la transferencia y expresión de material genético de los MGMr a otros organismos. Esto debería abordarse si la probabilidad o el nivel de transferencia del material genético es alto o si la estabilidad del material genético insertado es alta;
- información sobre los organismos/objetivo, así como los no objetivos, con respecto a los efectos conocidos y los efectos previstos ; y
- estabilidad del material genético insertado en el MGMr, desde el punto de vista de la expresión y los cambios de expresión a lo largo del tiempo, bajo diversas condiciones físico-químicas.

#### **ASEGURAMIENTO DE CALIDAD/CONTROL DE CALIDAD**

La siguiente información se solicita para ayudar a la entidad supervisora a comprender y evaluar mejor los posibles efectos y la suficiencia de los métodos de liberación/monitoreo, relacionados con la aplicación de MGMr o MGM para efectos de experimentación de campo:

- métodos de prueba de pureza del producto e identidad de cualquier contaminante biológico y subproducto que se hubiere encontrado;
- métodos de construcción de todos los componentes y construcción final de los MGMr o MGM;
- método, sensibilidad y confiabilidad de los mecanismos de detección en el ambiente, de los procedimientos de contención,

transporte, emergencia, erradicación y desecho en todas las zonas de producción, distribución y aplicación.

## **PRUEBAS DE CAMPO PROPUESTAS**

La información requerida se refiere a la naturaleza, aplicación, métodos y magnitud de la aplicación de los MGMr o MGM y a los procedimientos de contención y descontaminación que se usarán en el sitio en el que se realizarán las pruebas.

### **1. Información sobre el sitio o los sitios:**

- ubicación exacta;
- naturaleza ambiental del sitio incluyendo la zona circundante (aspectos climáticos, geológicos, edafológicos y otros aspectos ambientales significativos);
- proximidad física y biológica a seres humanos y otra biota significativa; y
- descripción de la flora/fauna autóctona dominante.

### **2. Cultivo(s), animales, etc., y número de hectáreas y organismos que han de ser tratados en el sitio.**

### **3. Diseño experimental.**

### **4. Métodos y arreglos para producir la cantidad requerida de productos en base a microorganismos y para el transporte hasta el sitio.**

### **5. Fechas o períodos de realización de las pruebas.**

### **6. Protocolo de Introducción:**

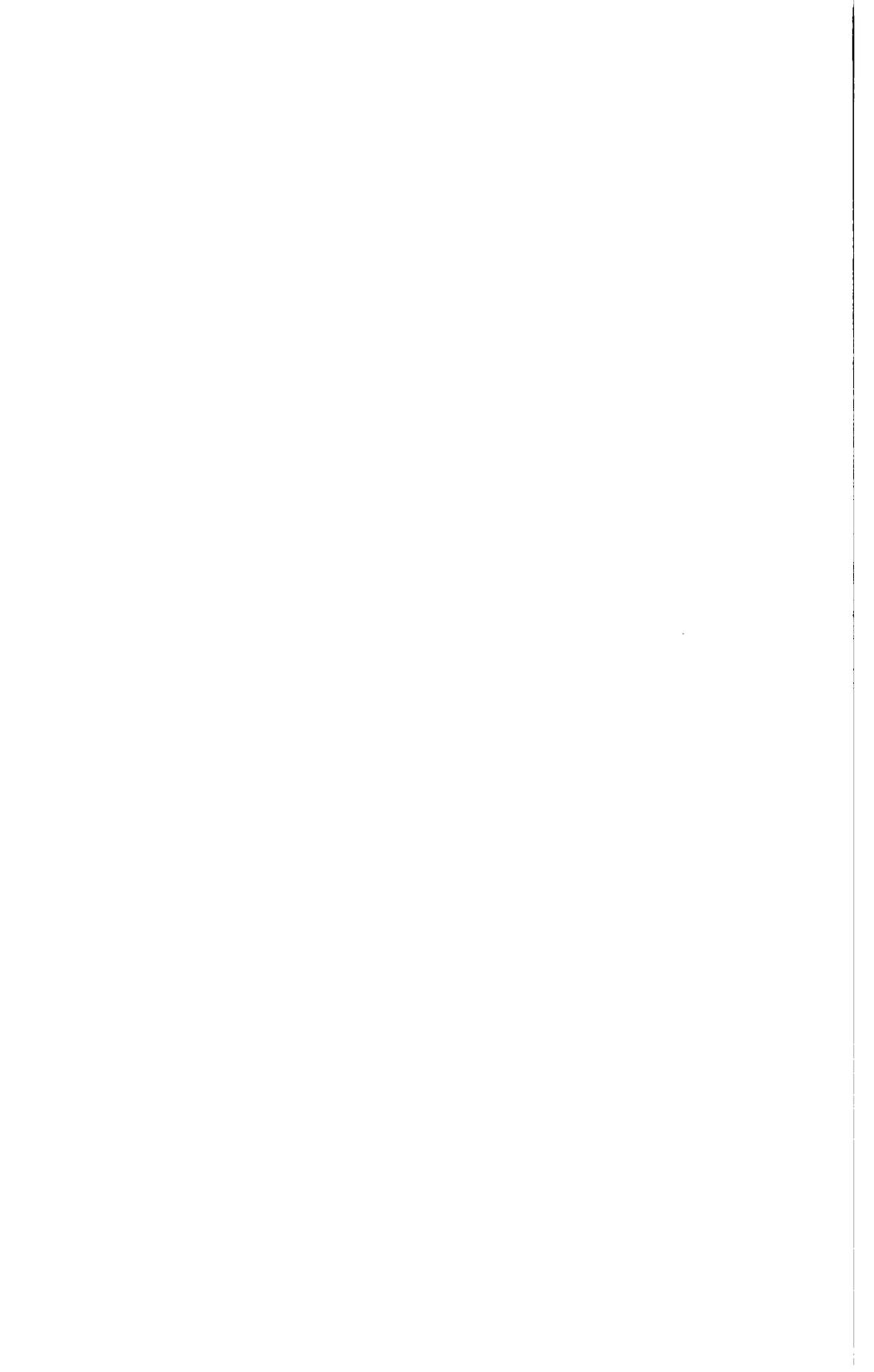
- formulaciones que deben ser ensayadas;
- cantidad total que debe aplicarse;

- método de introducción, incluyendo niveles, frecuencia y (cuando proceda) duración de la aplicación;
  - organismos/objetivo; y
  - prácticas de cultivo y crianza de animales (por ejemplo: planes para la rotura mecánica del suelo, irrigación, etc.).
7. Procedimientos de seguridad *in situ*, incluyendo la contención, la descontaminación, los planes frente a una liberación accidental, el monitoreo de los microbios y del ADN insertado. La información referente a los microbios y al ADN insertado deberá incluir sensibilidad y método de detección.
8. Planes de seguridad y emergencia.

## **APENDICE VIII**

### **REQUISITOS PARA LA EVALUACION AMBIENTAL DE PRODUCTOS VETERINARIOS VIVOS DE ORIGEN BIOLOGICO, PRODUCIDOS MEDIANTE BIOTECNOLOGIA**

**Fuente: Agriculture Canada (1989), Guidelines for the  
Regulation of Veterinary Biologics produced by Biotechnology.**



## **REQUISITOS PARA LA EVALUACIÓN AMBIENTAL (EA)**

### **I. Propósito y necesidad**

#### **Descripción de las actividades propuestas**

- Incluir descripción precisa del problema identificado y el programa o las actividades del organismo destinados a hacer frente al problema

### **II. Descripción del organismo y sus propiedades en comparación con los organismos originales no manipulados**

#### **Características del organismo original.**

##### **a) Identificación, fuente, y variedades.**

##### **b) Reproducción y capacidad de transferencia genética.**

- Fuente, descripción y función del material genético extraño.
- Método para llevar a cabo la modificación genética.
- Estabilidad, expresión y potencial de recombinación del microorganismo de la vacuna.
- Ventajas y desventajas del organismo modificado en comparación con productos convencionales.
- Comparación de los organismos modificados con las propiedades de los organismos originales.
- Vía de administración.

### **III. Seguridad humana**

- Probabilidades de exposición para el ser humano.
- Posibles consecuencias de la exposición.

- Patogenicidad de los microorganismos originales en los seres humanos.
- Efectos de la manipulación genética en la patogenicidad de los seres humanos.
- Riesgos relacionados con el uso generalizado de la vacuna.

#### **IV. Seguridad animal**

- Consecuencias de la vacuna en las especies a las que está destinada y a las que no está destinada.
- Capacidad de diseminación y/o propagación a partir de animales vacunados hacia otros que no son destinatarios.
- Reversión a virulencia como resultado del pasaje serial en los animales.
- Efectos de una sobredosis en las especies destinatarias y especies no destinatarias posibles.
- Seguridad relativa en comparación con las vacunas convencionales.
- La gama de huéspedes y el grado de movilidad del vector.
- Seguridad de los animales preñados y de los animales vacunados que alimentan a sus crías.

#### **V. Medio ambiente afectado**

- Identificación.
- Examinar los efectos de las posibilidades según cada aspecto del medio ambiente.
- Preocupaciones ecológicas.

- Nivel de la liberación en el medio ambiente.
- Persistencia del vector en el medio ambiente.
- Nivel de exposición de las especies que no han sido determinadas como objetivo.
- Comportamiento de los microorganismos originales y del vector en las especies no destinatarias.
- Capacidad del vector para infectar a organismos invertebrados.
- Factores físicos y químicos que pueden afectar la supervivencia, la reproducción y la dispersión.

#### **VI. Consecuencias en el medio ambiente**

- Examinar los problemas, beneficios y posibles riesgos de las actividades del programa.
- Al examinar las vacunas vivas de ADNr, comparar los beneficios que ofrece y los problemas que plantea la vacuna experimental con respecto a productos licenciados.
- Describir la opción propuesta.
- Analizar los criterios de selección y la importancia que se atribuye a cada uno.
- Justificar la selección de las opciones propuestas.

#### **VII. Consultas y coordinación con otros organismos, organizaciones y personas**

- Hacer una lista de todos los contactos.
- Indicar comentarios, si los hubiere.

## **Viii. Conclusión y resumen**

## **IX. Referencias**

- Hacer una lista de todas las referencias citadas o que han servido de fundamento.
- Incluir las comunicaciones personales.

## **OTROS REQUISITOS**

Además de la información mencionada en *supra* con respecto a la evaluación del medio ambiente, el fabricante debe presentar toda la información necesaria, incluidos los resultados obtenidos en pruebas de campo restringidas, para demostrar que el producto es puro, seguro, potente y eficaz.

Cada presentación deberá incluir la siguiente información:

1. Una descripción del producto, número de orden en serie del producto que se ha de utilizar, recomendaciones para su uso y los resultados de la investigación preliminar realizada en condiciones de contención, incluidos los resultados satisfactorios de las pruebas con respecto a la pureza y la seguridad para cada serie de producto que se ha de utilizar.
2. Una propuesta de plan general que se refiera a los métodos y procedimientos para evaluar los productos y llevar un registro de la cantidad de producto experimental preparado, despachado y utilizado. Se debe incluir en ese plan una propuesta de métodos de control y recuperación biológicos o físicos, en caso de que los organismos modificados den lugar a efectos adversos no previstos.
3. Una lista provisional de los nombres y direcciones de los beneficiarios propuestos y la cantidad de producto experimental que se ha de enviar a cada persona.
4. Copias de las etiquetas o bocetos de etiquetas con la indicación "¡Advertencia! Únicamente para uso experimental - No es para la venta" o alguna indicación equivalente.

Las autoridades competentes de salud animal en el nivel nacional entablarán negociaciones con las autoridades competentes en el nivel regional, donde se ha de realizar el ensayo. Si fuese necesario, se recurrirá al asesoramiento de otros organismos reguladores en el nivel de los gobiernos nacionales. Los estudios de los ensayos de campo restringidos se llevarán a cabo en condiciones de cuarentena que sean aceptables para las autoridades de salud animal, donde se demuestre adecuadamente que hay un control biológico o físico del organismo del ADN recombinante. Cabe señalar que cada estudio de esta categoría se realizará únicamente en instalaciones de cuarentena que hayan sido aprobadas. Las instalaciones deberán tener un mantenimiento y funcionamiento apropiados con el fin de evitar la propagación de cualquier enfermedad transmisible. Las instalaciones para las pruebas podrán ser inspeccionadas por un funcionario de veterinaria del organismo regulador para determinar si cumplen con las siguientes normas:

#### **REQUISITOS FISICOS DE LAS INSTALACIONES**

Por lo general las instalaciones se deberán ubicar y construir de modo que los animales del ensayo no tengan contacto físico con otros animales fuera de las instalaciones. El sector donde se mantiene a los animales deberá ser suficientemente amplio con el objeto de evitar el hacinamiento de los animales que están en cuarentena. Las instalaciones se deberán construir con materiales que resistan la limpieza y la desinfección. Se deberá instalar en las puertas, ventanas y otras aberturas algún tipo de cedazo para evitar que entren los pájaros y los insectos. Será necesario disponer de un programa seguro y eficaz para controlar los insectos, los ectoparásitos y las plagas de aves y mamíferos. Las normas respecto de las instalaciones deberán cumplir con las leyes locales, provinciales y nacionales aplicables, y con las reglamentaciones relativas al control de la contaminación y la protección del medio ambiente.

#### **HIGIENE Y SEGURIDAD**

El solicitante deberá tomar medidas para que el abastecimiento de agua sea suficiente para la limpieza y la desinfección de las instalaciones. Todos los alimentos y el material para el piso o el lecho de los encierros que se utilicen en el servicio de cuarentena aprobado

deberán provenir de un sector que no esté bajo cuarentena y deberán almacenarse en las instalaciones de ensayo en un sector de almacenaje a prueba de animalillos.

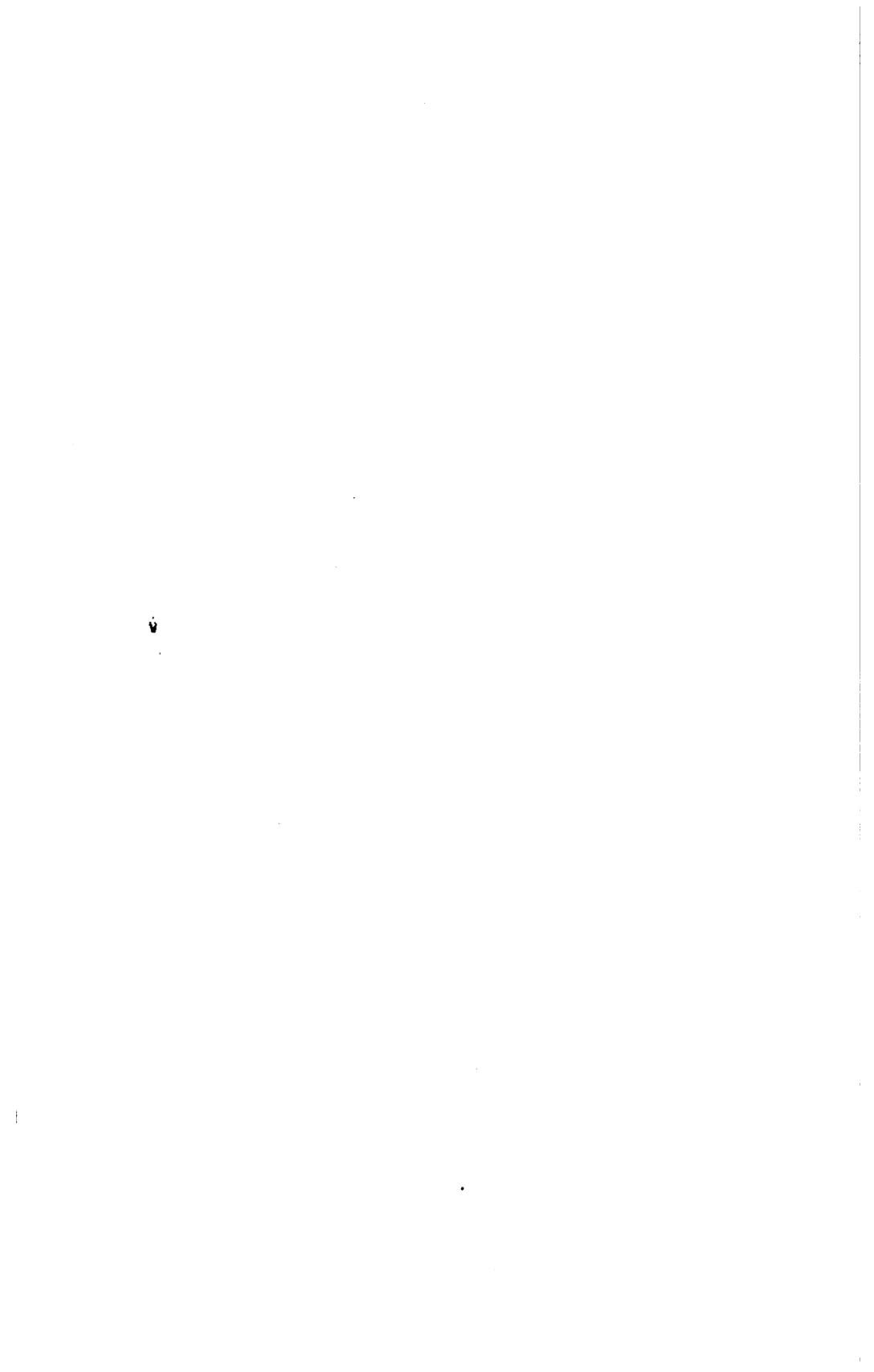
La solicitud para realizar ensayos de campo será evaluada y la decisión para aprobar o rechazar la realización del ensayo se tomará dentro de los 60 días después de que se presente la información completa. Si se aprueba, el ensayo podrá iniciarse 30 días después de la aprobación.

Para la obtención de la licencia de fabricación y venta del producto recombinante vivo, el solicitante deberá presentar toda la información necesaria, incluidos los resultados del ensayo de campo. Los datos deberán demostrar que el producto es seguro, potente y eficaz, y que cumple con todos los requisitos del organismo regulador. Una vez que se emita la licencia para la fabricación del producto, se acepta la distribución del producto en todo el país sin restricción y puede ser utilizado en especies determinadas como objetivo, de acuerdo con las instrucciones de la etiqueta aprobadas.

**APENDICE IX**

**CRITERIOS PROPUESTOS PARA PRACTICAS INDUSTRIALES  
ADECUADAS DE GRAN ESCALA (GILSP)  
CON RESPECTO A MICROORGANISMOS DERIVADOS DEL ADNr.**

**Fuente: OECD (1986), Recombinant DNA Safety Considerations, París.**



## **Criterios propuestos para Prácticas Industriales Adecuadas de Gran Escala (GILSP) con respecto a microorganismos producidos con tecnología de ADNr**

### **Organismo Huésped**

- No patógeno;
- Ningún agente adventicio;
- Amplio historial de uso industrial; o
- Limitaciones ambientales inherentes que permiten el crecimiento óptimo en un entorno industrial, pero supervivencia limitada sin consecuencias adversas en el medio ambiente.

### **Organismo producido con tecnología de ADNr**

- No patógeno;
- Tan seguro como el organismo huésped en el entorno industrial, pero con una supervivencia limitada sin consecuencias adversas en el medio ambiente.

### **Vector/Inserción**

- Bien caracterizado y libre de secuencias nocivas conocidas;
- Reducido en tamaño en la medida de lo posible, con respecto al ADN necesario para desempeñar la función deseada; no debería aumentar la estabilidad del ente en el medio ambiente (a menos que sea un requisito de la función deseada);
- Debería tener poca movilidad
- No debería transferir marcadores de resistencia a los microorganismos que, hasta donde se sabe, no suelen adquirirlos naturalmente (si dicha adquisición pudiera implicar el uso de drogas para controlar los agentes de la enfermedad).



**APENDICE X**

**MARCO PARA LA EVALUACION DE LAS PRUEBAS DE CAMPO  
CON PLANTAS MODIFICADAS GENETICAMENTE**

**Fuente: National Research Council (1989), Field Testing  
Genetically Modified Organisms: Framework for Decisions,  
Wash. D.C.**

•

Gran parte de la amplia experiencia adquirida en la investigación de campo con plantas que han sido modificadas genéticamente, mediante técnicas clásicas, es aplicable a la investigación de campo con plantas modificadas mediante técnicas moleculares y celulares. Los procedimientos de aislamiento, vigilancia y mitigación funcionan bien, independientemente de la forma en que se produzca la planta.

Los tipos de modificaciones que se han realizado o previsto con técnicas moleculares son parecidas a las que se han producido con técnicas clásicas. No se han determinado nuevos riesgos ni peligros inherentemente distintos en relación con las técnicas moleculares. Por lo tanto, todas las actividades de supervisión de las pruebas de campo deberían basarse en el fenotipo y genotipo de la planta y no en la forma en que ésta se produce. Sin embargo, la capacidad de los métodos moleculares ofrece la posibilidad de que se puedan producir plantas con fenotipos extraños pero deseados. En algunos casos, pueden utilizarse nuevas fuentes genéticas, pero darán por resultado fenotipos conocidos. Las plantas con fenotipos no muy conocidos deberán ser sometidas a vigilancia hasta que resulte fácil predecir su comportamiento y éste demuestre no ser nocivo para el medio ambiente.

En esta sección, se presenta un sistema para la adopción de decisiones (Gráfico 1) que permite realizar pruebas de campo experimentales basadas en: (1) el conocimiento de la planta y de la modificación genética (Gráfico 2); (2) la capacidad para mantener la planta en aislamiento (Gráfico 3); y (3) las consecuencias previstas en el medio ambiente en caso de que la planta escape del aislamiento (Gráfico 4).

Las situaciones que son conocidas y se consideran seguras sobre la base de experiencias o experimentos anteriores, deberán clasificarse como "manejables según normas aceptadas" (MNA). Las plantas MNA deberán incluir, por ejemplo, las plantas producidas por medio de técnicas clásicas y otras plantas con fenotipos conocidos. Estas plantas deberán someterse a pruebas de campo de la manera más apropiada, basadas en las experiencias adquiridas en la producción de plantas por medios tradicionales.

Todas las plantas se pueden aislar, algunas con mayor facilidad que otras. El uso de plantas estériles es probablemente el mejor ejemplo de aislamiento fácil, siempre que se preste atención a la diseminación de

propágulos vegetativos. La otra situación extrema consistiría en aislar una planta de polinización abierta en presencia de parientes silvestres de hibridación cruzada. En esta situación, el aislamiento puede consistir en medidas tan estrictas como la contención física en un invernadero de cuarentena. Es evidente que el nivel apropiado de aislamiento depende de la planta y de la zona geográfica en que se realiza la prueba de campo. Si el aislamiento resulta difícil o inseguro, es necesario prestar atención a los posibles efectos que tiene la introducción en el medio ambiente. Si existe la posibilidad de que se produzcan efectos negativos considerables en el medio ambiente, los procedimientos de aislamiento deberán ser rigurosos, como la utilización de jaulas con cedazo. Si son pocas las posibilidades de esos efectos, habrá que recurrir a procedimientos menos rigurosos.

A medida que se reúne más información basada en las pruebas de campo, convendrá reducir las exigencias del aislamiento de modo que una planta pueda ser utilizada en un programa de fitomejoramiento. Los resultados de las pruebas de campo deben ser analizadas desde el punto de vista de impactos ambientales negativos, como resultado de la modificación de características relativas a las propiedades de maleza, la toxicidad o la resistencia a las plagas. La información que se obtenga mediante las pruebas de campo son la mejor forma de evaluar, de manera precisa, la presencia de características indeseables.

Se ha incluido también una serie de ejemplos de preguntas (Gráficos 1 a 4) que probablemente tengan que plantearse en cada fase del proceso de adopción de decisiones. Esta lista no es exhaustiva. La importancia que se atribuya a cada una de las preguntas deberá determinarse según cada caso.

GRAFICO 1

## ESQUEMA PARA EVALUAR LAS PRUEBAS DE CAMPO CON PLANTAS MODIFICADAS GENETICAMENTE

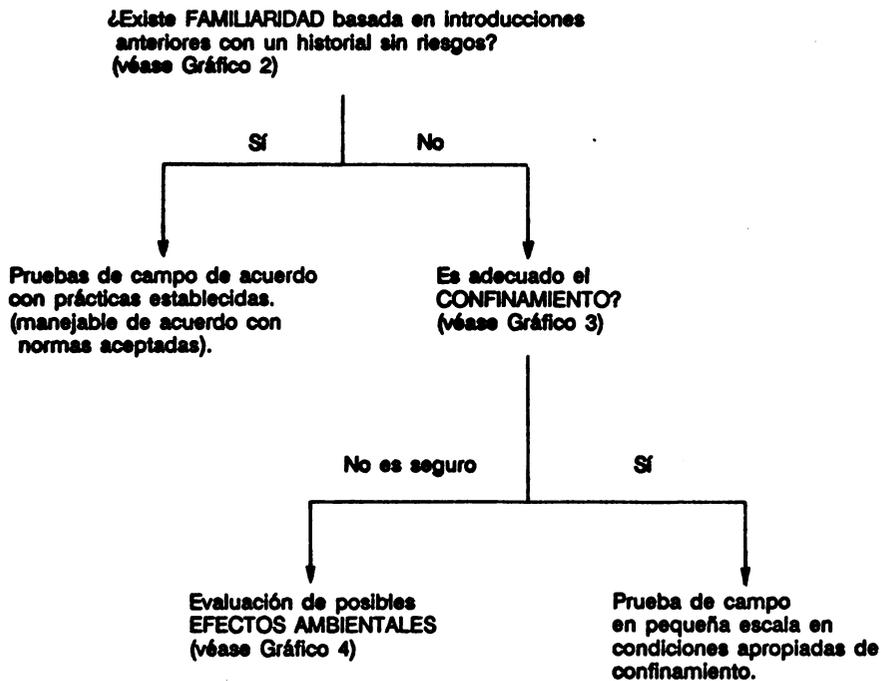
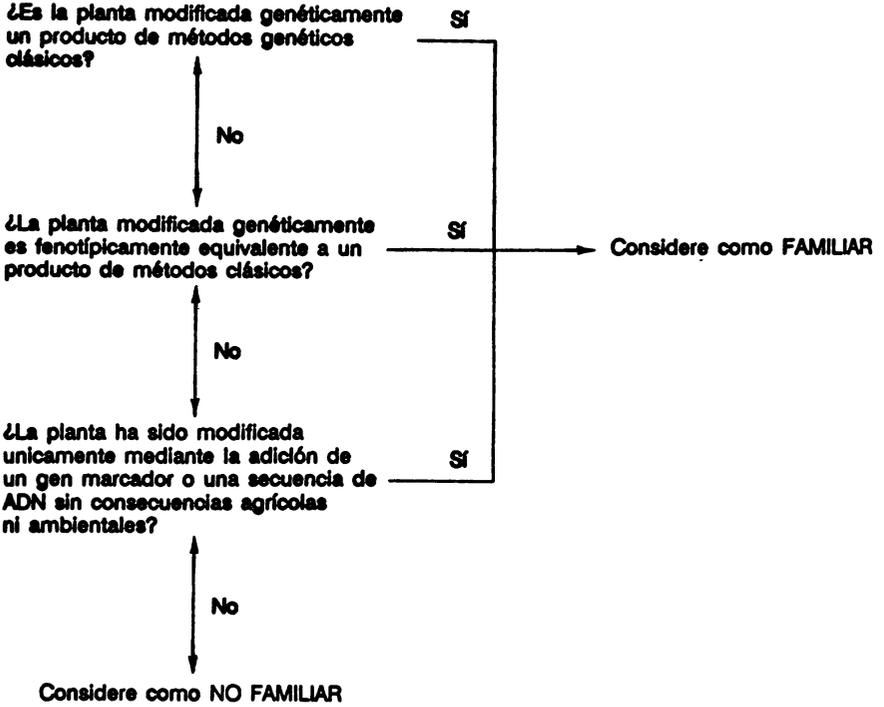


GRAFICO 2

FAMILIARIDAD



## GRAFICO 3

## CONFINAMIENTO

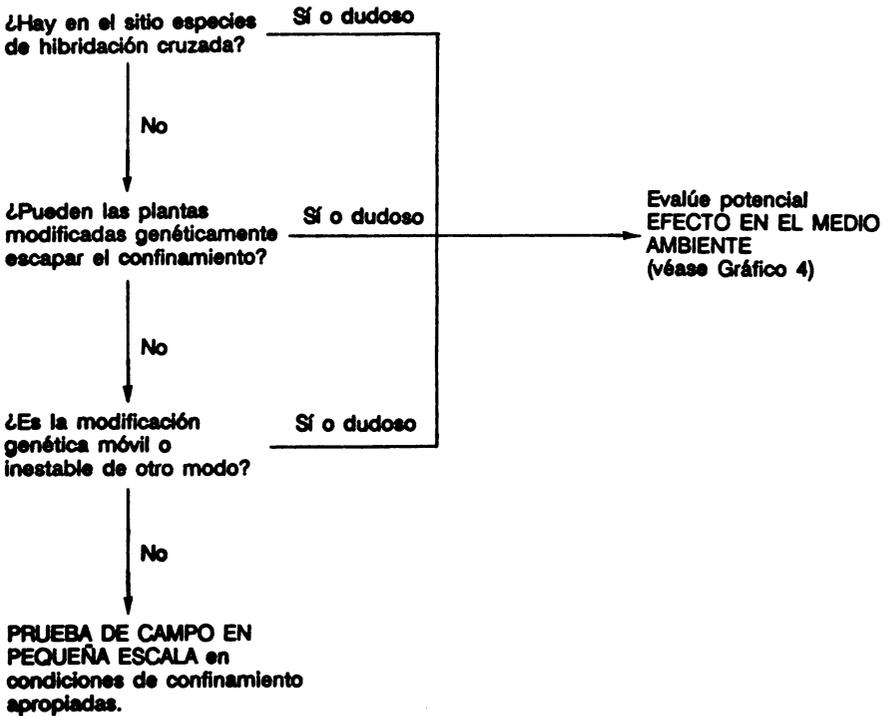
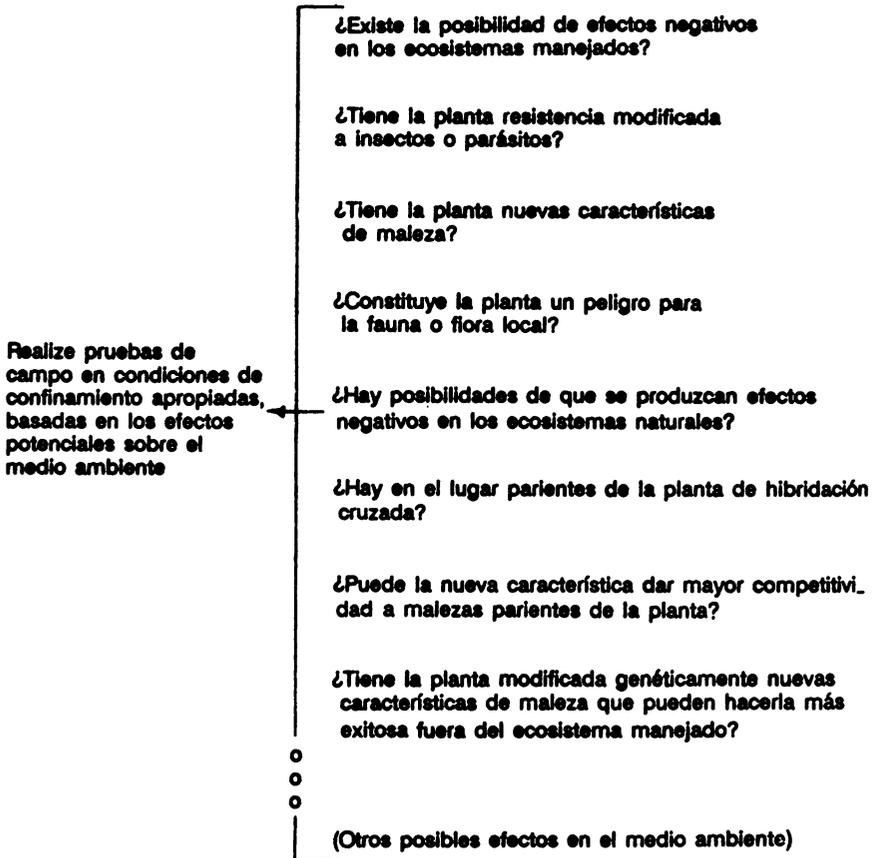


GRAFICO 4

**POSIBLES EFECTOS EN EL MEDIO AMBIENTE  
(PREGUNTAS APROPIADAS PARA APLICACIONES ESPECIFICAS  
DEBEN SER AGREGADAS POR LOS USUARIOS DEL ESQUEMA)**



**APENDICE XI**

**MARCO PARA LA EVALUACION DE PRUEBAS DE CAMPO CON  
MICROORGANISMOS MODIFICADOS GENETICAMENTE**

**Fuente: National Research Council (1989), Field Testing Genetically Modified Organisms: Framework for Decisions, Wash. D.C.**



La humanidad tiene una larga historia de uso de microorganismos en el procesamiento de alimentos, la agricultura, el tratamiento de desechos así como en y otras aplicaciones beneficiosas. Los nuevos métodos moleculares de modificación genética de microorganismos van a ampliar esas aplicaciones. Por ejemplo, en el control de enfermedades de plantas y en la biodegradación de contaminantes tóxicos.

Los métodos moleculares se asemejan a los clásicos utilizados para modificar cepas particulares de microorganismos en diversos aspectos; sin embargo, muchos de los nuevos métodos tienen dos características que los hacen aún más útiles que los clásicos. Su *precisión* permite a los científicos hacer las modificaciones genéticas en cepas microbianas que pueden ser caracterizadas más completamente, en algunos casos hasta en el nivel de la secuencia del ADN. Ello reduce el grado de incertidumbre asociado con cualquier aplicación planificada. Los nuevos métodos tienen mayor *poder* porque permiten al científico aislar genes y transferirlos a través de barreras naturales.

El poder de estas nuevas técnicas crea la oportunidad de nuevas aplicaciones de microorganismos. A pesar de las preocupaciones iniciales con respecto al uso de los métodos recombinantes en la investigación de laboratorio, ahora está claro que estos métodos en sí no son intrínsecamente peligrosos.

El paso siguiente a la experimentación en el laboratorio es probar el microorganismo modificado en el campo. No se han detectado efectos adversos de las introducciones de microorganismos en el medio ambiente y existe un extenso cuerpo de información que documenta introducciones seguras de algunos microorganismos, tales como rizobia, hongos micorrizas, baculovirus, *Bacillus thuringiensis* y *Agrobacterium radiobacter*. Sin embargo, se conoce menos sobre resultados de pruebas de campo con microorganismos que con plantas. Por ello es prudente prepararse para el control de microorganismos introducidos, en el caso de introducciones no familiares.

Siempre que la introducción difiera sustancialmente de aquéllas con un historial de seguridad establecido, surgirán preguntas con respecto a los efectos de los microorganismos introducidos. Estas preguntas (sobre la persistencia no intencionada y los posibles efectos adversos), deberán ser atendidas científicamente. En la medida que la

comunidad científica continúe acumulando información sobre la seguridad o los riesgos de las aplicaciones ambientales de microorganismos, los niveles de supervisión podrán ser ajustados a las necesidades de situaciones particulares.

En las recomendaciones que siguen, se presenta un marco de decisiones que puede servir como base para una evaluación viable y científicamente fundamentada sobre la seguridad de microorganismos destinados para pruebas de campo. Este marco de decisiones ha sido desarrollado considerando tres criterios: (1) familiaridad con el historial de introducciones similares a la propuesta; (2) control sobre la persistencia y dispersión del microorganismo introducido y sobre el intercambio de material genético con la microflora indígena; y (3) efectos ambientales, incluyendo los efectos potencialmente adversos asociados con la introducción.

El marco de decisiones no hace distinción entre métodos clásicos y moleculares de manipulación genética, ni entre genotipos modificados y no modificados. Está orientado hacia productos, más que hacia procesos, enfatizando las propiedades de los microorganismos más que los métodos por los que fueron obtenidos. Aún así, el conocimiento sobre los métodos puede ofrecer información útil acerca de la precisión de la caracterización genética del microorganismo, lo que a su vez puede ser relevante para evaluar su similitud con organismos utilizados en aplicaciones previas, su persistencia y posibles efectos después de la introducción.

El marco no incluye otras variables, frecuentemente sugeridas como criterios de supervisión, tales como: la fuente de genes, si los recombinantes son intra- o intergenéricos, si regiones codificantes o no codificantes del genoma han sido modificadas. Estas variables ofrecen relativamente menor cantidad de información científica utilizable en evaluaciones de seguridad. Se reconoce la necesidad de usar, siempre que sea posible, criterios simples y de fácil cumplimiento para la supervisión.

En el marco se utilizan términos tales como "dudoso", "suficiente" y "significativo", sin definir precisamente sus límites cuantitativos. Dado que algunas variables subyacentes pueden ser difíciles de cuantificar con precisión, cualquier valor específico que se les asigne sería arbitrario y sujeto a desacuerdos. En última instancia, la asignación de categorías de

riesgo debe incluir un examen racional del conocimiento científico relevante en cada introducción.

La evaluación de los riesgos potenciales que surgen de la introducción de microorganismos en el medio ambiente se hacen, en el marco de referencia, de acuerdo con los tres criterios de importancia: la familiaridad, la capacidad de control y los efectos. Luego de la evaluación de estos tres criterios, se puede realizar una introducción propuesta en el campo, de acuerdo con la práctica establecida; o puede ser asignada a uno de los tres niveles de preocupación: bajo, moderado o de incertidumbre alta (Gráfico 1). El marco de referencia es inherentemente flexible, permitiendo la reasignación de una aplicación a una categoría diferente, en la medida que se obtiene información científica adicional que sea relevante para cualquiera de los tres criterios.

Las pruebas de campo de pequeña escala pueden proceder de acuerdo con prácticas establecidas si el microorganismo usado, su función planificada y el medio ambiente/objetivo son suficientemente similares a introducciones previas que tienen un historial de uso seguro (Gráfico 2). Un ejemplo familiar es *Rhizobium*, usado para el incremento de la fijación de nitrógeno en leguminosas.

Si una introducción no satisface el criterio de familiaridad, se evalúa con respecto a nuestra habilidad de controlar la persistencia y la diseminación del microorganismo y del potencial del microorganismo para causar efectos adversos significativos (Gráfico 1). Por ejemplo, *Rhizobium*, modificado para codificar una toxina insecticida, no sería una introducción familiar, aun cuando puede resultar segura. Una introducción se considera ubicada en la categoría de baja incertidumbre cuando satisface criterios apropiados tanto de control como del bajo potencial de efectos adversos. Una introducción es considerada de incertidumbre moderada si satisface solamente los criterios de control o los de efecto adverso, pero no ambos tipos de criterio. Una introducción se considera de alta incertidumbre si no satisface ni el criterio de control ni el de efectos adversos (Gráfico 1). La ubicación en la categoría de alta incertidumbre implica que existen efectos potencialmente adversos, unidos a la potencial imposibilidad de controlar el microorganismo y sus efectos potenciales.

Los criterios específicos para evaluar el control del microorganismo, luego de su introducción, tienen que incluir el potencial

de persistencia del microorganismo introducido, la posibilidad de intercambio genético entre microorganismos introducidos e indígenas, y la capacidad de dispersión del microorganismo introducido hacia medios ambientes distintos (Gráfico 3). En el gráfico 4 se ilustran una serie de preguntas que pueden ser abordadas en la evaluación del potencial de persistencia no intencional de un microorganismo introducido.

Los criterios de evaluación de los efectos tienen que depender, al menos en parte, de la función planificada para el microorganismo introducido en su medio ambiente previsto (Gráfico 5). Así, una prueba de campo de una bacteria usada para la biodegradación de un contaminante tóxico debe ser precedida por pruebas de laboratorio definitivas, y diseñada para determinar si subproductos tóxicos de la degradación pueden ser creados y llegar a persistir.

En la medida que las agencias otorgan permisos para la introducción de microorganismos modificados genéticamente en pruebas de campo, recibirán asesoría de paneles de expertos, que pueden utilizar este marco de referencia para las decisiones descritas aquí. Con la experiencia se incrementará la familiaridad y anticipamos que ello estará acompañado de ajustes en el rigor de la supervisión.





GRAFICO 3

**CONTROL**  
 (PREGUNTAS APROPIADAS PARA APLICACIONES ESPECIFICAS  
 DEBEN SER AGREGADAS POR EL USUARIO DEL MARCO)

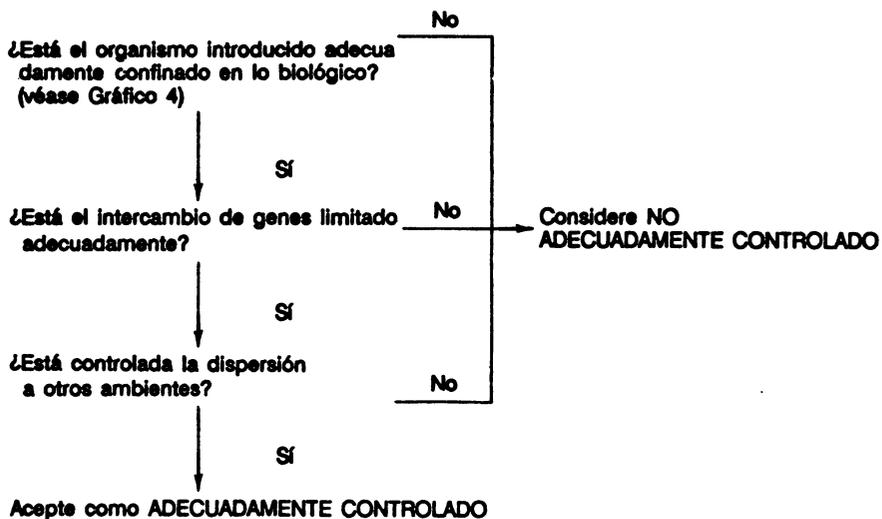
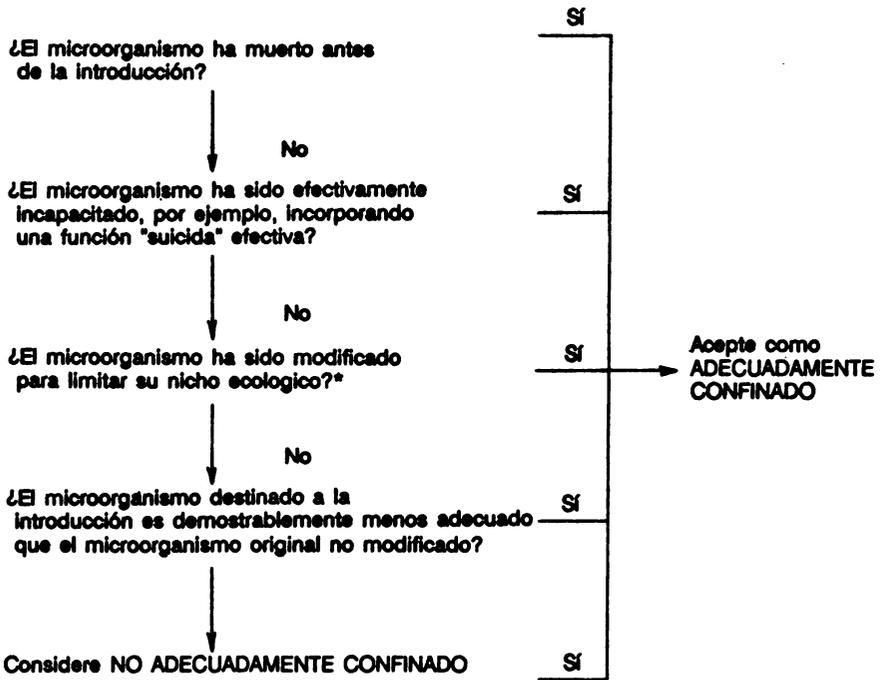


GRAFICO 4

CONFINAMIENTO BIOLÓGICO  
(PREGUNTAS APROPIADAS PARA APLICACIONES ESPECÍFICAS  
DEBEN SER AGREGADAS POR EL USUARIO)

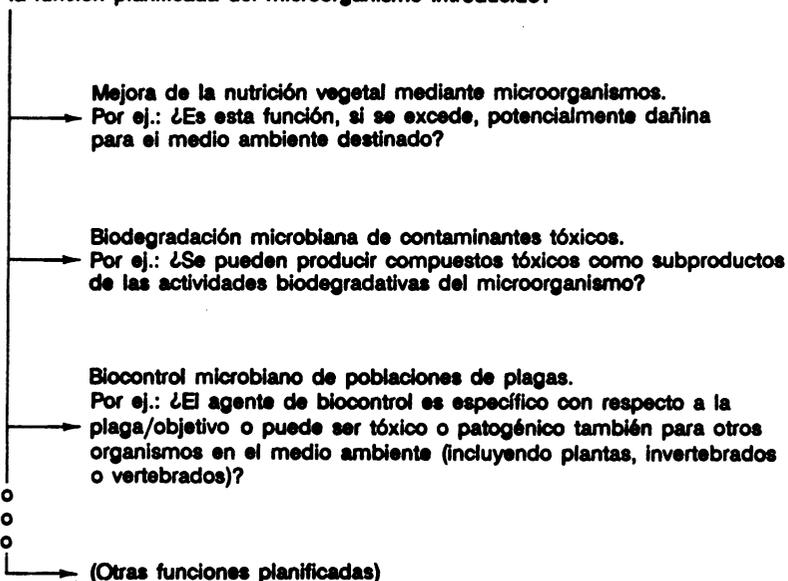


\* En relación con la utilización de sustratos, rango de hospederos, tolerancia fisiológica, resistencia o capacidad de competencia

## GRAFICO 5

POTENCIALES EFECTOS AMBIENTALES  
(PREGUNTAS ADECUADAS PARA APLICACIONES ESPECIFICAS  
DEBEN SER AGREGADAS POR EL USUARIO)

¿Cual es la función planificada del microorganismo introducido?





**APENDICE XII**

**REQUISITOS PARA LA CONCESION DE LICENCIAS DE  
PRODUCTOS VETERINARIOS DE ORIGEN BIOLOGICO, FABRICADOS  
MEDIANTE NUEVAS TECNICAS DE BIOTECNOLOGIA**

**Fuente: Agriculture Canada (1989), Guidelines for the  
Regulation of Veterinary Biologics Produced by Biotechnology**



**REQUISITOS GENERALES PARA LA CONCESION DE LICENCIAS**

**Preparación y certificación de stock de semilla patrón (de bacterias o virus)**

**Fabricación del producto experimental según las especificaciones mínimas establecidas**

**Eficacia del animal hésped (Inmunización y reforzamiento)**

**Preparación de tres lotes para pruebas de consistencia**

**Pruebas de seguridad sobre el terreno**

**Cumplimiento satisfactorio con todos los requisitos de prueba del "Esquema general de producción"**

**Presentación de muestras al laboratorio de evaluación de productos veterinarios de origen biológico para realizar pruebas confirmatorias**

**Aceptación de las etiquetas**

**Entrega de las series previas a la concesión de la licencia**

Es probable que los productos veterinarios de origen biológico producidos mediante técnicas nuevas de biotecnología como ADN<sub>r</sub>, síntesis química y tecnología de hibridomas requieran ensayos especiales para las determinaciones de la potencia y la estabilidad. Posiblemente sea necesario realizar otras pruebas para garantizar la seguridad, especialmente en el caso de la presencia de microorganismos vivos.

Con el fin de mantener la uniformidad de la producción, los fabricantes deben obtener los materiales de semilla para la producción de la porción del material que se define como Semilla Patrón o Base. La semilla patrón y el producto final son sometidos a prueba, con el fin de garantizar su pureza, seguridad, identidad e inmunogenicidad.

La semilla patrón para productos derivados de ADN recombinante consistirá en un plásmido o virus que lleve el gen inserto. El plásmido construido se introduce luego en el sistema de expresión apropiado de células eucarióticas o procarióticas, seleccionado para la producción de la vacuna. ADN genómico también puede ser transferido directamente a una variedad de células de mamíferos. Alternativamente, en tales casos, la célula estable que ha sufrido transfección será considerada como la semilla patrón.

Las semillas patrón de ADN recombinante serán caracterizadas mediante un mapa de construcción del plásmido bacteriano que contiene el nuevo gen. Es necesario disponer de información básica relativa a los procedimientos de ADN recombinante utilizados para aislar, purificar e identificar material genético de una fuente, y la modificación utilizada para la inserción de ese material en el nuevo huésped. El fabricante deberá proporcionar un análisis de la secuencia de nucleótidos con el objeto de caracterizar adecuadamente el ADN extraño utilizado en la codificación para obtener un antígeno particular.

La inmunogenicidad de las vacunas debe ser apoyada con estudios estadísticamente válidos, relativos a la inmunización de los animales huéspedes y las dificultades que presenta.

El fabricante deberá preparar un "esquema de producción" que incluya procedimientos para asegurar la constancia y la recuperación de material antigénico específico. Los procedimientos de recuperación deberán incluir la eliminación de niveles excesivos de antibióticos y subproductos indeseables de fermentación, tales como el exceso de endotoxinas bacterianas.

Algunos procedimientos de prueba, que pueden utilizarse durante el proceso de fabricación con fines de supervisión, son: la tasa de crecimiento, el mapeo en gel SDS, la resistencia antibiótica, los marcadores metabólicos, el peso molecular, la actividad y el porcentaje

de proteína.

Para cada entrega por series de los productos finales, producidos mediante la biotecnología, será necesario realizar pruebas para determinar su pureza, seguridad y potencia. Procedimientos estándares se aplicarán para determinar pureza, potencia y eficacia. Puede ser que los procedimientos de seguridad lleven a la realización de ensayos más amplios en el laboratorio y en el campo. Además de estas pruebas, será necesario caracterizar el producto con el fin de demostrar la expresión genética. Algunos ejemplos de las técnicas que pueden utilizarse son las siguientes: análisis parcial de la secuencia, cromatografía líquida de alta resolución, mapeo de péptidos, análisis en gel de poliacrilamida y determinación del peso molecular.



**ANEXO 1**

**MIEMBROS DEL GRUPO DE ESTUDIO INTERAMERICANO  
DE LA NUEVA BIOTECNOLOGIA EN SALUD Y  
AGRICULTURA, QUE PARTICIPARON EN LA REUNION REALIZADA  
EN BRASILIA, MAYO 30 - JUNIO 1, 1990.**



**Elisa Barahona Nieto**  
**Secretaría General del Medio Ambiente**  
**MOPU**  
**C/P Castellana 67**  
**28071 Madrid**  
**España**  
**Teléfono (1) 253-1600, Fax 533-0111, Telex 22325**

**Luiz Antonio Barreto De Castro**  
**Coordinador de Biotecnología**  
**EMBRAPA/CENARGEN**  
**SAIN Parque Rural**  
**Caixa postal 70770**  
**Brasilia D.F.**  
**Brasil**  
**Teléfono 273-0101, Fax 248-0557, Telex 1622**

**Willy Becak**  
**Director General**  
**Instituto Butantan**  
**Av. Vital Brasil, 1500**  
**Caixa postal 65**  
**Sao Paulo, Brasil**  
**Teléfono 211-8381**

**Alejandro Blanco Labra**  
**Investigador**  
**Centro de Investigación y de**  
**Estudios Avanzados**  
**Kilómetro 9.6 Libramiento Norte**  
**Carretera Irapuato - León**  
**Apartado 629**  
**Irapuato Gto. México**  
**Teléfono: 51-600, Fax 51-282, Telex 122224 CIUIME**

**Felipe Canale**  
**Director**  
**Comité Sanidad Vegetal Cono Sur**  
**Av. Millan 4703**  
**Montevideo, Uruguay**  
**Teléfono: 29-8720, Fax 39-6508, Telex 26236 UY**

**Jerry Callis**  
Consultant IICA  
P.O. Box 537  
Paradise Pt. Rd.  
Southold, N.Y. 11971  
U. S. A.

**Raúl Casas Olascoaga**  
Director  
Centro Pan Americano de Fiebre Aftosa  
Cajxa Postal 589  
Río de Janeiro RJ  
Brasil  
Teléfono (021) 771-3128, Telex 021-30253 COFA BR.

**Edgar Julian Duncan**  
Senior Lecturer  
The University of the West Indies  
Department of Plant Science  
St. Augustine  
Trinidad and Tobago  
Tel. 662-4991, Telex 2520 UWI NG.

**Mario González Pacheco**  
Asesor Regional de Biológicos  
Organización Panamericana de Salud/OMS  
525, 23rd St. N.W.  
Washington D.C.  
U. S. A.  
Teléfono (202) 861-3216

**Oscar Grau**  
Coordinador Técnico  
Programa Regional de Biotecnología  
UNESCO  
Apartado Postal CC 111 - CP 1876  
Bernal, Argentina  
Teléfono 54-21-21-5556, Fax 54-21-3-2978, Telex 31151

**Marcel Gutiérrez Correa**  
Profesor  
Laboratorio de Micología y Biotecnología  
Facultad de Ciencias  
Universidad Nacional Agraria La Molina  
Apartado 456  
Lima, Perú  
Teléfono: 352-035 Ext. 273 y 271

**Jean Hollebome**  
Director,  
Issues, Planning and Priorities  
Pesticide Directorate  
Agriculture Canada  
P.O. Box K1A 0C6  
Ottawa, Canada  
Tel. (613) 993-4544, Fax (613) 998-1312

**Juan Izquierdo**  
Oficial Regional Producción Vegetal  
Av. Santa Marta, 6700  
Apartado 10095  
Santiago, Chile  
Teléfono 228-8056, Fax 562-48-4312, Telex 340279 FAOCHI CK

**Walter Jaffé**  
Secretario Técnico del Grupo de Estudio  
Especialista en Generación y Transferencia de  
Tecnología  
IICA - Sede Central  
2200 Coronado,  
San José, Costa Rica  
Teléfono 29-0222, Fax 29-4741, Telex 2144 IICA

**David T. Kingsbury**  
Professor  
The George Washington University  
Medical Center  
2300 Eye Street, N.W.  
Tel. (202) 994-3484, Fax (202) 994-0875

José La Torre  
Director  
Centro Virología Animal (CEVAN)  
Serrano 661 (1414)  
Buenos Aires, Argentina  
Teléfono 854-5602/8209, Fax 54-1-8564-495

Miguel Laufer  
Director de Ciencia y Tecnología  
1889, F. St. N.W.  
Washington D.C.  
U.S A.  
Teléfono (202) 458-3368

Gloria León  
Profesora Titular Bioquímica  
Universidad Austral de Chile  
Instituto de Bioquímica  
Independencia 567 - Casilla 567  
Valdivia, Chile  
Teléfono (063) 21-3911 ext. 1333

Lida Patricia Londoño  
Investigadora Biología Molecular  
Instituto de Inmunología  
Hospital San Juan de Dios  
Av. 01, número 1001  
Bogotá, Colombia  
Teléfono: 2334255 / 233-9006

Terry L. Medley Jr.  
Director  
Biotechnology, Biologics and  
Environmental Protection  
U.S. Department of Agriculture  
Animal and Plant Health Inspection Service  
6505 Belcrest Rd.  
Room 850 -Federal Building  
Hyattsville, M.D.  
U. S. A.  
Teléfono (301) 436-7602, Fax (301) 436-8669

Henry I. Miller  
Director  
Office of Biotechnology, FDA  
HE-6, 5600 Fishers Lane  
Rockville, MO  
U.S.A.  
Teléfono (301) 443-7573, Fax (301) 443-7005

Harry Mussman  
Deputy Assistant Secretary  
U.S. Department of Agriculture  
Science and Education USDA  
14th and Independence  
Washington D.C.  
U. S. A.  
Teléfono (202) 447-8885

Eduardo Palma  
Coordinador Programa Biotecnología  
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria  
Rivadavia, 1439  
Apartado Postal CC 17  
Buenos Aires, Argentina  
Teléfono 621-0899, Telex 17518 INTA AR

Rodolfo Quintero Ramírez  
Director General  
Programa Regional de Biotecnología  
Masaryk 2910  
Col. Polanco  
México D.F. 1570  
México  
Teléfono 250-1550 - Ext. 152, Fax 1771055

William Roca  
Director  
Biotechnology Research Unit, CIAT  
A.A. 67 - 13  
Cali, Colombia  
Teléfono 57-23-6750, Fax 57-23-64-7243, Telex 05769 CIAT CO.

**Bakhshish S. Samagh**  
Senior Staff Veterinary  
Veterinary Biologics and Biotechnology  
Agriculture Canada  
801 Fallowfield Road  
P.O. Box 11300 - Station H  
Nepean, Canadá  
Teléfono (613) 998-9320

**Alejandro Silva Rodríguez**  
Vice Director de Productos Farmacéuticos  
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología  
Av. 25, e/ 148 e 150 - Playa  
P.O. Box 6162  
La Habana, Cuba  
Teléfono 201-401, Fax 537-218 070, Telex 512330 ING. GEN. CU

**Maro Sondahl**  
Senior Research Director  
DNAP  
2611 Branch Pire  
Cinnaminson, N.J.  
U. S. A.  
Teléfono (609) 786-2809, Fax (609) 829-5087, Telex 750493

**Eduardo J. Trigo**  
Director del Programa de  
Generación y Transferencia de Tecnología  
Sede Central - IICA  
2200 Coronado,  
San José, Costa Rica  
Teléfono 29-0222, Fax 29-4741, Telex 2144 IICA

**Pieter Van der Meer**  
Ministry for the Environment of the Netherlands  
Dr. V/d Stamstraat 2  
P.O. Box 450 - 2260 MB  
Leidschemdam -  
The Netherlands  
Teléfono 703-209367 - Ramal 3322, Fax 703-175077

Anne Vidaver  
Professor  
University of Nebraska  
68583 Lincoln NE  
U. S. A.  
Teléfono (402) 472-2858, Fax (402) 472-2853

Rodrigo Zeledón  
Profesor Investigador  
Universidad Nacional  
Heredia  
Apartado 816  
San José, Costa Rica  
Teléfono 25-5586, Fax (506) 38-1298

Joseph L. Zelibor  
Industrial Development Officer  
United Nations Industrial Development Organization  
Biotechnology and Genetic Engineering Unit  
Vienna International Center  
Room D-1901  
P.O. Box 300  
A-1400 Viena, Austria  
Tel. (0222) 21131-5351, Fax (0222) 230-7355



EICA  
PM-A/ISC  
91-09

Autor

Título

Guías para la libera-  
ción en el medio am-  
biente de organismos...

Fecha

Devolución

00 ABR 1997  
12 ABR 1997

Nombre del solicitante

J. Badilla

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA

Apdo. 55-2200 Coronado, Costa Rica/Tel.: 29-02-22 / Cable: IICASANJOSE / Télex: 2144 IICA CR  
Correo Electrónico EIES: 1332 IICA SC / FAX (506) 29-47-41, 29-26-59 IICA COSTA RICA