



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**Mejora nutricional en alimentos modificados
genéticamente: carotenoides**

Candela Silvana Portilla Schachter

Tutor: Dra. M^o de la Montaña Cámara Hurtado.

Junio 2018

ÍNDICE

1.- Resumen	2
2.- Introducción y antecedentes	3
2.1 Necesidad de mejora nutricional de los alimentos.....	3
2.2 Carotenoides y salud	3
2.3 Modificación genética como estrategia de mejora nutricional de vegetales.....	5
2.4 Nuevas herramientas biotecnológicas: Edición génica.....	6
3.- Objetivos	8
4.- Metodología	8
5.- Resultados y discusión	9
5.1 Arroz dorado	10
5.2 Plátano enriquecido con pro-vitamina A	13
5.3 Tomate enriquecido en licopeno	15
5.4 Piña rosada	15
5.5 Tomate enriquecido en licopeno por edición génica múltiple	17
6.- Conclusiones	18
7.- Bibliografía	18

1.- Resumen

En el mundo actual nos enfrentamos a diversos retos en relación con la alimentación y la nutrición que hacen necesario buscar la mejora del perfil nutricional de nuestros alimentos. Estos retos varían en función de la localización geográfica y la economía del país. En países en vías de desarrollo es necesaria para paliar la situación de desnutrición, mientras que en los países desarrollados cobra importancia sobre todo para disminuir el riesgo de enfermedades crónicas asociadas a la dieta. Dado que la mejora genética tradicional lleva mucho tiempo y ofrece posibilidades limitadas, se ha buscado esta mejora a través de técnicas de ingeniería genética. Se han desarrollado así numerosos alimentos genéticamente modificados con un perfil nutricional mejorado (incluyendo algunos productos de edición génica).

Por la gran cantidad de posibilidades que ofrece la mejora nutricional, se ha centrado este trabajo en la mejora del contenido de carotenoides en los alimentos. Esta mejora es importante debido a que algunos juegan un papel de precursor de nutrientes esenciales (como el β -caroteno, precursor de la vitamina A) y debido a que en este grupo existen muchos compuestos bioactivos (como el licopeno y el β -caroteno). Los alimentos con una mejora en el contenido de licopeno o de β -caroteno son, por tanto, alimentos funcionales

Por un lado, se han descrito ejemplos de desarrollos de OGMs orientados a solucionar la problemática de la deficiencia de vitamina A en países en vías de desarrollo, como el arroz dorado y el plátano enriquecido en provitamina A, así como su estado regulatorio. También se ha descrito el impacto de la problemática que solucionarían. Por otro, se han descrito ejemplos con posible aplicación comercial (una piña rosa, enriquecida en licopeno y aprobada hace años para su comercialización y un tomate enriquecido al 200-300% en licopeno que no está comercializado ni pendiente de comercialización). Hay muchos más ejemplos de desarrollos orientados a estos dos aspectos que sería interesante abordar, pero se han seleccionado estos por su importancia. Por último, se ha descrito el único ejemplo de edición génica orientada a la mejora nutricional en carotenoides que ha tenido éxito (tomate enriquecido en licopeno por edición génica múltiple). El estado regulatorio de los productos de edición génica es nulo, ya que hay controversia respecto a su consideración y respecto a la legislación que debe seguir. Pese a esto último, sería interesante investigar para desarrollar mediante edición génica más alimentos mejorados en cuanto a su contenido de carotenoides.

Palabras clave: mejora genética, mejora nutricional, alimentos genéticamente modificados, OGMs, CRISPR Cas, alimentos funcionales, carotenoides.

2.- Introducción y antecedentes

2.1 Necesidad de mejora nutricional de los alimentos

En el mundo actual nos enfrentamos a diversos retos en relación con la alimentación y la nutrición que hacen necesario buscar la mejora del perfil nutricional de nuestros alimentos. Estos retos varían en función de la localización geográfica y la economía del país.

Por una parte, en los países en vías de desarrollo nos encontramos con situaciones de hambre y desnutrición, principalmente debidas a la escasez de alimentos o a la falta de acceso a una variedad de los mismos que permita cubrir de forma adecuada las necesidades nutricionales. Por otra parte, en los países desarrollados la mayoría de la población tiene acceso a una gran cantidad y diversidad de alimentos. Sin embargo, las preferencias de consumo y la falta de opciones saludables a la hora de comer fuera del hogar hacen que no siempre se consiga mantener una dieta equilibrada. Esto ha acabado derivando en un amplio número de enfermedades y problemas de salud, incluyendo hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes tipo 2, enfermedades coronarias, ciertos tipos de cáncer y muchas otras enfermedades crónicas (1). Debido a la gran prevalencia, y carga para el sistema sanitario que suponen estas enfermedades crónicas, la estrategia seguida durante estos últimos años ha sido fomentar una alimentación y hábitos de vida saludables entre la población. Además, se ha puesto de manifiesto que hay algunos componentes de los alimentos, a los que nos referimos como compuestos bioactivos, que pueden ser de utilidad en la prevención de estas enfermedades.

Gracias a estos compuestos, en los últimos años, se ha abierto un nuevo y pujante nicho de mercado para el sector alimentario: los alimentos funcionales. Un alimento funcional es aquel que está científicamente demostrado que, además de presentar un valor nutritivo, es capaz de mejorar una o varias funciones del organismo de forma que mejore el estado de salud del individuo o disminuya el riesgo de padecer una enfermedad consumiéndolo como cualquier otro alimento (2).

Podemos decir que la mejora nutricional de los alimentos es necesaria para evitar problemas de desnutrición y malnutrición tanto en países en vías de desarrollo como desarrollados, y que es especialmente importante para el futuro económico del sector alimentario de los primeros.

2.2 Carotenoides y salud

Como el concepto de mejora nutricional es demasiado amplio para abarcarlo entero, se ha decidido tratar en este trabajo solamente los desarrollos con mayor relevancia relativos al contenido en carotenoides. Se ha seleccionado este grupo de compuestos debido a que entre ellos se encuentran precursores de la vitamina A (el β -caroteno), un nutriente esencial cuyo déficit conlleva una enfermedad carencial, y a que en este grupo hay compuestos bioactivos interesantes para el desarrollo de alimentos funcionales, como es el caso del licopeno.

Existen muchos carotenoides y derivados, y muchas enzimas y precursores implicados en su síntesis. Su biosíntesis es por tanto compleja. En la Fig 1. aparece un resumen de la misma.

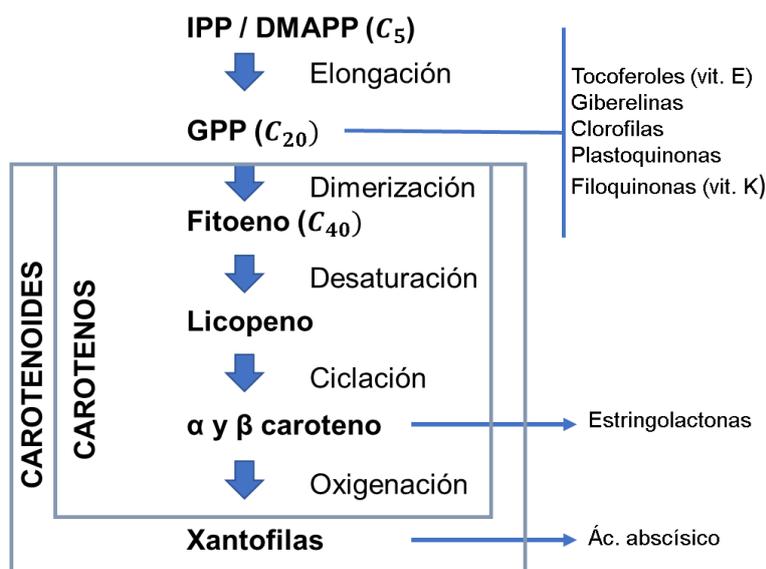


Fig 1.: Resumen de la biosíntesis vegetal de carotenoides. Se pueden observar las moléculas con las que compiten por los precursores y las distintas fases de su biosíntesis. La biosíntesis comienza con el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP), que sufren una elongación hasta geranyl difosfato (GGPP). El GGPP es precursor de carotenoides, tocoferoles, giberelinas, clorofilas, plastoquinonas y vitamina K. Para la síntesis de carotenoides dimeriza y se produce el fitoeno (es un carotenoide incoloro), que a través de una serie de desaturaciones produce licopeno (este carotenoide sí tiene color). Desde aquí, se producen ciclaciones que forman los anillos β y ε ionona de los α y β carotenos, y posteriormente oxigenaciones dan lugar a las xantofilas. Figura propia elaborada a partir de (3)

Pese a la gran cantidad de carotenoides que existen, hay pocos con acción provitamina A (sobre todo son aquellos con un anillo β-ionona no sustituido, como el β-caroteno). Además, hay muchas moléculas con acciones importantes (como hormonas vegetales y la vitamina E) con los que comparten precursores (3).

La carencia de vitamina A es un problema de salud pública en los países en vías de desarrollo, sobre todo en ciertos grupos de población como niños y gestantes. Tiene una elevada prevalencia (según la OMS, afecta a 190 millones de niños en edad escolar y a 19 millones de embarazadas) (4) y en un elevado número de casos esta carencia produce sintomatología. En concreto, puede producir ceguera nocturna, xeroftalmia y queratinomalacia, que pueden derivar si no se detectan y tratan a tiempo en daños irreversibles en la visión o incluso en ceguera total (4) (5). Este problema afecta sobre todo a niños del sur y sudeste asiático, de algunos países africanos (Burkina Faso, Uganda, Etiopía, Malawi, Mozambique, Zambia,...) y de las zonas más pobres de América Central y Latina (5). A principios de la década del 2000, se calculaba que quedaban ciegos 250.000 niños anualmente debido a este déficit nutricional (6) y que entre 1 millón y 500.000 niños sufrían xeroftalmia (5). La solución a esta problemática pasa por hacer que la población en riesgo consuma una dieta más variada y rica en nutrientes o por consumir suplementos, lo cual es complicado debido a su situación económica. Es por

Este trabajo tiene una finalidad docente. La Facultad de Farmacia no se hace responsable de la información contenida en el mismo.

esto que se ha optado también por desarrollar alimentos transgénicos biofortificados en provitamina A, como una estrategia más para intentar paliar esta situación.

Dentro de los carotenoides hay muchos compuestos bioactivos. Pueden ser del grupo de los carotenos, como el α y β - caroteno y el licopeno o del grupo de las xantofilas, como la luteína y zeaxantina. Pese a que existen desarrollos orientados a mejorar tanto el contenido de carotenos como de xantofilas de diversos alimentos, en este trabajo solamente trataremos casos de mejora de carotenos (concretamente β - caroteno y licopeno).

El β - caroteno es un precursor de la vitamina A y tiene propiedades antioxidantes. Una vez absorbido, se convierte en retinal y en ácido retinoico antes de ejercer su acción como vitamina A (7).

El licopeno es un compuesto colorante (posee color por la presencia de dobles enlaces conjugados en su estructura) y antioxidante. De los carotenoides, es el antioxidante más potente (licopeno > α -tocoferol > α -caroteno > β -criptoxantina > β -caroteno > luteína) (8). Se le atribuyen beneficios para la salud como por ejemplo reducción del estrés oxidativo, reducción del riesgo de ciertos tipos de cáncer, mejora de la motilidad del espermatozoides, reducción del riesgo de aterosclerosis y del riesgo cardiovascular (tiene además una cierta actividad hipocolesteremiante), etc... (8). Es por esto que alimentos enriquecidos en licopeno se pueden considerar alimentos funcionales.

2.3 Modificación genética como estrategia de mejora nutricional de vegetales.

El concepto de biotecnología de los alimentos no es algo nuevo, existe desde que el hombre se hizo sedentario e inició la “domesticación” de animales y plantas (9). Tanto en agricultura como en ganadería, siempre se ha intentado realizar una selección genética de los mejores ejemplares para así cruzarlos y obtener una descendencia con mejores características. En el caso de las plantas podrían ser características como mayor resistencia a plagas y a sequías, mejor productividad, menor toxicidad, etc... Esta mejora tradicional (fruto de la variación genética natural o de mutagénesis (9) tarda mucho tiempo en producirse (ya que necesita de muchos cruces y generaciones), pero es efectiva: se consiguen ejemplares genéticamente modificados para ser más afines a las necesidades humanas. Es por esto que no podemos decir que ningún alimento sea “natural” en el sentido estricto, ya que sus especies de origen han sufrido modificaciones genéticas inducidas por el hombre a lo largo del tiempo (9). Además, hay que tener en cuenta que desde hace miles de años se usan procesos biotecnológicos para elaborar alimentos fermentados (vino, cerveza, pan, yogur, queso,...) (9).

Con la llegada de la ingeniería genética se lograron mejoras más rápidas, controladas e incluso imposibles introducir con la biotecnología tradicional, ya que la ingeniería genética hace posible trasladar entre especies los genes que codifican para ciertas características deseadas (9). Así es como obtenemos los OGMs (organismos genéticamente modificados), tal y como los entiende actualmente la

sociedad. El proceso de obtención, a grandes rasgos, consta principalmente de tres etapas: 1) preparación del material genético a introducir 2) transformación de la célula ·3) selección y regeneración del OGM a partir de las células transformadas(9).

Las aplicaciones de esto son muy variadas, y difieren en función del organismo al que se le apliquen. Para hacer un resumen, podemos decir que existen OGMs con aplicación en el campo médico-farmacéutico (pertenecen a la biotecnología roja), industrial (biotecnología blanca), medioambiental (biotecnología gris), agricultura (biotecnología verde) y marino (biotecnología azul) (10). Lo que nos ocupa aquí es principalmente lo que tiene que ver con el sector alimentario, es decir, los alimentos transgénicos, y en concreto aquellos que contienen mejoras nutricionales. Existen muchos desarrollos, nacionales (como el trigo sin gluten del investigador español Francisco Barro) e internacionales que van en este sentido.

Un alimento modificado genéticamente, según la legislación vigente, es aquel que contiene o está compuesto por OGM o ha sido producido a partir de ellos (11). Cuando se habla de OGMs se entiende que se habla de organismos que han sido modificados genéticamente por técnicas de ingeniería genética (aunque como ya se ha explicado esto es algo incompleto porque el proceso de domesticación implicaba una modificación genética tradicional de las especies), y mucha gente lo entiende como sinónimo de transgénico. En la UE, los alimentos transgénicos están sujetos a una regulación muy exhaustiva por tratarse de OGMs y de nuevos alimentos. El marco regulatorio abarca todas las fases que puedan existir de los mismos, desde la investigación hasta la autorización de la comercialización, y además establece la normativa para su trazabilidad y etiquetado (12). El tremendo desarrollo normativo que esto supone, que era entendible cuando surgieron los primeros desarrollos (por el principio de seguridad y por la necesidad de minimizar los riesgos que se plantearon cuando surgieron), sumado al rechazo de esta tecnología y a la percepción social negativa por parte de la población de la UE, han hecho que la UE se quede atrás en cuanto a la explotación de los OGMs en el sector alimentario (12). Sin embargo, este rechazo hacia los OGMs no se observa cuando la aplicación va hacia la obtención de productos farmacéuticos (12). Mientras que el resto del mundo avanza, Europa sigue estancada en el debatiendo si son seguros (13), pese a que ya han pasado más de 20 años desde que se comercializó por primera vez un alimento genéticamente modificado y no hay documentación científica que reporte ningún problema derivado de los mismos (14). A esto también contribuyen las presiones de los grupos ecologistas. De hecho, según el informe de la ISAA de 2016, muchos piensan que la UE no cambiará su postura en mucho tiempo por la gran influencia que tienen estos grupos sobre el parlamento europeo (13).

2.4 Nuevas herramientas biotecnológicas: Edición génica

Técnicas de edición génica es como se denomina a un nuevo conjunto de técnicas de ingeniería genética en las que se puede insertar, delecionar o sustituir parte del genoma de forma dirigida. Esto se consigue

mediante nucleasas que realicen una rotura de doble cadena (DSB), para que luego se produzca la edición durante la reparación del DNA, ya sea por recombinación de extremos no homólogos (NHEJ) u homólogos (HDR) (15). Una reparación por NHEJ puede funcionar sin plantilla, pero también es probable que, al ser un mecanismo de baja fidelidad, genere errores (indels) que lleven a mRNAs sin sentido o a proteínas no funcionales. Por esto mismo, es preferible cuando se busca inactivar un gen de forma permanente. En cambio, HDR es un mecanismo con alta fidelidad, que necesita plantilla y que sería preferente para restaurar la función del gen conservando su regulación (16). El hecho de que la reparación se lleve a cabo por NHEJ o HDR depende de la etapa del ciclo celular en la que se encuentre la célula y de la presencia o ausencia de plantilla (17).

Existen varias técnicas de edición génica: meganucleasas (MNs), nucleasas de dedos de zinc (ZFNs), TALENs, CRISPR/Cas 9, targetrons, etc... (17). MNs, ZFNs y TALENs actúan mediante interacciones proteína-DNA, mientras que CRISPR/Cas9 y targetrons utilizan RNA para la interacción (17).

El sistema CRISPR consta de repeticiones cortas de DNA separadas por secuencias espaciadoras. Fue descubierto por el científico español de la Universidad de Alicante Francis Mojica, quien observó que es un sistema de defensa que poseen las procariontas que fragmenta e incorpora el DNA viral a estas repeticiones. Una vez introducidos, se transcriben formando sgrRNA (RNA guía). Estos, en el caso de una infección viral posterior, serán responsables de dirigir la degradación del material genético del virus para impedir que complete su ciclo de vida (18). Cada procarionta tiene su propio sistema CRISPR con su respectiva nucleasa (Cas), y existen dos clases de sistemas según las características de su nucleasa (18). Para edición génica se suelen utilizar sistemas de clase II. El sistema más utilizado en la actualidad es CRISPR/Cas9, que es un sistema que procede de *Streptococcus pyogenes* (18). Esto se debe a que es una técnica altamente eficaz, rápida y asequible (lleva 2-3 semanas de trabajo y tiene un coste de unos 20-30€) (15). Tiene innumerables aplicaciones y se están estudiando otras muchas en medicina, ganadería, agricultura, etc... En el campo de la agricultura también se está utilizando mucho CRISPR/Cpf1, que procede de *Francisella tularensis* (18).

Existe un vacío legal respecto a los productos de edición génica, ya que no se tiene claro si entran en la definición de transgénico o no, por lo que no se tiene claro si le aplica la misma legislación, o si por el contrario necesitan de un desarrollo normativo aparte. La controversia se debe a que por un lado se modifica el genoma utilizando técnicas de ingeniería genética (por lo que podrían considerarse OGMs, que es el término que viene dado en la legislación), pero por otro lado las modificaciones introducidas son las mismas e indistinguibles de las que podrían conseguirse mediante mejora genética convencional y a que no se introduce material genético de otros organismos (18).

Estas especificaciones y las posibilidades económicas que ofrecen las aplicaciones de estas técnicas llevan a la necesidad de plantear una calificación y un tratamiento normativo diferente para poder explotar esta tecnología, ya que la legislación aplicable a transgénicos es muy exhaustiva (algunos autores hablan incluso de sobrelegislación) y la percepción social de todo aquello que tenga la calificación de OGM en alimentación es muy negativa.

3.- Objetivos

Los objetivos de este trabajo son:

- Recopilar información científico-técnica sobre los principales alimentos genéticamente modificados por técnicas de ingeniería genética sobre los cuales se haya desarrollado alguna mejora de su contenido en carotenoides.
- Dar una visión general sobre la situación actual e impacto de los mismos

4.- Metodología

Se ha realizado una revisión bibliográfica que ha abarcado fuentes primarias (artículos científicos de revistas, informes de diversos organismos tanto privados como públicos, documentos legales y administrativos de diversos países, etc...) y secundarias (bases de datos como PubMed, libros, páginas web de organizaciones públicas y privadas, páginas web de administraciones públicas, páginas web de proyectos de investigación, etc ...).

Como existen muchos desarrollos encaminados a mejora nutricional en OGMs en carotenoides se decidió seleccionar solamente los más relevantes dentro del grupo de los carotenos, ya que estos pueden tener aplicaciones muy positivas tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados. Se seleccionaron como relevantes el arroz dorado y el plátano enriquecido en pro-vitamina A por lo avanzado de su estado regulatorio, por lo llamativo de sus patentes (el arroz dorado tiene una patente humanitaria (3) y el plátano no tiene patente a explotar (19)) y su interés humanitario (para ayudar a la erradicación de la deficiencia de vitamina A y sus consecuencias en países en vías de desarrollo). También se seleccionaron dos desarrollos con mejora del contenido en licopeno por sus propiedades. Uno de ellos se seleccionó por estar comercializado desde hace algún tiempo (piña rosa) y el otro por los niveles que se alcanzaron del mismo (tomate). Por último, se buscaron desarrollos que hubiesen utilizado técnicas de edición génica. Las búsquedas en PubMed con las palabras “carotene gene editing”, “vitamin a gene editing”, “vitamine a crispr cas”, “carotenoid gene editing”, “carotene crispr cas”, “zeaxantin crispr cas”, “zeaxantin gene editing”, “lutein gene editing” y “lutein crispr cas” apenas arrojaron resultados. Se explica el único desarrollo exitoso que ha habido mediante estas técnicas.

5.- Resultados y discusión

Cuando se habla de OGMs y carotenoides, normalmente pensamos en el ejemplo más famoso, el arroz dorado. Sin embargo, hay muchos más desarrollos en distintas especies que van dirigidos a esto mismo. En la Fig. 2 aparece un resumen de los mismos. En esta figura podemos observar que no se sigue la misma estrategia en todas las especies modificadas.

Estas distintas estrategias se pueden resumir en general en:

- Estrategias “push”, que a través de la sobreexpresión de una o varias enzimas consiguen que se avance en una ruta metabólica para conseguir uno o varios compuestos de la misma (20). Esta estrategia ha demostrado ser de las más eficientes. Se utiliza por ejemplo en el arroz dorado, el plátano enriquecido en vitamina A y en muchos otros desarrollos.
- Estrategias “block”, que consigue aumentar el compuesto deseado a través del silenciamiento génico de los derivados o de las rutas con las que compite por precursores (20). Esto se utiliza por ejemplo en las patatas biofortificadas con zeaxantina o β -caroteno, en las naranjas fortificadas en β -caroteno, etc...
- Estrategias “metabolic sink”, que consisten en hacer que se acumule ese compuesto en una partederminada de la célula (20). Se utiliza por ejemplo en los tomates con mayor contenido en licopeno.

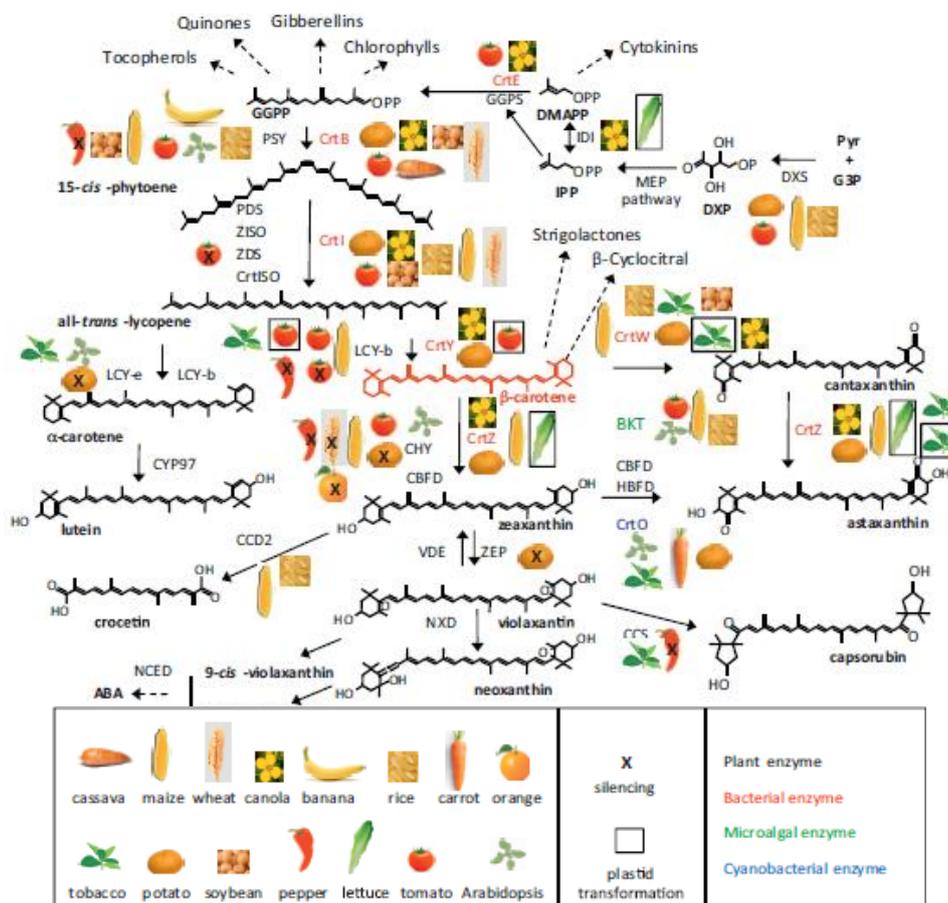


Fig 2.: Resumen de los cambios introducidos en ruta biosintética de los carotenoides en las distintas especies. Todos estos pasos ocurren en los plastos. Marcados en negro están las enzimas de origen vegetal, en rojo las bacterianas, las de cianobacterias en azul y las de microalgas en verde. Al lado de cada paso se muestra la especie donde se ha sobreexpresado o silenciado el enzima. En los cuadrados se representan los casos de transformación de plastos. Imagen e información obtenida de (20)

Ha habido muchos desarrollos destinados a aumentar el contenido de carotenoides (especialmente de compuestos bioactivos como β -caroteno, licopeno o xantinas) en alimentos básicos, como se puede observar en la Fig. 2.

5.1 Arroz dorado

El arroz (*Oryza sativa*) es un cereal que está incluido dentro de los alimentos básicos. Es uno de los alimentos más consumidos en el mundo y, según la FAO, está previsto que en 2018/2019 aumente su consumo (21). Hay muchas regiones del planeta donde constituye la base de la dieta e incluso, cuando la población es pobre, acaba siendo casi el único componente de la misma. Aunque la planta es capaz de producir β -caroteno (que es uno de los carotenoides con acción pro- vitamina A) en otras partes de la planta, en el endospermo, que es lo que se consume, no se sintetiza (22). Es por esto que en las poblaciones que lo usan como fuente casi exclusiva de alimento acaban produciéndose déficits o carencias de vitamina A.

En la década de los 90 Potrykus, Beyer y colaboradores empezaron a investigar sobre la posibilidad de introducir las vías necesarias en el arroz para solventar este problema. Esta investigación, por su interés humanitario, la financiaron la Fundación Rockefeller y la Fundación Bill y Melinda Gates (23). En el año 2000, se publicaron en la revista Science los detalles de su primer desarrollo científico, conseguido mediante transformación por *Agrobacterium sp. LBA4404* (6)

Solamente era necesario introducir los genes que codifican para algunas enzimas, como la fitoeno sintasa (psy) de origen vegetal, que produce fitoeno, y una caroteno desaturasa bacteriana, que cataliza la introducción de cuatro dobles enlaces. (6) En vez de la caroteno desaturasa bacteriana podrían introducirse también genes que codifican para enzimas vegetales, como la fitoeno desaturasa, la ζ -caroteno desaturasa (que catalizan cada una la introducción de dos dobles enlaces) y una isomerasa, pero esto implicaría un mayor esfuerzo (3).

Se transformaron embriones inmaduros de arroz por un lado con el vector pB19hpc (ver construcción en Fig. 3), que debería haber dirigido la ruta de síntesis solamente hacia la formación de licopeno en los plastos del endospermo (6).

Por otro lado, se co-transformaron embriones inmaduros de arroz con dos vectores: pZPsC and pZLcyH (ver construcciones en Fig. 3), uno de los cuales contenía una licopeno- β -ciclasa para completar la ruta biosintética y llegar a tener carotenoides (6).

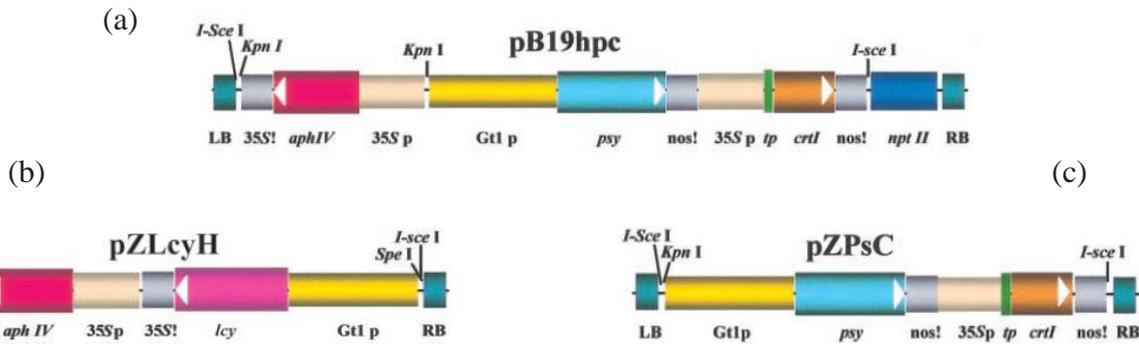


Fig 3.: (a) Construcción del vector pB19hpc. Contiene el gen *psy* (fitoeno sintasa) de *Narcissus pseudonarcissus* (con una secuencia de que codifica para un péptido funcional) y el gen *crtI* (fitoeno desaturase) de la bacteria *Erwinia uredovora* (que además contiene la secuencia del péptido de la subunidad pequeña de la rubisco del guisante). Ambos estaban bajo el control de *Gtl* (glutelina específica de endospermo) y el promotor 35S constitutivo del virus del mosaico de la coliflor. (b) Construcción del vector pZLcyH. Contiene la licopeno- β -ciclasa (que a su vez contiene un péptido que le permite acceder al plasto) de *Narcissus pseudonarcissus*. Su expresión está controlada por el promotor de la glutelina del arroz y la del gen marcador *aphIV* por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. (c) Construcción del vector pZPsC. Se diferencia del plásmido pB19hpc en que no tiene el marcador *aphVI*. Figura e información tomadas de (6)

Sin embargo, no es necesario introducir esa licopeno- β -ciclasa, ya que en ninguno de los casos hubo acúmulo de licopeno en el endospermo, pero sí que se produjo β -caroteno, luteína y zeaxantina (6). Esto se debe a que en la variedad salvaje del arroz existen licopeno- β -ciclasas y α y β -caroteno ciclasas (3), que permiten que continúe la ruta biosintética. Gracias a esto, estos OGMs poseen un característico color amarillo al que deben su nombre.

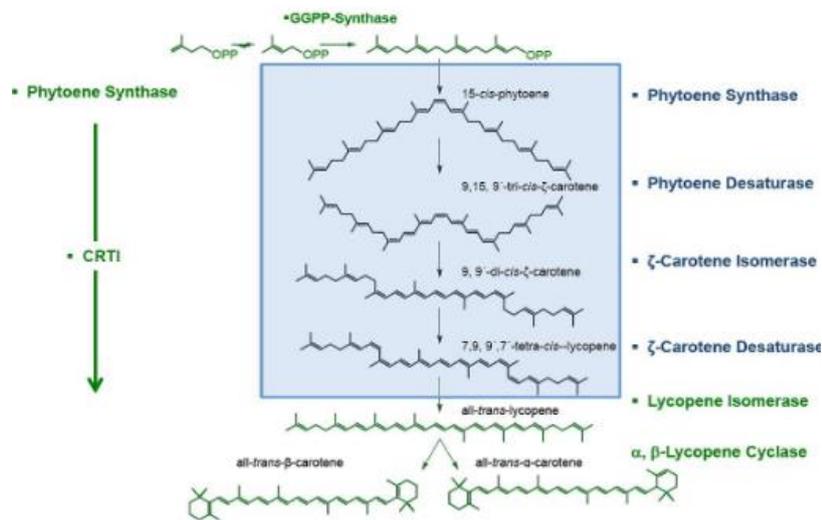


Fig 4.: Ruta biosintética de carotenoides en *Oryza sativa*. En azul se marcan las enzimas que no están presentes en su endospermo. En verde, las que sí lo están. Imagen obtenida de (3)

En esta primera generación de arroz dorado (GR1) se obtuvieron niveles de carotenoides del orden de 1,6 $\mu\text{g/g}$ (6) en el prototipo, y de 6 $\mu\text{g/g}$ en los ensayos de campo (3). Aunque esto pone de manifiesto que sí es posible tener carotenoides en el endospermo, no son niveles suficientes para poder luchar contra

la deficiencia de vitamina A. Existe una segunda generación de arroz dorado (GR2) que es capaz de producir hasta 37 $\mu\text{g/g}$ de carotenoides, de los cuales 31 $\mu\text{g/g}$ son de β -caroteno (3).



Fig.5: De izquierda a derecha arroz variedad salvaje, arroz dorado de primera generación (GR1) y arroz dorado de segunda generación (GR2). A más cantidad de carotenoides contiene, más amarillo es. Imagen obtenida de (3)

En la actualidad este arroz de segunda generación, en concreto la línea GR2E, está aprobado para consumo humano en países como Canadá (24), Australia y Nueva Zelanda (25) pese a que no se tiene previsto comercializarlo ni cultivarlo en estos países. De acuerdo con los informes de aprobación de ambos países, se ha pedido la autorización debido a que podría entrar de forma inadvertida en cargamentos importados. Como en estos países no hay deficiencia de vitamina A (ya que la población tiene acceso a una dieta variada) es obligado hacer referencia al posible riesgo que pudiese suponer tomar este arroz GR2E para una persona que no tuviese déficit de vitamina A. Se explica en el informe australiano que una ingesta alta de β -caroteno en alimentos no se ha asociado con toxicidad relacionada con vitamina A, pero que tomando dosis muy altas (≥ 30 mg/día) de β -caroteno puede desarrollarse carotenemia o carotenosis, que es una condición clínica benigna en la que la piel se pigmenta de un tono amarillo-naranja. Un consumo diario de hasta 50 mg de β -caroteno como suplemento no producía ningún efecto adverso en todos aquellos que no tuviesen riesgo de desarrollar cáncer de pulmón. Si el individuo tuviese riesgo de desarrollar este tipo de cáncer, aumentaría ligeramente el riesgo de padecerlo y de morir debido a esta causa en el caso de que tomaran diariamente más de 20mg de β -caroteno durante entre 5 y 8 años. Este riesgo disminuiría de 4 a 6 años después de dejar de tomar estos suplementos. Es por esto que se juzgó que un posible consumo de arroz GR2E no supondría ningún riesgo para la población (25).

Se ha pedido la autorización también en otros países, como en Estados Unidos (25) y en Filipinas (26), pero las autoridades aún no se han pronunciado al respecto. Se busca que Filipinas sea el país de cultivo y origen. Esto tiene sentido, ya que entre el 30-70% de la energía procedente de la dieta en este país proviene del arroz, y como consecuencia, su población tiene un riesgo alto de déficit de vitamina A. Hay varias líneas de segunda generación con diferente desarrollo. El desarrollo de la línea GR2E se produce mediante una transformación del callo embriogénico por *Agrobacterium tumefaciens*. El vector utilizado es pSYN12424 (ver construcción en Fig. 6).

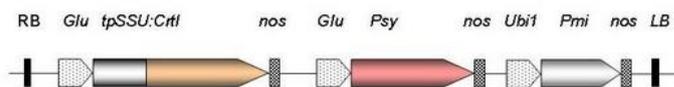


Fig. 6: Construcción del vector pSYN12424. Contiene tres cassettes de genes. De izquierda a derecha: 1) Gen crtI (que codifica para la fitoeno desaturasa) de la bacteria *Pantoea ananatis*. En su extremo 5' está fusionado con el gen de la subunidad pequeña de la rubisco de *Pisum sativum*, que codifica para un transcrito que hará que la proteína migre al plasto. 2) Gen ZmPSY1 (en la figura psy, que codifica para la fitoeno sintasa) de *Zea mays*. Ambos cassettes están regulados por el promotor de la glutelina del arroz (Glu). 3) Gen pmi (codifica para la fosfomanosa isomerasa) de *Escherichia coli*, como marcador selectivo (los callos transformados son capaces de crecer en medios con manosa, ya que pueden transformar la manosa-6- fosfato a fructosa-6- fosfato). Su expresión está controlada por el promotor de la ubiquitina del maíz (Ubi1 en la imagen). Información obtenida de (24) e imagen obtenida de (3)

5.2 Plátano enriquecido con pro-vitamina A

El plátano es uno de los cultivos más importantes de frutas (en concreto el cuarto después de arroz, trigo y maíz (27)) y uno de los 10 cultivos más importantes en cuanto a producción (28). Se cultiva en los trópicos y subtropicos y en muchos de estos países constituye un alimento básico ya sea crudo como postre o cocinado como fuente de carbohidratos. En el este de África, el cultivar principal es el “East African Highland Banana” (EAHB) (*Musa acuminata* AAA-EA), que se consume hervido o al vapor. En el oeste de África es el plátano macho (*Musa × paradisiaca*), que se consume frito o asado.

Los plátanos contienen provitamina A. En concreto, los plátanos Cavendish contienen β -caroteno del orden de 1 a 4 $\mu\text{g/g}$ y los plátanos EAHB (Nakitembe) 10 $\mu\text{g/g}$. Son niveles bajos de provitamina A. Por el contrario, hay otros con niveles muy altos de β -caroteno (como plátanos Fe'i de Micronesia y Papua New Guinea), hasta del orden de 340 $\mu\text{g/g}$.

Como en África, y en concreto, en Uganda se consumen los plátanos con bajo contenido en β -caroteno hay un elevado porcentaje de deficiencia de vitamina A. Es por esto que se buscaba desarrollar plátanos enriquecidos en provitamina A. La fertilidad tanto femenina como masculina del plátano domesticado es muy baja, por lo que resulta imposible introducir las características deseadas de forma no transgénica. Se han desarrollado plátanos genéticamente modificados que resuelven esta problemática, con el apoyo de la Fundación Bill y Melinda Gates, y el del Departamento para el Desarrollo Internacional de Reino Unido, que aportan al menos el 50% de los requerimientos diarios (estimando un consumo de 300 g/día en niños y de 500 g/día en mujeres y teniendo en cuenta que el cocinado elimina un 30% del contenido de α - y β -caroteno, el aporte es de al menos 20 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno). A este proyecto se lo conoce como proyecto Banana 21.

Se desarrollaron líneas transgénicas de plátano variedad Cavendish enano (*Musa acuminata* grupo AAA, usada aquí como modelo de EAHB por ser también triploide) mediante transformación por *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 sobre una suspensión de células embriogénicas (28).

Se utilizaron para las diferentes construcciones distintos promotores, tras evaluar su comportamiento en la pulpa del fruto:

- Promotor constitutivo de poliubiquitina del maíz (Ubi). Por su naturaleza constitutiva se expresa en la pulpa en todo momento.
- Promotor 1 de la expansina de la banana (Exp1). No se activa en la pulpa hasta etapas tardías del desarrollo del fruto.
- Promotor de ACC oxidasa (aminociclopropanocarboxilato oxidasa) de la banana. Tiene poca expresión en pulpa desde la semana 3 a la 9, pero después aumenta y se estabiliza cuando la fruta ya está madura. Se activa por tanto en etapas anteriores a aquellas en las que se activa Exp1

Para evaluar la actividad de los mismos se empleó la siguiente estructura de construcción: promotor + UidA de *Escherichia coli* (codifica para la β -glucuronidasa), que contiene un intrón de catalasa, para usarla como marcador + secuencia terminadora reguladora 3' de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (Nos), dentro del vector pBIN19.

Los genes utilizados para incrementar la expresión de provitamina A son el gen ZmPsy1, que codifica para la fitoeno sintasa de *Zea mays* o el gen MtPsy2a, que codifica para la fitoeno sintasa 2a de plátano Fe'i (*Musa troglodytarium x acuminata*) cultivar Asupina.

Podía transformarse con solo uno de estos genes o con uno de estos genes y PaCrtl (fitoeno desaturasa de *Pantoea ananatis*). La estructura de los cassettes es la siguiente:

- Promotor - gen ZmPsy1 o MtPsy2a - nos, en el vector pCAMBIA-2300.
- Exp1 o Ubi - PaCrtl - nos, en el vector pBIN-19.

La selección de las plantas transgénicas se llevó a cabo gracias al gen nptII (codifica para la neomicina fosfotransferasa II, que confiere resistencia a este antibiótico), en ambos vectores (vector pBIN-19 y pCAMBIA-2300).

De las aproximadamente 250 líneas transgénicas que se generaron, se observó en los ensayos de campo que 11 tenían niveles mayores a $20\mu\text{g/g}$ de β -caroteno. Esto no se observó directamente en el primer ensayo, si no que ocurrió tras varias generaciones vegetativas. El mecanismo se desconoce, pero este hecho demuestra que las características introducidas son estables. La línea que más contenía ($50\mu\text{g/g}$ de β -caroteno de media) contenía la construcción Ubi - MtPsy2a - nos. La segunda línea en cuanto a contenido también contenía el promotor Ubi (lo que es consistente con los datos de expresión de los promotores en pulpa que se habían evaluado). Otras líneas que superaban el corte de los $20\mu\text{g/g}$ tenían las siguientes construcciones: ACO - ZmPsy1 -nos + Exp1 – PaCrtl – nos, ACO – ZmPsy1- nos, ACO-MtPsy2a – nos, ... (28)

Dos construcciones se donaron al National Agricultural Research Organization (NARO) de Uganda y se transformaron en dos cultivares utilizados en este país, incluido el EAHB (28).

Actualmente, está pendiente de aprobación por parte del Comité Nacional de Bioseguridad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de Uganda una solicitud de permiso para cocinar y consumir este plátano presentada por NARO (29).

5.3 Tomate enriquecido en licopeno

El tomate (*Lycopersicon esculentum* o *Solanum lycopersicum*) es un fruto que se consume tanto crudo como procesado (30). Se considera la hortaliza más internacionalizada y de mayor valor económico en el mundo. Su demanda está en continuo aumento, por lo que también su cultivo, producción y mercado. Respecto al aumento de la producción, aumenta su rendimiento más que su superficie cultivada (31).

El licopeno es un carotenoide que se encuentra en el tomate maduro y le confiere su color rojo. El contenido del mismo determina su atractivo y es uno de los indicadores de su calidad (32). Además, como se ha explicado en la introducción, es un potente antioxidante con efectos positivos sobre la salud.

Ha habido varios desarrollos que han conseguido incrementos significativos de licopeno a través de estrategias “push” y “block”. Un ejemplo de estrategia “push” puede ser la sobreexpresión del gen *psy* bacteriano, que codifica para la fitoeno sintasa 1 y ejemplos de “block” podrían ser la supresión de la 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenasa 1 (NCED1) mediante RNA-i específico para el fruto o el silenciamiento del gen stay green 1 (SGR1), que por interacción fisiológica directa aumentaba la actividad de la *psy1* (32). Sin embargo, hay un desarrollo en el que, sin buscarlo, se consiguieron resultados de incrementos de un 200%-300% en el contenido de licopeno.

En este desarrollo se buscaba obtener tomates que tardasen más en madurar mediante la acumulación de poliaminas. Para ello, se transformó mediante *Agrobacterium sp.* La construcción contenía toda la región codificante del gen SAMdc (S-adenosilmetionina descarboxilasa) de levadura bajo el promotor regulador de la maduración E8. Como gen marcador se utilizó un gen de resistencia a la kanamicina (30).

Se observó que estos tomates eran más rojos que los de la variedad salvaje y que contenían más β -caroteno y licopeno (200-300%). Esta acumulación tiene que ver con la diferenciación de cloroplastos a cromoplastos, que probablemente esté influenciada por los niveles de poliaminas (30).

No se ha encontrado información acerca de su estado regulatorio, por lo que podemos decir que no se encuentra comercializado ni pendiente de aprobación por parte de ninguna administración.

5.4 Piña rosada

La piña (*Ananas comosus*) es una sorosis que en sus variedades salvajes contiene β -caroteno (más a mayor grado de maduración del fruto, ya que el etileno producido en la piña causará la degradación de la clorofila y promueve la síntesis de precursores de carotenoides) (33). Este componente es uno de los

responsables del color amarillo de la pulpa. Sin embargo, hay que decir que existe una piña modificada genéticamente para controlar su floración, retrasar su maduración y para que acumule licopeno en su pulpa, obteniendo así un color rosado en vez del característico amarillo (34). Hablamos en concreto del cultivar “Del Monte Rosé” (35). En diciembre de 2016, la FDA dictaminó que este cultivar era seguro para el consumo humano y que podía comercializarse en EEUU (34) (36). No está autorizado su cultivo en este país (34) (36), pero sí que lo está en Costa Rica (37). La patente de este cultivar pertenece “Del Monte Fresh Produce GmbH” (38)

Para su desarrollo se transformaron células de tejidos de la variedad MD2 de forma simultánea con dos cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (*pMP90*) (38). Una de ellas contenía el plásmido pHCW.T-7 y la otra el plásmido pHCWflACC3'-2 (38). Posteriormente se regeneraron las plantas completas (38).

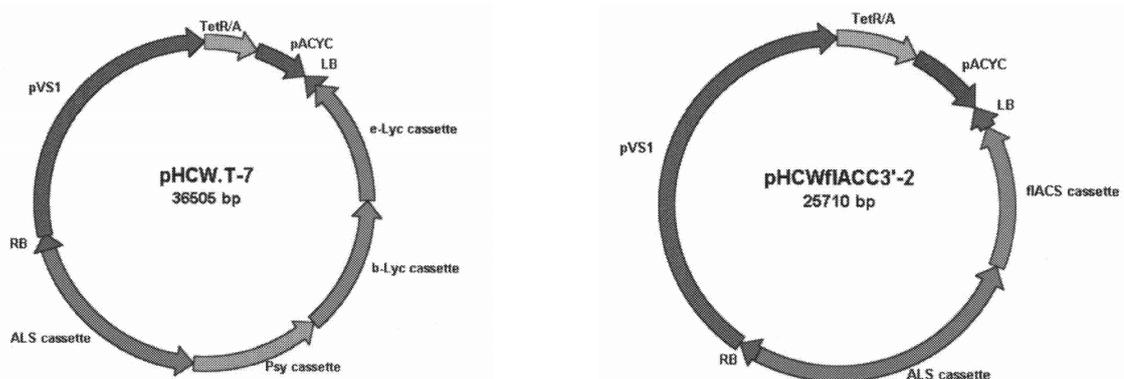


Fig 7.: Construcción de los vectores binarios pHCW.T-7 y pHCWflACC3'-2. LB: borde izquierdo. RB: borde derecho. TetR/A: gen de resistencia a tetraciclinas. pACYC: origen de replicación del plásmido pACYC, que permite la selección y el mantenimiento en *E.coli*. pVS1: replicón de *Pseudomonas aeruginosa* que asegura la replicación en *Agrobacterium tumefaciens*. Los cassettes tienen la siguiente estructura:

- Cassete ALS o SuRBHra, que funciona como un marcador selectivo: promotor constitutivo EHS-Ubpp, que contiene el promotor y la región 5' UTR del gen EHS (que codifica para la epóxido hidrolasa) y del gen tetramérico del gen de la ubiquitina (Ubi), ambos de la piña + *SuRBHra* (gen mutante de la acetolactato sintasa o ALS de *Nicotiana tabacum*) + terminador de la transcripción de la región 3' UTR del gen ALS del tabaco.
- Cassete Psy, que introduce el gen que codifica para la fitoeno sintasa: promotor modificado del gen BRI de la piña + gen Psy de *Citrus reticulata* + terminador de la transcripción de las regiones 3' UTR y flanqueantes del gen Ubi de la piña.
- Cassete e-Lyc / b-Lyc, que producen RNAi para silenciar la expresión de las licopeno ciclasas : promotor modificado del gen BRI de la piña + secuencia parcial codificante del gen e ó b-Lcy de la piña + intrón 2 del gen ST-LSI de *Solanum tuberosum* + secuencia parcial antisentido del gen e ó b-Lcy de la piña + terminador de la transcripción de las regiones 3' UTR y flanqueantes del gen Ubi de la piña.
- Cassete flACS, que produce RNAi para silenciar la expresión de la ACS: promotor modificado del gen BRI de la piña + secuencia parcial codificante del gen flACC3', que codifica para la ACS, del meristemo de la piña + intrón 2 del gen ST-LSI de *Solanum tuberosum* + secuencia parcial antisentido del gen flACC3' del meristemo de la piña + terminador de la transcripción de las regiones 3' UTR y flanqueantes del gen Ubi de la piña. Imagen obtenida de (38) e información obtenida de (38) y (35)

La estrategia seguida es una combinación de “push” y “block”. Por un lado, se aumenta la síntesis de licopeno aumentando la cantidad de fitoeno. Para esto se introduce el gen Psy de *Citrus reticulata* (codifica para la fitoeno sintasa) (38). Por otro lado se bloquea la conversión del licopeno a α y β -

caroteno por introducir dos construcciones que codifican para RNAi (*bLcy* and *eLcy*), dirigidos a suprimir la expresión de las licopeno ϵ y β -ciclasas (35). Además, se pretende controlar la floración mediante una construcción que contiene RNA i de *fLACC3'* (esto suprimiría la expresión de la ACS o ácido 1-aminociclopropanoico sintasa, que participa en el penúltimo paso de la biosíntesis de etileno) (35).

5.5 Tomate enriquecido en licopeno por edición génica múltiple

En este desarrollo, publicado a finales de abril de 2018, se utiliza una estrategia “metabolic sink”. Por un lado, buscan aumentar la síntesis de licopeno mientras que por otro bloquean su conversión a α y β -caroteno, y así conseguir la acumulación de licopeno en el fruto (32). Para esto se llevó a cabo una transformación mediada por *Agrobacterium sp.* Se utilizó el plásmido pYLCRISPR/Cas9-Lycopeno, cuya construcción viene detallada en la Fig. 7 (32). Se seleccionaron 6 sgRNAs para “targets” de los exones de 5 genes diferentes, con un contenido de GC 55-75% para que la edición génica fuese eficiente. Se evitó que hubiese en los mismos 4 ó más T ya que la RNA polimerasa III los reconocería como secuencia terminadora de la transcripción y se usó un programa para predecir los plegamientos del RNA, para evitar más de 5 apareamientos de bases entre el target y el sgRNA (32).

Los 5 genes donde estaban los “target” son SGR1, Blc (que tiene actividad tanto ϵ como β -ciclasa), LCY-E (codifica para la licopeno- ϵ -ciclasa), LCY-B1 y LCY-B2 (codifican para la licopeno- β -ciclasa). Como la edición de SGR1 es bastante importante para la acumulación de licopeno fue de este gen del que se seleccionaron 2 sgRNAs (32).

No se detectaron efectos “off-target”, por lo que se puede decir que la edición fue muy específica (32).

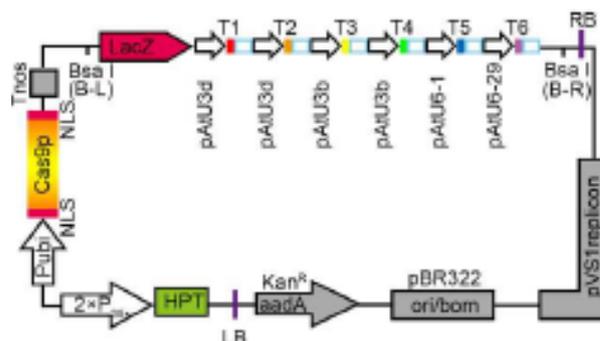


Fig. 7: Construcción del vector binario pYLCRISPR/Cas9-Lycopeno. HPT(□H) codifica para la higromicina B fosfotransferasa. Los 6 “targets” están representados en las cajas de colores, con sus respectivos promotores al lado. Información e imagen obtenidas de (32)

No se ha encontrado información respecto a su estado regulatorio, probablemente por tratarse de un desarrollo muy reciente y por el vacío legal en el que están actualmente los productos de edición génica.

6.- Conclusiones

Se ha recopilado información científico-técnica sobre los desarrollos de organismos modificados genéticamente más relevantes en los que se ha provocado una mejora del contenido de carotenoides. Sin embargo, existen muchos más desarrollos (tanto con interés humanitario como con posible aplicación para el mercado de los alimentos funcionales) que sería interesante abordar.

Se ha abordado el impacto de la problemática del déficit de vitamina A existente en países en vías de desarrollo y cómo estos alimentos enriquecidos en carotenoides, como el arroz dorado o el plátano enriquecido en pro -vitamina A, pueden solucionarla. Es especialmente importante la existencia de patentes humanitarias o la no existencia de patentes para esto mismo, ya que posibilita económicamente su llegada a la población diana. Se está progresando en el estado regulatorio de aquellos transgénicos con interés humanitario (el arroz dorado se ha aprobado ya en algunos países, aunque aún en ninguno con déficit de vitamina A en su población y el plátano enriquecido en provitamina A está siendo evaluado actualmente por las autoridades de Uganda). En aquellos con interés comercial no se ha encontrado información acerca del estado regulatorio del tomate enriquecido en licopeno, pero la piña rosa en cambio lleva algunos años estando aprobado su cultivo en Costa Rica y permitida su comercialización en EEUU.

Solo hay un desarrollo exitoso obtenido mediante edición génica (tomate enriquecido en licopeno). Es necesaria más investigación en este tema, aunque quizás habría que esperar a que se clarificasen ciertos aspectos legales. La situación regulatoria de aquellos alimentos productos de edición génica es complicada, ya que no se sabe qué legislación deben seguir.

7.- Bibliografía

1. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Indicadores de Salud 2017. Evolución de los indicadores del estado de salud en España y su magnitud en el contexto de la Unión Europea. [Internet] Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2017. [Revisado marzo 2018, citado abril 2018] Disponible en: <https://www.msssi.gob.es/estadEstudios/estadisticas/inforRecopilaciones/docs/Indicadores2017.pdf>
2. Barberá Mateos JM, Díaz LE, Duarte de Prato A, Gálvez Peralta J, Gil Hernández Á, Gómez S, et al. Alimentos Funcionales: Aproximación a una nueva alimentación Alimentación. [Internet] Madrid: D.G. de Salud Pública y Alimentación; 2007 [consultado abril 2018] Disponible en: <http://www.madrid.org/bvirtual/BVCM009703.pdf>
3. The Golden Rice Project [Internet] Golden Rice Humanitarian Board (Meyer,J); 2005-2018 [consultado abril 2018] Disponible en: <http://www.goldenrice.org/index.php>
4. WHO. [Internet] Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. WHO Global Database on Vitamin A Deficiency. Geneva: World Health Organization; 2009 [consultado abril 2018] Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44110/9789241598019_eng.pdf;jsessionid=C5B9656CD42A782ED478D042B8B149CE?sequence=1
5. Latham MC. Nutrición humana en el mundo en desarrollo. [Internet] Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Colección FAO: Alimentación y nutrición n° 29; 2002. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/006/w0073s/w0073s00.htm>
6. Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P et al. Engineering the Provitamin A (b-Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. Science [Internet] 2000 [consultado abril 2018]; 287 (5451), 303-305. doi: 10.1126/science.287.5451.303

7. Chea EP, Milstein H. Vitamin, A. [Internet] Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 [actualizado 25 enero 2018, consultado abril 2018] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482362/>
8. Viuda-Martos M, Sanchez-Zapata E, Sayas-Barberá E, Pérez-Álvarez JA, Fernández-López J. Tomato and tomato by-products. Human health benefits of lycopene and its application to meat products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. [Internet] 2014 [consultado mayo 2018]; 54: 1032-49. doi: 10.1080/10408398.2011.623799
9. Sociedad Española de Biotecnología. Biotecnología y alimentos [preguntas y respuestas]. Sociedad Española de Biotecnología; 2003.
10. Hablando claro, un blog de Monsanto. [Internet] ¿Sabías que existen 5 tipos de biotecnología? [consultado mayo 2018] Disponible en: <http://www.monsantoblog.es/sabias-que-existen-cinco-tipos-de-biotecnologia/>
11. Reglamento (CE) n° 1829/2003, de 22 de septiembre de 2003, sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. OJ L [Internet] 18.10.2003 [consultado mayo 2018]. 268, p. 1–23 Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/ALL/?uri=CELEX:32003R1829>
12. Alcalde E, Beltrán JP, Cámara M, Cánovas JM, Costa J, Cubero JI, et al. Organismos modificados genéticamente. Alcalá de Henares: Ephemera; 2006.
13. ISAA. Brief 52. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016.[Internet]. N° 52. ISAA; 2016.[consultado abril 2018] Disponible en: <https://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/52/download/isaaa-brief-52-2016.pdf>
14. Cámara Hurtado M. Solemne Acto Académico de Investidura de Doctor Honoris Causa al Señor D. Marc Van Montagu. Universidad Internacional Menéndez Pelayo (UIMP); 2015.
15. Lacadena JR. Edición genómica: ciencia y ética. Revista Iberoamericana de Bioética [Internet] 2017 [consultado mayo 2018]; 3:1-16. doi: [10.14422/rib.i03.y2017.004](https://doi.org/10.14422/rib.i03.y2017.004)
16. Cox DB, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. Nat Med. [Internet] 2015 [consultado mayo 2018]; 21(2):121–131. doi: 10.1038/nm.3793.
17. Guha TK, Wai A, Hausner G. Programmable Genome Editing Tools and their Regulation for Efficient Genome Engineering. Comput Struct Biotechnol J. [Internet]2017 [consultado mayo 2018]; 15:146-160. doi: 10.1016/j.csbj.2016.12.006.
18. Fundación Antama. La nueva revolución de la edición génica: CRISPR. [Internet] Fundación Antama; 2018 [consultado mayo 2018] Disponible en: <http://fundacion-antama.org/guia-sobre-la-nueva-revolucion-de-la-edicion-genica-crispr/>
19. Banana 21 project [Internet] Banana 21; 2016 [consultado mayo 2018] Disponible en: <http://www.banana21.org>
20. Giuliano G. Provitamin A biofortification of crop plants: a gold rush with many miners. Current Opinion in Biotechnology [Internet] 2017 [consultado abril 2018]; 44:169-180. doi:[10.1016/j.copbio.2017.02.001](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.02.001)
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rice Market Monitor (RMM). April 2018 [Internet] FAO; 2018 [consultado mayo 2018]; XXI(1). Disponible en: <http://www.fao.org/3/I9243EN/i9243en.pdf>
22. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera Forneiro L, Cuadrado Vives C. Tablas de Composición de Alimentos.16 ed. Madrid:Editorial Pirámide 2013.
23. Moghissi AA, Pei S, Liu Y. Golden rice: scientific, regulatory and public information processes of a genetically modified organism. Crit Rev Biotechnol.[Internet]; 2016 [consultado mayo 2018] ; 36(3):535-41. doi: 10.3109/07388551.2014.993586
24. Health Products and Food Branch, Health Canada. Novel Food Information – Provitamin A Biofortified Rice Event GR2E (Golden Rice). [Internet]. Health Products and Food Branch, Health Canada [actualizado marzo 2018, consultado mayo 2018] Disponible en: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/genetically-modified-foods-other-novel-foods/approved-products/novel-food-information-golden-rice-gr2e.html>.
25. Food Standards Australia New Zealand. Approval report - Application A1138. Food derived from Provitamine A Rice Line GR2E. [Internet] Food Standards Australia New Zealand; 2017 [consultado mayo 2018] Disponible en: <http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Documents/A1138%20Approval%20report.pdf>

26. Philippines Rice Research Institute (PhilRice) & International Rice Research Institute (IRRI). Public information sheet for direct use as food and feed, or for processing (to be accomplished by the Applicant and notarized). Proposal for direct use as food and feed, or for processing. Provitamin A Biofortified GR2E Rice. [Internet] Philippines Rice Research Institute (PhilRice) & International Rice Research Institute (IRRI); 2017. [consultado mayo 2018] Disponible en: <http://biotech.da.gov.ph/upload/GR2E/GR2E-FFP-PIS-PH.pdf>
27. Buah S, Mlalazi B, Khanna , Dale JL, Mortimer CL. The Quest for Golden Bananas: Investigating Carotenoid Regulation in a Fe'i Group Musa Cultivar. J. Agric. Food Chem. [Internet] 2016 [consultado mayo 2018] 64 (16):3176–3185. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05740
28. Paul JY, Khanna H, Kleidon , Hoang P, Geijskes , Daniells , et al. Golden bananas in the field: elevated fruit pro-vitamin A from the expression of a single banana transgene. Plant Biotechnology Journal [Internet] 2017 [consultado mayo 2018];15: 520–532. doi: 10.1111/pbi.12650
29. ChileBio. [Internet] Uganda lista para aprobar plátano transgénico alto en provitamina A que evita la ceguera infantil [consultado mayo 2018] Disponible en: <http://www.chilebio.cl/2018/03/14/uganda-lista-para-aprobar-platano-transgenico-alto-en-pro-vitamina-a-que-evita-la-ceguera-infantil/>
30. Mehta RA, Cassol T, Li N, Handa AK, Matoo AK. Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality and vine life. Nature biotechnology [Internet] 2002 [consultado mayo 2018]; 20 (6): 613-8. doi:10.1038/nbt0602-613
31. Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente. Ficha de material vegetal : Tomate. [Internet]. Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente [consultado mayo 2018] Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/app/MaterialVegetal/fichaMaterialVegetal.aspx?idFicha=2193>
32. Li X, Wang Y, Chen S, Tian H, Fu D, Zhu B, et al. Lycopene is enriched in Tomato Fruit by CRISPR/Cas9-mediated multiplex genome editing. Frontiers in Plant Science [Internet] 2018 [consultado mayo 2018] ; 9 : 559. doi: 10.3389/fpls.2018.00559
33. Rosas Domínguez C, González Aguilar G A (dir) Tesis doctoral: contenido de compuestos bioactivos y su contribución a la capacidad antioxidante durante la maduración de piña cv. "esmeralda". [Tesis doctoral en Internet][Hermosilla, Sonora]: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.; 2011 [consultado mayo 2018]. Disponible en: <http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/179>
34. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Biotechnology Consultation - Note to File BNF 000149. [Internet]. U.S. Food and Drug Administration (FDA); 2016 [consultado mayo 2018]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/geplants/submissions/ucm533286.htm>
35. Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), United States Department of Agriculture. APHIS response on the regulatory status of importing genetically engineered. [Internet] Riverdale: Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), United States Department of Agriculture; 2013 [consultado mayo 2018]. Disponible en: http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/reg_loi/aphis_response_del_monte.pdf
36. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA Concludes Consultation on Pink Flesh Pineapple. [Internet] U.S. Food and Drug Administration (FDA); 2016 [consultado mayo 2018]. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/newsevents/constituentupdates/ucm533075.htm>.
37. Programa kioscos ambientales para la Organización Comunitaria. Universidad de Costa Rica. Aprobada la piña transgénica en Costa Rica. [Internet] Universidad de Costa Rica [consultado mayo 2018] Disponible en: <http://kioscosambientales.ucr.ac.cr/noticias/noticias-ambientales/1150-aprobada-la-pina-transgenica-en-costa-rica.html>
38. Firoozabady E, Young TR, inventores; Del Monte Fresh Produce Company, solicitante. Patente US 2013/0326768 P1 [consultado mayo 2018] Disponible en: <http://www.freepatentsonline.com/y2013/0326768.html>