

## Apéndice I

# Declaración de Asilomar

*En una reunión celebrada en California del 24 al 27 de febrero de 1975, un grupo internacional de científicos decidió que debería establecerse un control estricto sobre el uso de la técnica experimental que permita el trasplante de genes de un organismo a otro. Esta declaración redactada por el Comité Organizador de la conferencia es el resumen de un informe sometido a la Asamblea de las Ciencias de la Vida de la Academia Nacional de Ciencias y aprobado por su comité ejecutivo el 20 de mayo de 1975.*

*Esta reunión fue organizada para revisar el progreso científico en la investigación sobre las moléculas de ADN recombinantes y para discutir las formas adecuadas de tratar los riesgos potenciales de índole biológica de este trabajo. Los impresionantes avances científicos que se han hecho ya en este campo y en estas técnicas son de una gran importancia en el avance hacia una comprensión de los procesos bioquímicos fundamentales en células procariotas y eucariotas. El uso de la metodología de la recombinación de ADN promete revolucionar la práctica de la biología molecular. Aunque hasta ahora no se ha producido ninguna aplicación de las nuevas técnicas, existen todas las razones para creer que serán de gran utilidad práctica en el futuro.*

*La atención de los participantes a la reunión se dirigió de manera especial a la cuestión de si la suspensión provisional de ciertos aspectos de la investigación en este área, impuesta por el comité para la recombinación de moléculas de ADN de la Academia Nacional de Ciencias de USA, en la carta publicada en julio de 1974, debería levantarse; y en ese caso cómo podría emprenderse*

*el trabajo científico con unos riesgos mínimos para el personal de laboratorio dedicado a este tipo de trabajo, para el público en general, y para los animales y plantas que comparten nuestro ecosistema.*

*Las nuevas técnicas que permiten la combinación de información genética entre organismos muy diferentes entre sí nos colocan en un área de la biología con muchas interrogantes. Incluso en la actualidad, el hecho de haber limitado la investigación en este campo, hace que la valoración de los posibles riesgos sea extremadamente difícil. Esta ignorancia es lo que nos ha impulsado a decidir que sería prudente tomar precauciones considerables en la realización de esta investigación. Sin embargo, los participantes a la conferencia acordaron que la mayor parte del trabajo sobre la construcción de moléculas de ADN recombinantes debería continuar siempre que se empleen medidas apropiadas de seguridad, principalmente en lo que se refiere a las barreras biológicas y físicas adecuadas para contener los nuevos organismos creados. Los criterios de protección deberían ser más exigentes aún en el comienzo y modificados a medida que la metodología mejore y se posea una valoración más precisa de los riesgos. También se acordó que hay ciertos experimentos en los cuales los riesgos potenciales son tan elevados que no deben realizarse dados los medios limitados actuales. En un plazo más largo pueden surgir problemas en la aplicación, a gran escala, de esta metodología en la industria, la medicina y la agricultura. Pero también se reconoció que una investigación futura y la experiencia pueden demostrar que muchos de los riesgos potenciales*

*son menos serios y menos probables que lo que ahora sospechamos.*

### **Principios que guían las recomendaciones y conclusiones**

Aunque nuestras afirmaciones acerca de los riesgos que pueden implicar cada uno de los diferentes caminos de investigación, sobre la recombinación de las moléculas de ADN pueden diferir, pocas personas, si es que existe alguna, creen que esta metodología esté totalmente exenta de riesgo. Los principios de prudencia para tratar con estos riesgos potenciales son:

Que la utilización de barreras adecuadas se considere como algo esencial en el proyecto experimental, y que esta protección y aislamiento sean proporcionados al posible riesgo. Consiguientemente, junto a una escala de riesgos, debería existir la correspondiente escala de protección y aislamiento. La estimación de los riesgos será difícil e intuitiva al principio, pero mejorará a medida que se vayan adquiriendo nuevos conocimientos; en cada etapa habrá que comprobar que la protección y aislamiento son adecuados al riesgo posible. Parece lógico pensar que los experimentos que requieren operaciones a una escala mayor entrañen riesgos mucho más serios que los que se corren en los que se realizan en pequeña escala y, por tanto, requieren unos procedimientos de protección y aislamiento más rigurosos. El uso de vehículos clónicos o vectores (plásmidos, fagos) y huéspedes bacterianos, con una capacidad restringida para multiplicarse fuera del laboratorio, reducirían los riesgos de un experimento determinado. Por tanto, las formas de adecuar los niveles de aislamiento a los riesgos potenciales podrán variar con el tiempo, especialmente cuando las técnicas de protección y aislamiento mejoren. Los medios para valorar y equilibrar los riesgos con los niveles apropiados de aislamiento y protección habrán de revisarse periódicamente. Es de esperar que a través de los canales de información, tanto formales como informales, nacionales e internacionales, la forma por la cual se hace frente a riesgos biológicos potenciales y de protección sea razonablemente consecuente.

El aislamiento de agentes potencialmente perjudiciales puede conseguirse de varias formas. La contribución más importante para limitar la propagación de los ADN recombinantes es el uso de barreras biológicas. Estas barreras son de dos tipos: 1) Huéspedes bacterianos perjudiciales incapaces de sobrevivir en un ambiente natural; 2) Vectores no transmisibles e igualmente perjudiciales (plásmidos, bacteriófagos u otros virus) capaces de desarrollarse solamente en huéspedes específicos. El aislamiento físico, ejemplificado por el uso de campanas o, donde sea posible, accesos limitados a laboratorios con una presión negativa, proporcionan un factor de seguridad adicional. Es de especial importancia someterse a una estricta y exigente práctica microbiológica, la cual puede limitar, en gran medida, el escape de organismos del medio experimental, y, por tanto, aumentar la seguridad de la operación. Por consiguiente, la educación y formación de todo el personal implicado en los experimentos es esencial para la eficacia de todas las medidas de aislamiento.

En la práctica, estos diferentes medios de aislamiento se complementarán mutuamente y los adelantos sustanciales que se vayan consiguiendo para el desarrollo de huéspedes bacterianos y vectores podrían permitir modificaciones en los requisitos complementarios de aislamiento físico.

El aislamiento físico estricto y los procedimientos de laboratorio rigurosos pueden reducir, pero no eliminar, la posibilidad de agentes potencialmente peligrosos. Por lo tanto, los investigadores que basen su trabajo en huéspedes y vectores inactivados como una seguridad adicional deben comprobar rigurosamente la efectividad de estos agentes antes de aceptar su validez como barreras biológicas.

### **Recomendaciones para adecuar los tipos de aislamiento a los tipos de experimentos**

Ninguna clasificación de experimentos en cuanto a riesgos, y ningún conjunto de procedimientos de aislamiento puede prever todas las situaciones posibles. Ante nuestras dudas actuales sobre los riesgos, los parámetros propuestos aquí se han concebido ampliamente y con intento de

ofrecer una pauta provisional para los investigadores y centros relacionados con la investigación del ADN recombinante. Sin embargo, cada investigador tiene la responsabilidad de decidir si, en un caso concreto, las circunstancias especiales justifican un nivel más alto de aislamiento que el que aquí se sugiere.

#### Tipo de contención

1. Riesgo mínimo: Este tipo de aislamiento es adecuado para aquellos experimentos en los que los riesgos biológicos pueden valorarse con exactitud y todo haga esperar que sean mínimos. Tal aislamiento puede lograrse siguiendo los procedimientos recomendados para los laboratorios de microbiología clínica. Estas medidas se centran fundamentalmente en no beber, comer, o fumar en el laboratorio, utilizar batas en el área de trabajo, el uso de pipetas taponadas con algodón o preferiblemente pipetas mecánicas y una rápida desinfección de los materiales contaminados.

2. Riesgo bajo: Este nivel de aislamiento es apropiado para experimentos que generan biotipos nuevos, excepto cuando la información asequible indique que el ADN recombinante no pueda alterar de manera apreciable el comportamiento ecológico de las especies receptoras, aumente de manera significativa su patogenicidad, o impida un tratamiento efectivo de la posible infección resultante. Las características esenciales de este aislamiento (además de los procedimientos mínimos, mencionado arriba) son la prohibición del uso de pipetas de boca, un acceso limitado al personal de laboratorio, cabinas de seguridad biológica para los procedimientos que pueden producir aerosoles (por ejemplo, mezcla y sonicación). Aunque los vectores existentes pueden usarse en este nivel de aislamiento para trabajos de riesgo bajo, deberían adoptarse vectores y huéspedes más seguros, cuando se dispongan de ellos.

3. Riesgo moderado: Tales medidas de aislamiento son apropiadas para experimentos en los que haya probabilidad de generar un agente con un potencial significativo, en lo que se refiere a su patogenicidad o destrucción ecológica. Las características principales de este nivel de seguridad, además de las dos clases precedentes, son que las operaciones de transferencia deben realizarse

se en cabinas de seguridad biológica (por ejemplo, campanas de flujo laminar), deben utilizarse guantes durante el manejo de los materiales infecciosos, las líneas de vacío deben estar protegidas por filtros y en los laboratorios de acceso limitado debe mantenerse una presión negativa. Sin embargo los experimentos que ofrecen un riesgo moderado deben realizarse sólo con vectores y huéspedes que tengan una capacidad muy reducida para multiplicarse fuera del laboratorio.

4. Alto riesgo: Este nivel de seguridad está ideado para experimentos en los que el potencial de destrucción ecológica o patogenicidad del organismo modificado puede ser grave y, por tanto, presenta un peligro muy serio para el personal del laboratorio o para el público. Las características principales de este tipo de medida son las mismas que se utilizan en el manejo de agentes microbiológicos extraordinariamente infecciosos, y consisten en medidas de aislamiento del área de trabajo de otras áreas, mediante cierres de aire, un ambiente de presión negativa, la exigencia de cambios de indumentaria, ducha para el personal y laboratorios equipados con sistema para la inactivación o eliminación de agentes biológicos que pueden estar contenidos en el aire viciado y en los residuos líquidos o sólidos. Todas las personas que ocupen estas áreas deberían llevar batas de protección y ducharse en cada salida del ámbito de aislamiento especial. El manejo de los agentes biológicos debe hacerse exclusivamente en cabinas de seguridad biológica, en las que el aire viciado se incinere o pase a través de filtros especiales. El aislamiento para el trabajo de alto riesgo incluye, además de las características físicas y de procedimiento descritas arriba, el uso de vectores y huéspedes rigurosamente probados y cuyo desarrollo pueda ser confinado al laboratorio.

#### Tipos de experimentos

Cálculos precisos de los riesgos relacionados con diferentes tipos de experimentos son difíciles de obtener, debido a nuestra ignorancia sobre la probabilidad de que los riesgos que se anticipan se manifiesten. Sin embargo, los experimentos que implican la construcción y propagación de

las moléculas de ADN recombinantes procedentes de: 1) procariotas, bacteriófagos y otros plásmidos; 2) eucariotas, han sido clasificados como de riesgo mínimo, bajo, moderado y alto para orientar a los investigadores en su elección de la protección apropiada. Estas designaciones deberían ser consideradas como valoraciones provisionales, que necesitarán una revisión a la luz de la experiencia futura.

Las mismas moléculas de ADN recombinante, como distintas de las células portadoras, pueden ser infecciosas para bacterias o para organismos superiores. Las preparaciones de ADN en estos experimentos, especialmente en grandes cantidades, deberían ser inactivadas químicamente antes de su eliminación.

1. Procariotas, bacteriófagos y plásmidos bacterianos: Donde la construcción de las moléculas de ADN recombinante y su propagación implica agentes procarióticos que se sabe que intercambian información genética de forma natural, los experimentos pueden realizarse con medidas de seguridad de riesgo mínimo. Siempre que los experimentos hagan sospechar un riesgo potencial, debe asegurarse una protección más rigurosa.

Los experimentos que implican la creación y propagación de las moléculas de ADN recombinante a partir de ADN de especies que ordinariamente no intercambian información genética, genera biotipos nuevos. Dado que tales experimentos pueden ofrecer riesgos mayores que los relacionados con los organismos originales, deberían hacerse, por lo menos, con las medidas de seguridad recomendadas para experimentos de bajo riesgo. Si los experimentos implican organismos patógenos, o determinantes genéticos que puedan aumentar la patogenicidad de las especies portadoras, o si el ADN transferido puede conferir a los organismos portadores nuevas actividades metabólicas no nativas para estas especies, y, por tanto, modificar su relación con el medio ambiente, entonces debe utilizarse el aislamiento para riesgo moderado o alto.

Los experimentos que provoquen en los agentes patogénicos para el hombre un aumento de la resistencia a antibióticos o a desinfectantes, podrían ser realizados sólo bajo condiciones de se-

guridad de riesgo moderado o alto, dependiendo de la virulencia del organismo implicado.

2. Virus animales: Los experimentos que implican unión de genomas virales o segmentos de genes a vectores procariotas y su propagación en células procariotas deberían ser realizados con sistemas de huésped-vector, con una capacidad de desarrollo nula fuera del laboratorio y con medidas de seguridad adecuadas para un riesgo moderado. Los segmentos rigurosamente caracterizados y purificados de genomas virales no oncogénicos demostrablemente no transformantes de ADN de virus oncogénicos pueden unirse a vectores actualmente existentes y propagados dentro del recinto exigible para un riesgo moderado; cuando se disponga de sistemas de huésped-vector más seguros, tales experimentos pueden llevarse a cabo con medidas de bajo riesgo.

Los experimentos encaminados a introducir o propagar ADN no viral u otros agentes de bajo riesgo en células animales deberían utilizar como vectores sólo ADN animal de bajo riesgo (por ejemplo, viral, mitocondrial) y las manipulaciones deberían realizarse donde existan las medidas de aislamiento para riesgo moderado.

3. Eucariotas: Los riesgos asociados con la unión fortuita de fragmentos de ADN de eucariotas a vectores de ADN de procariotas y la propagación de estos ADN recombinantes en huéspedes procariotas son los más difíciles de valorar.

A priori, el ADN de vertebrados de sangre caliente es más probable que contenga genomas virales, potencialmente patógenos para el hombre, que los ADN de otros eucariotas. Por consiguiente, los intentos de clonar segmentos de ADN de tales animales y particularmente los genomas de primates deberían realizarse sólo con sistemas de huésped-vector que tengan una capacidad demostrada de crecimiento restringido fuera del laboratorio y con medidas de aislamiento adecuadas para riesgo moderado. Hasta que los segmentos clonados de ADN de vertebrados de sangre caliente estén completamente caracterizados, deberían mantenerse en el sistema huésped-vector de máxima restricción en laboratorios de contención de riesgo moderado; cuando tales segmentos clonados estén caracterizados, pueden ser propagados,

como se ha sugerido para los segmentos purificados de genomas virales.

A menos que los organismos sinteticen un producto conocido como peligroso (tales como toxinas, virus), los ADN recombinantes de vertebrados de sangre fría y todos los demás eucariotas inferiores pueden ser construidos y propagados con el sistema huésped-vector más seguro entre los disponibles, con medidas de aislamiento para bajo riesgo.

El ADN purificado de cualquier fuente, que realice funciones conocidas y puedan ser juzgadas como no tóxicas puede clonarse con vectores ordinariamente disponibles y con medidas de seguridad para bajo riesgo. (El término tóxico se aplica aquí para las toxinas, productos potencialmente oncogénicos o sustancias que podrían perturbar el metabolismo normal, si se produjesen en un animal o planta por la presencia de un microorganismo).

4. Experimentos que deben ser aplazados: Hay experimentos factibles que presentan tan graves peligros que su realización no debería emprenderse de momento con los sistemas huésped-vector ahora disponibles y con las medidas de protección actuales. Estos incluyen el clonaje de los ADN recombinantes derivados de organismos, considerados como muy patogénicos (es decir, agentes etiológicos de las clases III, IV y V según la clasificación del Departamento de la Salud, Educación y Bienestar Social de USA), el ADN que contenga genes tóxicos y experimentos a gran escala (más de 10 litros de cultivo) usando ADN recombinantes capaces de sintetizar productos potencialmente dañinos para el hombre, animales o plantas.

## Realización

En muchos países, organizaciones nacionales empiezan a dar pasos encaminados a la elaboración de códigos o normas aplicables en la realización de experimentos con riesgos conocidos o potenciales. Mientras éstos no estén perfectamente establecidos, urgimos a los científicos para que usen como una guía lo que se propone en este documento. Además, hay algunas recomendaciones

que podrían ser puestas en marcha de manera inmediata y directa por la comunidad científica.

## Desarrollo de vectores y huéspedes más seguros

Una importante y esperanzadora consecución de la reunión fue la verificación de que bacterias y vectores especiales con capacidad restringida para multiplicarse fuera del laboratorio pueden construirse genéticamente, y que el uso de estos organismos aumentará la seguridad de los experimentos con ADN recombinantes en muchos órdenes de magnitud.

Los experimentos en este sentido están en fase de progreso, y en un futuro próximo se podrá disponer de variantes del bacteriófago, plásmidos no transmisibles y cepas especiales de *Escherichia coli*. Todos estos vectores podrían reducir extraordinariamente el riesgo potencial al mismo tiempo que ayudarán a mejorar la metodología. Otros sistemas de huésped-vector, especialmente las cepas modificadas de *B. subtilis*, bacteriófagos y plásmidos, pueden también ser útiles para fines concretos. Muy posiblemente se encontrarán vectores adecuados y totalmente inocuos para los huéspedes eucariotas, tales como levaduras, células animales y vegetales fácilmente cultivables. Es probable que haya un continuo desarrollo en este área y los participantes de la reunión acordaron que sistemas huésped-vector en que se introducen mejoras que reduzcan los riesgos de la investigación de ADN recombinante estarán a disposición de todos los investigadores interesados.

## Procedimientos de laboratorio

Es responsabilidad del investigador principal informar al personal del laboratorio de los riesgos de tales experimentos antes de que sean iniciados. Es necesaria una discusión libre y abierta para que cada participante en el experimento comprenda plenamente la naturaleza del mismo y cualquier riesgo que pueda implicar. Todo el personal ha de ser adiestrado en lo que se refiere a las medidas de seguridad encaminadas a controlar los riesgos, incluidas las actuaciones de emergencia,

en caso de que se presente un riesgo inesperado. Se recomienda también que se realice periódicamente un control apropiado de la salud de todo el personal, incluida una monitorización serológica.

### **Intercambio de experiencia y cursos de adiestramiento**

La investigación en este área avanzará con rapidez y los métodos utilizados encontrarán aplicación en muchos problemas biológicos diferentes. Es imposible prever la gama completa de posibles experimentos y establecer un juicio preciso sobre cada uno de ellos. Por lo tanto, es esencial llevar a cabo una valoración continua de los problemas, a la luz de los nuevos conocimientos científicos. Esto podría lograrse por medio de una serie de reuniones de trabajo y conferencias anuales, algunas de las cuales deberían tener lugar a nivel internacional. Deberían existir, también, cursos para el adiestramiento de personal en los métodos importantes, ya que es probable se interesen por este tipo de trabajo laboratorios que pueden no haber tenido una extensa experiencia en este área. Debe darse prioridad a la investigación que puede mejorar y valorar la eficacia de las medidas de aislamiento de los sistemas huésped-vector ya existentes y de los que puedan encontrarse en el futuro.

### **Conocimientos nuevos**

Este documento presenta una primera valoración de los riesgos potenciales a la luz de los conocimientos actuales. Sin embargo, se sabe muy poco acerca de la viabilidad de cepas de bacterias y bacteriófagos de laboratorio en diferentes nichos ecológicos del mundo exterior. Y menos aún se sabe acerca de si las moléculas de ADN recombinantes mejorarán o empeorarán la supervivencia de sus vectores y huéspedes en la naturaleza. Estas cuestiones son fundamentales en la valoración de cualquier nuevo organismo que pueda construirse en el futuro. Es necesario emprender una investigación en este área y darle una gran prioridad. Sin embargo, la mayoría de los biólogos moleculares que pueden construir moléculas

de ADN recombinante no están realizando estos experimentos y será necesario facilitar una investigación en colaboración entre ellos y grupos experimentados en el estudio de la infección bacteriana o la microbiología ecológica.

También debería realizarse un trabajo que haga posible la monitorización del escape o diseminación de vehículos clónicos y sus huéspedes.

Nada se sabe acerca de la capacidad de infección potencial en organismos superiores de fagos o bacterias que contengan segmentos de ADN eucarióticos y muy poco sobre la capacidad de infección de las moléculas de ADN por sí mismas. La transformación genética de las bacterias ocurre, sin duda, en animales, lo que sugiere que las moléculas de ADN recombinantes pueden retener su potencia biológica en este ambiente. Hay muchos interrogantes en este campo cuyas respuestas son esenciales para una valoración correcta de los riesgos de los experimentos con moléculas de ADN recombinantes. Será necesario asegurar que este trabajo se planifique y se lleve a cabo; y será especialmente importante tener esa información antes de que se intente la aplicación a gran escala del uso de las moléculas de ADN recombinantes.