

5. Caracterización de la modificación o modificaciones genéticas

Análisis molecular del inserto de ADN recombinante

La caracterización de una planta de ADN recombinante a escala molecular se realiza para obtener información sobre la composición e integridad del ADN insertado, el número y la localización genómica del único sitio o los múltiples sitios de inserción y el nivel de expresión de la proteína o proteínas introducidas a lo largo del tiempo y en distintos tejidos y ambientes.

Como se explica en la Sección 4, el proceso de producción de plantas de ADN recombinante puede dar lugar a una planta transformada que contenga un único inserto o múltiples insertos presentes en una o varias localizaciones del genoma de la planta hospedadora.

Las autoridades de reglamentación examinan la información sobre la integridad y el número de copias del ADN insertado en plantas de ADN recombinante. Normalmente, los biotecnólogos tratan de reducir al mínimo el número de copias y el tamaño del ADN insertado en plantas de ADN recombinante para facilitar el proceso reglamentario produciendo el menor número posible de cambios genéticos que requieran evaluación. Sin embargo, las plantas de

ADN recombinante que contienen múltiples copias del ADN insertado no son necesariamente menos “inocuas” que las plantas equiparables que contienen una única copia¹⁰.

Es necesario conocer las localizaciones genómicas en las que se ha insertado el transgén o los transgenes en el genoma de la planta para evaluar si los genes o las secuencias reguladoras existentes han resultado afectados por la inserción, en cuyo caso se podrían alterar los patrones de expresión génica y, por consiguiente, el fenotipo de la planta. Para determinar si la integración de ADN insertado podría producir nuevas moléculas de proteínas se utilizan análisis bioinformáticos basados en la secuencia de ADN a fin de establecer la presencia de marcos de lectura abiertos (ORF) en el inserto de ADN o en sus alrededores.

Un marco de lectura abierto es una parte de un gen que se transcribe para producir ARN. El análisis bioinformático suele centrarse en los ORF recientemente introducidos que están presentes en el propio inserto de ADN y en la posible presencia o

PÁRRAFO 30 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Para una comprensión clara de los efectos producidos en la composición e inocuidad de los alimentos derivados de las plantas de ADN recombinante se requiere una caracterización molecular y bioquímica completa de la modificación genética.

PÁRRAFO 31 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Se deberá proporcionar información sobre la inserción de ADN en el genoma de la planta, que habrá de incluir:

- A) la caracterización y descripción de los materiales genéticos insertados;
- B) el número de sedes de inserción;
- C) la organización del material genético insertado en cada sede, incluyendo el número de copias y datos suficientes sobre las secuencias del insertado y de la región circundante para identificar cualquier sustancia expresada como consecuencia de tal inserción, o, cuando sea más apropiado, otras informaciones como el análisis de los productos de la transcripción o expresión para identificar cualquier producto nuevo que pudiera estar presente en el alimento.
- D) identificación de los marcos de lectura abiertos dentro del ADN insertado o creado por las inserciones de ADN genómico contiguo a la planta, incluidos los que podrían dar lugar a proteínas de fusión.

¹⁰ Ejemplo de “evento” que contiene gran número de copias de un transgén es la línea de canola (*Brassica napus*; evento 23-198, 23-18-17) autorizada por el Gobierno canadiense, que se obtuvo introduciendo un gen codificador de la tioesterasa procedente del laurel (*Laurus nobilis*) para aumentar los niveles de ácido láurico (12:0) y, en menor medida, de ácido mirístico (14:0). Se estimó que el evento de transformación original 23 contenía 15 copias del gen en cinco loci genéticos independientes, como muestran los análisis de segregación y de transferencia Southern.

creación de nuevos ORF producidos a partir de la inserción aleatoria de ADN en ORF existentes en el genoma de la planta.

Mediante una caracterización molecular detallada del ADN recombinante se pueden abordar cuestiones relativas a los posibles efectos posicionales que ocasionan una expresión génica variable, múltiples cambios de caracteres (efectos pleiotrópicos) derivados de la inserción de ADN o un silenciamiento del gen resultante de la sobreexpresión del ADN insertado. Sin embargo, a falta de otros datos empíricos, es poco probable que estos análisis moleculares predigan efectos imprevistos sobre las concentraciones de los principales nutrientes, antinutrientes o toxinas endógenas. Por lo tanto, se realizan análisis suplementarios de la composición.

Cuando el resultado de la modificación es la expresión de una nueva proteína, el material vegetal se caracteriza con respecto a la composición bioquímica y la funcionalidad de los nuevos productos génicos. Se utilizan varios métodos para verificar y medir la expresión de los caracteres introducidos en una planta de ADN recombinante. A menudo se utilizan técnicas serológicas para los caracteres derivados de nuevas proteínas. Estas técnicas (por ejemplo, el Western blot o el ensayo de inmunoabsorción enzimática [ELISA]) se utilizan para señalar la presencia del producto transgénico y para cuantificar su nivel en el material objeto de muestreo. Si el nuevo carácter insertado no da lugar a la expresión de una proteína nueva o modificada¹¹ sino que, por ejemplo, da lugar a secuencias antisentido de ARN, se utilizan otras técnicas (por ejemplo, Northern blot) para medir la producción de transcritos.

Además de la caracterización bioquímica directa del carácter insertado, las autoridades de reglamentación suelen evaluar estudios de la planta de ADN recombinante cultivada en distintas condiciones. Estos estudios pueden mostrar que el carácter buscado se expresa en la etapa de desarrollo deseada del cultivar de la planta, y que la expresión es la prevista y permanece estable en distintos ambientes y a lo largo de generaciones de plantas.

La concentración general de nuevas proteínas expresadas en tejidos de plantas de ADN recombinante es baja, a menudo inferior al 0,1 por ciento del peso en seco. Frecuentemente, los estudios de bioinocuidad, como las pruebas de toxicidad aguda (capítulo 6), que necesitan cantidades relativamente grandes de material, no resultan viables si se utilizan proteínas purificadas procedentes de tejido vegetal. En cambio, lo habitual en estos estudios es utilizar proteínas purificadas procedentes de sistemas de expresión bacterianos. En estos casos es necesario demostrar la equivalencia funcional de las proteínas purificadas (en cuanto a las propiedades fisicoquímicas y las actividades biológicas) procedentes de las dos fuentes¹².

PÁRRAFO 32 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.

Se deberá proporcionar información sobre todas las sustancias que se hayan expresado en la planta de ADN recombinante, y en particular:

- A) los productos génicos (por ej. una proteína o un ARN no transcrito);
- B) la función de los productos génicos;
- C) la descripción fenotípica de los nuevos rasgos;
- D) el nivel y el lugar de expresión en la planta del producto o productos génicos expresados, y los niveles de sus metabolitos en la planta, en particular en sus partes comestibles; y
- E) cuando sea posible, la cantidad de los productos génicos, si la función de las secuencias/los genes expresados es alterar la acumulación de un ARNm o proteína endógenos específicos.

PÁRRAFO 33 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX. Asimismo se deberá proporcionar información:

- A) que demuestre si se ha mantenido la ordenación del material genético empleado para la inserción, o bien se ha producido una reordenación significativa tras la integración;
- B) que demuestre si las modificaciones introducidas deliberadamente en la secuencia de aminoácidos de la proteína expresada determinan cambios en su modificación después de la traducción o afectan a sitios críticos para su estructura o función;
- C) que demuestre si se ha logrado el efecto que se buscaba con la modificación, y que todos los rasgos expresados se han expresado y han sido heredados de una forma estable a lo largo de varias generaciones de conformidad con las leyes de la herencia. Puede hacerse necesario un examen de la herencia del propio inserto de ADN o la expresión del correspondiente ARN, si no es posible medir directamente las características fenotípicas;
- D) que demuestre si el rasgo o rasgos nuevos expresados se expresan de acuerdo a lo esperado en los tejidos apropiados, en una forma y unos niveles que son coherentes con las secuencias reguladoras asociadas que determinan la expresión del gen correspondiente;
- E) que indique si existen pruebas de que uno o más genes de la planta huésped han sido afectados por el proceso de transformación; y
- F) que confirme la identidad y modalidades de expresión de cualesquiera nuevas proteínas de fusión.

¹¹ Por ejemplo, el tomate FlavrSavr™, que contiene una secuencia antisentido correspondiente al gen codificador de la poligalacturonasa.

¹² Cuando se demuestra la equivalencia sobre la base de la reactividad serológica cruzada entre la planta y las proteínas bacterianas, es importante utilizar antisueños (anticuerpos policlonales o monoclonales) que han sido bien caracterizados con respecto a su especificidad.

Como se refiere el párrafo 33 de las Directrices del Codex, normalmente, para demostrar el patrón de expresión previsto y la estabilidad de la herencia de cada carácter introducido, se utilizan datos de ensayos sobre el terreno recogidos a lo largo de varias estaciones y en distintas localizaciones geográficas. La estabilidad genómica del inserto se demuestra habitualmente mediante un Southern blot de ADN extraído de material vegetal que ha sido objeto de muestreo en varias estaciones y localizaciones. De forma similar, la expresión estable del ADN insertado se demuestra cuantificando la proteína correspondiente o la actividad de la proteína.

La aplicación de las modernas técnicas de perfiles genéticos, como el microarray de ADN o ARN, la proteómica, la cromatografía de gases combinada con la espectrometría de masas (GC-MS) o la cromatografía de líquidos combinada con la resonancia magnética nuclear (HPLC-NMR), tiene la capacidad potencial de ampliar la cantidad de datos disponibles para la evaluación de la inocuidad. Los métodos de perfiles sensibles pueden ofrecer indicaciones sobre cambios secundarios o importantes a escala del genoma en la expresión del ARN mensajero (ARNm) o en la producción de proteínas, y sobre cambios a escala del metabolismo. Estos enfoques amplios, no selectivos, que no necesitan un conocimiento previo de hipotéticos cambios en los niveles de determinados componentes de la planta que oriente la elección del método, podrían ser muy interesantes para los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante modificadas mediante la inserción de múltiples genes, como la plantas con caracteres beneficiosos para la salud o la nutrición (véase también el capítulo sobre evaluación de metabolitos).

Hay que seguir examinando la utilidad y aplicabilidad de estas técnicas no selectivas para obtener datos destinados a la evaluación de la inocuidad, en particular con respecto al establecimiento y validación de la pertinencia de los cambios observados para la inocuidad de los alimentos. Uno de los mayores desafíos que plantea la utilización de estas técnicas es que puede resultar difícil distinguir entre las diferencias observadas y las variaciones naturales (fluctuaciones en los niveles de referencia de varios miles de variables) de la composición bioquímica debidas a las propiedades de las distintas variedades, la etapa de desarrollo de la planta y su estado de salud, y a la influencia y variación de las condiciones ambientales en el crecimiento. Los métodos de perfiles todavía no son adecuados para la evaluación de riesgos ordinaria debido a que la variación observada en los perfiles no se puede asociar de forma habitual con determinadas consideraciones sobre la bioinocuidad. Es necesario describir mejor los intervalos de referencia, reducir costos y seguir elaborando y validando métodos.

Eventos de transformación de plantas generados aleatoriamente

Normalmente, el transgén se integra en el cromosoma o cromosomas hospedadores tras aplicar con éxito un proceso de transformación como los métodos mediados por *Agrobacterium* o biolísticos (bombardeo con microproyectiles). Algunas inserciones tienen lugar en regiones del genoma de la planta que no participan en ninguna función evidente, en cuyo caso el transgén puede expresar la nueva proteína de la forma prevista sin ocasionar cambios no intencionales en otros caracteres de la planta.

Cuando la inserción aleatoria tiene lugar en una región del genoma de la planta que participa en la regulación o transcripción del genoma o en la producción de proteínas, la inserción puede producir fenotipos no intencionales de la planta. Cada una de las plantas recuperadas después del proceso de transformación que es portadora del ADN integrado constituye un “evento” singular de transferencia de genes.

Dado que el transgén se inserta aleatoriamente en el genoma de la planta hospedadora, lo habitual es que al principio se obtenga un gran número de plantas transformadas, cada una de las cuales contiene bien una única copia del transgén, bien múltiples copias. Posteriormente, el cultivo a pequeña escala y el muestreo basado en la selección eliminarán los fenotipos no

intencionales que posean caracteres no deseados o “eventos” de inserción de copias múltiples, y conservarán los fenotipos más apropiados para continuar la caracterización y el mejoramiento basado en la selección para obtener cultivares de élite.

Detección de transgenes mediante cebadores específicos para cada evento

Normalmente, para detectar la presencia de un transgén se utilizan dos cebadores (cada uno de 20–30 bases de longitud) con secuencias de nucleótidos complementarias con el ADN insertado en la planta de ADN recombinante en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Si los dos cebadores de la PCR son complementarios con la secuencia del transgén, todas las variedades y especies vegetales que son portadoras del mismo transgén mostrarán el producto de la amplificación de la PCR, independientemente de la localización de la inserción en el genoma de la planta. Sin embargo, es posible distinguir entre los diferentes “eventos” de inserción del mismo transgén en el mismo cultivar si se proyectan adecuadamente los dos cebadores.

La especificidad del evento se basa en la utilización de dos cebadores, uno de los cuales es complementario con la región genómica de la planta adyacente al punto de inserción del transgén y el otro es complementario con una región que está dentro del transgén. Estos cebadores se denominan “específicos para cada evento”. El par de cebadores amplificará únicamente un determinado “evento” de inserción porque el proceso de inserción de ADN en las plantas es en efecto aleatorio. Por lo tanto, cada inserción de ADN tendrá lugar aleatoriamente en el genoma de la planta, lo que dará como resultado que dicha inserción tenga regiones flanqueantes singulares de ADN vegetal.

Es necesario utilizar cebadores específicos para cada evento con el fin de identificar un determinado evento de transformación entre otros eventos que son portadores del mismo gen en la misma variedad hospedadora o en otras variedades de la misma especie cultivada. Por lo tanto, hace falta tener acceso a información sobre la secuencia relativa a las regiones flanqueantes del sitio de integración del ADN insertado para que las autoridades de reglamentación puedan realizar una vigilancia específica para cada evento de las plantas de ADN recombinante. Debido a la gran cantidad de cultivares vegetales que albergan el mismo transgén, la vigilancia de las plantas de ADN recombinante se suele realizar en dos etapas. En la primera etapa, que se basa en la PCR, se establece la presencia de construcciones transgénicas que se utilizan frecuentemente y, si el resultado es positivo, se lleva a cabo la segunda etapa (que también se basa en la PCR), en la que se utilizan cebadores específicos para cada evento.

Pueden encontrarse ejemplos de la utilización de cebadores específicos para cada evento en los métodos validados que ha publicado en línea el Centro Común de Investigación de la Comisión Europea: <http://gmo-crl.jrc.it/default.htm>

Grado de precisión con el nivel actual de la tecnología

La inserción aleatoria de secuencias de ADN en el genoma de la planta puede dar lugar a cambios no intencionales, que a su vez pueden ocasionar modificaciones en la expresión de genes existentes o la activación de genes silenciosos, por lo que es posible que se den niveles elevados de toxinas nativas o nuevas en el alimento. Hay que hacer hincapié en que la aparición de efectos no intencionales no es específica de la aplicación de tecnologías de ADN recombinante en las plantas, dado que también ocurre en la fitogenética clásica. Durante las prácticas de mejoramiento, el retrocruzamiento y la selección basados en la morfología, el rendimiento, la calidad de los cultivos, la resistencia a insectos o enfermedades, etc., dan lugar a líneas con características no deseadas que se descartan¹³. De forma similar, al obtener plantas

¹³ Hay pocos informes sobre efectos no intencionales que puedan afectar a la salud humana, como por ejemplo el bajo rendimiento de la cebada o el maíz, el alto contenido de furanocumarinas en el apio y el alto contenido de glicoalcaloides en las papas.

de ADN recombinante las líneas modificadas que no cumplan las exigencias previstas en materia de agronomía, inocuidad y calidad serán descartadas, por lo que se eliminarán muchos efectos no intencionales derivados de los procesos de cultivo de tejidos o de inserción de ADN¹⁴.

La aplicación de la tecnología de ADN recombinante en las plantas se encuentra actualmente limitada por la incapacidad de insertar directamente ADN (el transgén) en una determinada localización genómica. Un mayor desarrollo de la tecnología que ofrezca la posibilidad de seleccionar las regiones genómicas concretas en las que realizar la inserción de ADN podría eliminar efectos no intencionales como los efectos posicionales en la expresión del transgén y la influencia del inserto en la expresión del genoma de la planta ●

¹⁴ Entre los ejemplos de efectos no intencionales observados en plantas de ADN recombinante cabe citar las papas con tejidos anómalos en los tubérculos o un contenido reducido de glicoalcaloides, la soja con un contenido más elevado de lignina y el arroz con mayores niveles de vitamina B6 o de determinados derivados de los carotenoides.