

## 4. Marco para la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante

### Introducción

Desde principios del decenio de 1990 se han aplicado métodos de evaluación de la inocuidad a las plantas de ADN recombinante producidas con fines alimentarios, como exigen distintos sistemas nacionales de reglamentación. Las organizaciones internacionales y los organismos de normalización han seguido perfeccionando los marcos utilizados para estructurar las evaluaciones de la inocuidad con el fin de garantizar la inocuidad de estos productos y de fomentar el comercio a través de reglamentaciones armonizadas. La OCDE introdujo en 1993 el concepto de equivalencia sustancial como manera factible de estructurar la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante (OCDE, 1993). El concepto fue adoptado después por la OMS y la FAO como un punto de partida útil para la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante, y en la actualidad constituye un componente fundamental de todos los marcos reglamentarios a escala mundial. La razón que explica la utilidad y adopción del concepto es que se considera que las plantas de ADN recombinante obtenidas con fines alimentarios son esencialmente equivalentes (desde el punto de vista químico) a sus homólogos convencionales, con la excepción de los pocos cambios concretos que se hayan introducido.

En consecuencia, no se considera necesario llevar a cabo una caracterización biológica general ni pruebas toxicológicas a gran escala, ya que el enfoque comparativo debería descubrir

las diferencias biológicas pertinentes. No obstante, la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante obtenidas con fines alimentarios a menudo se basa en gran cantidad de datos suplementarios sobre las propiedades inmunológicas y toxicológicas de la nueva variedad vegetal. Por consiguiente, el marco actual de la evaluación de la inocuidad tiene como fundamento tanto la base comparativa estructurada consagrada en el concepto de equivalencia sustancial como los análisis adicionales de las propiedades toxicológicas e inmunológicas de los efectos intencionales y los posibles efectos no intencionales de las modificaciones genéticas introducidas. La finalidad de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante es examinar las consecuencias intencionales o no de la modificación específica de los componentes del alimento y establecer un nivel de inocuidad comparativo recurriendo a la trayectoria de uso inocuo de la planta homóloga convencional.

#### **PÁRRAFO 18 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.**

Para evaluar la inocuidad de un alimento derivado de una planta de ADN recombinante se aplica un procedimiento por etapas que examina los factores pertinentes, a saber:

- A) Descripción de la planta de ADN recombinante;
- B) Descripción de la planta base y de su utilización como alimento;
- C) Descripción del organismo u organismos donantes;
- D) Descripción de la modificación o modificaciones genéticas;
- E) Caracterización de la modificación o modificaciones genéticas;
- F) Evaluación de la inocuidad:
  - a) sustancias expresadas (sustancias distintas de ácidos nucleicos);
  - b) análisis de los componentes esenciales;
  - c) evaluación de los metabolitos;
  - d) elaboración del alimento;
  - e) modificación nutricional; y
- G) Otras consideraciones.

### Marco del Codex para la evaluación de la inocuidad

En 2003 se presentaron las “Directrices del Codex para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante” que se basaban en los “Principios del Codex para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos



**PÁRRAFO 19 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.** En algunos casos, las características del producto pueden requerir la obtención de datos e informaciones adicionales para abordar cuestiones que son peculiares del producto examinado.

**PÁRRAFO 20 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.** Los experimentos efectuados con la intención de obtener datos para las evaluaciones de inocuidad deben diseñarse y realizarse de conformidad con conceptos y principios científicos sólidos y también, cuando proceda, con las buenas prácticas de laboratorio. Deben proporcionarse los datos primarios a las autoridades de reglamentación si así lo solicitan. Los datos deberán obtenerse mediante métodos científicamente sólidos, y analizarse con técnicas estadísticas apropiadas. Se deberá documentar la sensibilidad de todos los métodos de análisis.

**PÁRRAFO 21 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.** La finalidad de toda evaluación de inocuidad es garantizar, a la luz de los conocimientos científicos más sólidos de que se disponga, que el alimento no puede causar daño alguno si se prepara, utiliza y/o consume de acuerdo con el uso previsto. El producto que se espera obtener de tal evaluación es una conclusión con respecto a si el nuevo alimento es tan inocuo como el producto homólogo convencional, teniendo en cuenta las repercusiones en la dieta de todo cambio en el contenido o valor nutricional. En definitiva el resultado del proceso de evaluación de la inocuidad consistirá, por tanto, en una definición del producto examinado que permita a los encargados de la gestión del riesgo determinar si es necesario tomar medidas, y en caso afirmativo, adoptar decisiones fundadas y apropiadas.

modernos” (2003). El presente instrumento de capacitación ofrece una introducción detallada para la realización de una evaluación de la inocuidad de los alimentos basada en el marco del Codex para la evaluación de la inocuidad de los alimentos modificados genéticamente (CAC/GL45-2003). Se reproduce el enfoque progresivo descrito en los párrafos 18 a 21 de las Directrices del Codex:

En los párrafos 22 y 23 se resumen los datos concretos que exigen las Directrices del Codex para describir las características de las plantas de ADN recombinante, que se explican a continuación con mayor detalle.

## Descripción de la planta de ADN recombinante

Un planta de ADN recombinante se produce como resultado de una transferencia de genes (transformación) llevada a cabo con éxito, a la que sigue una integración estable del ADN recombinante (transgén) en el cromosoma o cromosomas nucleares o en el genoma o genomas de los orgánulos de la planta. Los biotecnólogos utilizan técnicas fitogenéticas clásicas como la autofecundación, para que la planta inicial sea homocigótica en el locus o los loci recombinantes. A continuación se puede transferir de forma estable el ADN recombinante a las siguientes generaciones sin segregación. El nombre que recibe la progenie de esta planta de ADN recombinante hace referencia a la planta de ADN recombinante producida en primer lugar. Se denomina “evento” o “caso” al linaje de cada planta producida mediante una transferencia, regeneración de la planta y propagación llevadas a cabo con éxito.

Para el evaluador de la inocuidad es importante comprender la planta de ADN recombinante que va a evaluar. Por ejemplo, es fundamental comprender claramente el significado del término “evento” para llevar a cabo una evaluación de la inocuidad caso por caso. Dado que cada “evento” representa un único sitio (o sitios) de inserción del ADN recombinante (transgén), es probable que las propiedades fenotípicas resultantes de las plantas recombinantes regeneradas sean distintas. Por lo tanto, mientras que las propiedades biológicas generales del ADN recombinante serán similares en los diferentes “eventos” de inserción, los posibles efectos no intencionales en el genoma del hospedador pueden variar porque las inserciones pueden causar efectos distintos en función de su localización y de su número (véase el Recuadro 4.1). Un “evento” puede representar una planta con un único inserto o con múltiples insertos transferidos al mismo tiempo. Por ejemplo, un único evento puede constar de varias inserciones de ADN recombinante que codifiquen la resistencia a insecticidas y la resistencia a herbicidas, si estos caracteres se transfirieron al mismo tiempo.

**PÁRRAFO 22 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.** Se deberá proporcionar una descripción de la nueva planta de ADN recombinante cuya inocuidad se desea evaluar. En la descripción se identificará el cultivo, la transformación o transformaciones que deben examinarse, y el tipo y la finalidad de la modificación. Esta descripción deberá ser adecuada para ayudar a comprender la naturaleza del alimento que se somete a la evaluación de inocuidad.

Las plantas que contienen ADN recombinante proveniente de la transferencia en eventos independientes poseen caracteres “apilados” y a menudo se han producido cruzando cultivares de plantas que son portadores, cada uno, de “eventos” únicos y bien caracterizados. De esta forma, se pueden reunir en una única variedad nueva de la planta más inserciones de ADN recombinante (y más “eventos”) seleccionadas sobre la base de su buen rendimiento en el hospedador receptor original. En las plantas con inserciones apiladas de ADN recombinante (transgenes) también se evalúan las posibles interacciones entre las inserciones de ADN, como parte de la evaluación de la inocuidad.

De las tres páginas de resúmenes de expedientes que se ofrecen a modo de ejemplo con el presente instrumento, las dos primeras contienen información descriptiva pertinente para que el evaluador de la inocuidad conozca las características fundamentales y la finalidad prevista de la planta de ADN recombinante.

## Descripción de la planta hospedadora y su uso como alimento

En los párrafos 23 a 25 se solicita información sobre la planta hospedadora y sus usos conocidos como alimento. Es necesario un conocimiento profundo de la planta hospedadora sin modificar a fin de aplicar el concepto de equivalencia sustancial como punto de partida para establecer la inocuidad. En el caso de la evaluación de la inocuidad de los alimentos, este conocimiento descriptivo es fundamental para identificar el intervalo y la variación naturales de los componentes nutritivos más importantes, así como las sustancias tóxicas conocidas (por ejemplo, alcaloides en las papas y los tomates, cucurbitacina en las calabazas y los calabacines), antinutrientes y posibles alérgenos. Estos compuestos y sus respectivas concentraciones variarán en función de los cultivos, los cultivares y las condiciones de crecimiento de forma similar a como lo hacen las variedades convencionales.

Las variaciones naturales de estos compuestos se denominan “nivel de referencia”, que también describe dichas variaciones. Se están realizando esfuerzos para crear bases de datos descriptivos sobre el intervalo de los niveles de referencia para compuestos químicos fundamentales que están presentes de manera natural en las plantas cultivadas. Las plantas cultivadas contienen de manera natural varios miles de compuestos químicos, muchos de los cuales causarían efectos no deseados en las pruebas toxicológicas si se extrajeran por separado y se administraran en grandes dosis a los animales de laboratorio. Por consiguiente, resulta difícil valorar los efectos biológicos que unas pequeñas variaciones o fluctuaciones en los niveles

**PÁRRAFO 23 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.** Se deberá proporcionar una descripción completa de la planta base. Los datos e informaciones necesarios incluirán lo siguiente, sin limitarse necesariamente a ello:

- A) nombre común o habitual; nombre científico; clasificación taxonómica
- B) historia del cultivo y su evolución a través del fitomejoramiento identificando en especial aquellos rasgos que pueden tener efectos nocivos para la salud humana.
- C) información sobre el genotipo y fenotipo de la planta base que pueda guardar relación con su inocuidad, incluida toda toxicidad o alergenidad que se conozca; y
- D) historial de uso inocuo en el consumo alimentario.

**PÁRRAFO 24 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.** Se deberá proporcionar información pertinente sobre el fenotipo no sólo de la planta base, sino también de las especies relacionadas y de plantas que hayan aportado o puedan aportar una contribución importante al patrimonio genético de la planta base.

**PÁRRAFO 25 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.** El historial de uso puede incluir información sobre la forma en que suele cultivarse, transportarse y almacenarse la planta, si se requiere una elaboración especial para que su consumo sea inocuo, y el papel que desempeña normalmente en la dieta (por ej. qué parte de la planta se utiliza como fuente de alimento, si su consumo es importante en subgrupos particulares de la población, qué macronutrientes o micronutrientes importantes aporta a la dieta).

de un determinado compuesto vegetal podrían ocasionar. Así pues, el conocimiento de la variación natural del nivel de referencia de los compuestos fundamentales en las variedades convencionales de la planta es muy útil para la evaluación de la inocuidad de series de datos complejas obtenidas en análisis químicos de plantas de ADN recombinante.

La elaboración después de la cosecha de los componentes de la planta también puede alterar los niveles de determinados compuestos vegetales que tienen valor nutritivo. Por ello es importante conocer la utilización, la elaboración y el consumo, así como las propiedades, del producto final del cultivo alimentario convencional a fin de establecer una base sólida para comparar adecuadamente los alimentos obtenidos de plantas de ADN recombinante. En los documentos/expedientes ofrecidos a modo de ejemplo se facilita esta información.

Una fuente que ofrece amplia información sobre la biología de las plantas hospedadoras son los Documentos de Consenso de la OCDE. Estos documentos contienen información técnica que puede utilizarse durante la evaluación reglamentaria de productos obtenidos por medios biotecnológicos y se centran en la biología de los organismos (como plantas, árboles o microorganismos) o en los caracteres introducidos. Pueden consultarse en la siguiente dirección: [http://www.oecd.org/document/51/0,2340,en\\_2649\\_34385\\_1889395\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/51/0,2340,en_2649_34385_1889395_1_1_1_1,00.html)

## Descripción del organismo u organismos donantes

Se requiere información sobre la trayectoria del organismo donante en lo concerniente a las secuencias de ADN recombinante, en particular si el donante u otros miembros de su género muestran normalmente características de patogenicidad o de producción de toxinas, o si poseen otros caracteres que afecten a la salud humana. Se debe ser especialmente prudente si el organismo donante contiene alérgenos conocidos. Cuando el alimento obtenido de plantas de ADN recombinante contiene genes de estas fuentes se supone que el nuevo producto genético es alérgeno a no ser que se demuestre lo contrario. La evaluación de la alergenicidad tiene en cuenta esta cuestión. En los casos en que el ADN recombinante se obtiene de fuentes que no tienen una trayectoria de alergenicidad, el enfoque vigente para la evaluación de la alergenicidad o toxicidad se fundamenta principalmente en las comparaciones de secuencias de aminoácidos y en la estabilidad de la nueva proteína frente a la digestión y la elaboración. Esta última comparación, en particular, no se realiza con respecto al homólogo convencional, sino que recurre a una base amplia de conocimientos sobre las propiedades biológicas de los alérgenos conocidos presentes en los alimentos.

En la actualidad, la mayoría de las secuencias de ADN insertadas en plantas de ADN recombinante que se utilizan con fines comerciales se toman de bacterias del suelo y de bacterias y virus patógenos de las plantas, todos ellos muy corrientes, que suelen tener una trayectoria agrícola conocida. Resulta útil establecer la exposición humana previa como punto de partida para identificar las posibles propiedades tóxicas y alérgicas de los productos genéticos. No obstante, habría que actuar con cautela al extraer conclusiones de esta información, dado que se pueden alterar los niveles de expresión, las localizaciones celulares y las rutas de exposición de las proteínas obtenidas de ADN recombinante. En los documentos/expedientes ofrecidos a modo de ejemplo se facilita información sobre las fuentes de donantes.

Los Documentos de Consenso de la OCDE también contienen información sobre la biología de los donantes de genes. Pueden consultarse en la siguiente dirección: [http://www.oecd.org/document/51/0,2340,en\\_2649\\_34385\\_1889395\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/document/51/0,2340,en_2649_34385_1889395_1_1_1_1,00.html)

### **PÁRRAFO 26 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.**

Se deberá proporcionar información sobre el organismo u organismos donantes y, cuando sea apropiado, sobre otras especies relacionadas. Es particularmente importante que se determine si el organismo u organismos donantes, o bien otros miembros de la familia estrechamente vinculados con ellos, presentan características naturales de patogenicidad o producción de toxinas, u otros rasgos que afecten a la salud humana (por ejemplo, presencia de antinutrientes). La descripción del organismo u organismos donantes deberá incluir:

- A) su nombre habitual o común;
- B) el nombre científico;
- C) la clasificación taxonómica;
- D) información sobre su evolución en lo que atañe a la inocuidad de alimentos;
- E) información sobre toxinas, antinutrientes y alérgenos naturales en el caso de los microorganismos, informaciones adicionales sobre la patogenicidad y las relaciones con agentes patógenos conocidos; y
- F) información sobre su uso pasado y actual, si lo tiene, en el suministro alimentario y sobre otras vías de exposición distintas del uso alimentario previsto (por ejemplo, su posible presencia como contaminantes).



## Descripción de la modificación o modificaciones genéticas

**PÁRRAFO 27 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.** Se deberá proporcionar suficiente información sobre la modificación genética a fin de que sea posible identificar todo el material genético que puede haberse aportado a la planta base, y suministrar la información necesaria para el análisis de los datos que apoyan la caracterización del ADN insertado en la planta.

Las solicitudes de datos relativos a las modificaciones genéticas cumplen dos finalidades: i) hacer posible una comprensión en profundidad de las inserciones genéticas resultantes y sus localizaciones en la planta hospedadora; y ii) permitir que se elaboren identificadores únicos sobre la base de los sitios de inserción, específicos para cada evento, del ADN recombinante en el genoma de la planta hospedadora. Esta última información puede ser importante para el obtentor de una planta de ADN recombinante como medio de asegurar la distribución y el uso comerciales y para determinados países que han establecido requisitos obligatorios de etiquetado de alimentos, porque les permite una vigilancia del ADN

recombinante específica para cada evento en la cadena alimentaria. En lo que respecta a la evaluación de la inocuidad biológica, es importante tener información sobre el número y los sitios de inserción de ADN para evaluar el efecto de las inserciones en el genoma de la planta hospedadora y predecir los posibles cambios fenotípicos. Es necesaria una descripción detallada de las características moleculares de la planta de ADN recombinante para demostrar que el obtentor ha analizado en profundidad la planta y sus productos, incluidos todos los genes introducidos y las proteínas expresadas. Hay que señalar que las plantas de ADN recombinante han sido objeto de un amplio mejoramiento selectivo posterior al evento inicial de transferencia de genes y previo a la solicitud de autorización reglamentaria. Así pues, es probable que el obtentor suministre una serie de datos en el expediente de la aplicación con el fin de demostrar que la planta de ADN recombinante expresa únicamente los cambios fenotípicos previstos.

Como se puede ver en los documentos/expedientes ofrecidos a modo de ejemplo, se facilita gran cantidad de información sobre la caracterización de las modificaciones genéticas.

El método por el que se introducen los nuevos caracteres en la planta hospedadora determina, en parte, la información necesaria para la evaluación de la inocuidad de las propiedades genéticas de la planta. Los dos métodos principales para introducir nuevo material genético en las células de una planta son: i) la transformación mediada por *Agrobacterium*, y ii) el bombardeo con microproyectiles.

i) **Transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*.** *Agrobacterium tumefaciens* es un fitopatógeno del suelo que en estado natural utiliza procesos de transformación genética para trastocar el mecanismo metabólico de las células de la planta hospedadora. Lo hace con el fin de desviar parte del suministro de carbono y nitrógeno orgánicos de la planta hospedadora hacia la producción de nutrientes (opinas) que las bacterias invasoras pueden catabolizar. Además, induce también la proliferación de células parasitadas. La agalla de la corona es el resultado directo de la incorporación de una región de ADN de transferencia (ADN-T), procedente de un gran (150–250 kb) plásmido circular Ti (inductor de tumores), del que es portador *A. tumefaciens*, en el genoma de la planta hospedadora. La comprensión de este proceso de transformación natural y del hecho de que cualquier porción de ADN foráneo situada entre las secuencias marginales del ADN-T puede transferirse a las células de la planta, condujo a la elaboración de los primeros sistemas de vectores y cepas bacterianas para la transformación de plantas (véase un examen en Hooykaas y Schilperoort, 1992). Desde el primer caso registrado de una planta transgénica de tabaco que expresaba genes foráneos, se han realizado grandes progresos en el

**PÁRRAFO 28 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.** La descripción del proceso de transformación debe incluir:

- A) información sobre el método específico que se ha utilizado para la transformación (por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*);
- B) si procede, información sobre el ADN destinado utilizado para modificar la planta (por ej. plásmidos auxiliares), incluida la fuente (por ej. vegetal, microbiano, vírico, sintético), la identidad y la función esperada en la planta; y
- C) organismos huéspedes intermedios, incluidos los utilizados para producir o elaborar el ADN destinado a la transformación del organismo base (por ej., bacterias).

**PÁRRAFO 29 DE LAS DIRECTRICES DEL CODEX.** Se deberá proporcionar información sobre el ADN que ha de introducirse, concretamente:

- A) la caracterización de todos los componentes genéticos, incluidos los genes marcadores, agentes reguladores y otros elementos que influyen en la función del ADN;
- B) tamaño e identidad;
- C) la localización y orientación de la secuencia en el vector/construcción final; y
- D) la función.

#### Recuadro 4.1. Aspectos mecanicistas del proceso de transformación pertinentes para la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante

##### Longitud y número de copias del ADN transferido.

Hasta 1995 se suponía que, en la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*, los únicos elementos transgénicos que se transferían al hospedador receptor eran las secuencias situadas entre los márgenes izquierdo y derecho del ADN-T. Sin embargo, Ramanathan y Veluthambi (1995), Wenck *et al.* (1997) y Kononov *et al.* (1997) demostraron que las secuencias centrales de plásmidos que están fuera de los márgenes del ADN-T se podían integrar junto con los genes de interés. Los experimentos de Kononov *et al.* (1997) demostraron que las secuencias centrales de plásmidos se podían integrar en el genoma hospedador acopladas a las secuencias del margen izquierdo o derecho, o bien como unidad independiente desvinculada del ADN-T. El ADN-T también puede integrarse en el genoma hospedador con una configuración distinta a la de una única copia en un solo sitio. También pueden darse copias múltiples en repeticiones directas o invertidas y otras configuraciones complejas. La presencia de insertos de ADN-T multimérico, en particular de estructuras de repetición invertida, está relacionada con el fenómeno del silenciamiento del transgén (Gelvin, 1998).

En la transferencia de genes mediada por el bombardeo con partículas, la modalidad de integración de los transgenes oscila entre el transgén completo, los reajustes de transgenes de tamaño distinto al del inserto completo, la concatenación esporádica de plásmidos introducidos portadores del transgén y la variación del número de copias entre los elementos transgénicos completos y parciales (Powlowski y Somers, 1996). El número de copias de los insertos transgénicos oscila entre 1 y 20, o incluso más, aparte de la inserción de fragmentos del transgén. Normalmente, las copias múltiples cosegregan como un locus transgénico, lo que indica que las secuencias están o bien integradas en loci estrechamente vinculados o bien en un único locus, y no se integran aleatoriamente en todo el genoma (Powlowski y Somers, 1996). La caracterización molecular de las plantas transgénicas producidas mediante bombardeo con micropartículas ha ofrecido pruebas de amplios

reajustes de secuencias transgénicas (Powlowski y Somers, 1996). En los análisis de Southern blot se pueden observar dichos reajustes en forma de fragmentos híbridos de tamaño diferente al del inserto de ADN completo. Los fragmentos mayores indican una concatenación (cabeza con cabeza o cabeza con cola)<sup>8</sup>. El entremezclado de ADN insertado con el ADN hospedador puede dar lugar a fragmentos de ADN transgénico mayores que el inserto completo. Por ejemplo, Powlowski y Somers (1998) informaron de que cada una de las 13 líneas transgénicas de avena transformadas mediante bombardeo con micropartículas tenía copias intactas del transgén, además de fragmentos múltiples, reajustados o truncados. El número de sitios de inserción oscilaba entre 2 y 12, y todos los fragmentos del ADN transgénico cosegregaban. Los autores demostraron que el ADN transgénico se entremezcló en el ADN hospedador. Este fenómeno también se ha observado en el arroz (Cooley *et al.*, 1995).

##### Variación de los niveles de expresión génica en función del sitio de inserción.

Con los dos métodos de transferencia de genes, las plantas transformadas de forma independiente con el mismo plásmido tendrán normalmente diferentes niveles de expresión, fenómeno que no siempre se correlaciona con el número de copias (Gelvin, 1998). Por el contrario, hay quien ha atribuido la diferencia de la expresión de los transgenes a efectos posicionales, según los cuales la posición del sitio de integración del ADN en el genoma hospedador afecta al nivel de expresión transgénica. Sin embargo, otra investigación ha señalado que hay factores, distintos de la posición del sitio de integración o sumados a él, que también contribuyen al nivel de expresión transgénica (Gelvin, 1998). Esto puede ser consecuencia de las ordenaciones variables de las secuencias de transgenes en el genoma hospedador. La expresión variable o el silenciamiento de los transgenes<sup>9</sup> son fenómenos bien documentados en las plantas transgénicas.

conocimiento de la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* a escala molecular. En estado natural, *Agrobacterium tumefaciens* infecta únicamente a plantas dicotiledóneas, aunque en la actualidad existen métodos de transferencia de genes mediada por *Agrobacterium* en plantas monocotiledóneas para el arroz (Hiei *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1998), el banano (May *et al.*, 1995), el maíz (Ishida *et al.*, 1996), el trigo (Cheng *et al.*, 1997) y la caña de azúcar (Arencibia *et al.*, 1998; Enríquez-Obregón *et al.*, 1998). Se ha publicado un estudio exhaustivo de las estrategias para la aplicación práctica de este método (Birch, 1997). La transformación de tejido de la planta mediada por *Agrobacterium* suele dar como resultado una inserción de ADN con un número de copias bajo, cifras también bajas de reajustes y una mayor eficiencia de transformación si se compara con técnicas de liberación directa de ADN, como el bombardeo con micropoyectiles (Powlowski y Somers, 1996; Gelvin, 1998).

<sup>8</sup> Se pueden detectar los concatémeros del inserto de ADN mediante un análisis de transferencia Southern a gran escala que incluya la digestión del ADN genómico con una enzima de restricción que corte en un único sitio dentro del elemento transgénico; a continuación el análisis de transferencia Southern permitirá determinar las múltiples copias del inserto de ADN. Se pueden formar concatémeros por recombinación homóloga del ADN transformado o por unión de extremos romos con extremos cohesivos producida por una actividad limitada de la exonucleasa. Los fragmentos de menor tamaño que el inserto completo son indicios de deleciones y truncamientos.

<sup>9</sup> El silenciamiento de los genes puede ser consecuencia de la interacción entre copias múltiples de los transgenes y los genes endógenos relacionados y se asocia con mecanismos basados en la homología que actúan a nivel trans-

cripcional o postranscripcional (Matzke y Matzke, 1998). El silenciamiento resultante del desajuste de la iniciación de la transcripción se asocia a menudo con la metilación de la citosina o la condensación de la cromatina (Fagard y Vaucheret, 2000) mientras que el silenciamiento postranscripcional (cosupresión) supone un aumento del recambio del ARN en el citoplasma (Matzke y Matzke, 1998). También se ha propuesto una tercera categoría de silenciamiento para las consecuencias de los efectos posicionales, en los que el ADN flanqueante de la planta o una localización cromosómica poco favorable ejercen un efecto silenciador sobre el transgén (Matzke y Matzke, 1998). Según Matzke y Matzke (1998), este tipo de silenciamiento responde al estado epigenético de las secuencias hospedadoras que flanquean el sitio de inserción o a la tolerancia a la inserción de ADN foráneo de determinadas regiones cromosómicas.

ii) Transferencia de genes mediada por bombardeo con microproyectiles. El bombardeo con microproyectiles (denominado también bombardeo con micropartículas y transformación biolística) es una técnica utilizada para introducir ADN directamente en el genoma hospedador que ha demostrado su utilidad para transformar tejidos de plantas resistentes a la infección por *Agrobacterium*. En resumen, el ADN plasmídico o linealizado que contiene el gen o los genes que interesan se fija a partículas de tungsteno u oro (microportadores) que se lanzan hacia las células hospedadoras de la planta a alta velocidad para que puedan penetrar en ellas. Dentro de la célula, el ADN puede separarse del microportador e integrarse en el genoma hospedador. Se puede utilizar el bombardeo con microproyectiles para transformar tejidos de explantos de la mayoría de las especies vegetales siempre que el tejido de la planta transformada se pueda regenerar para producir plantas completas. En los documentos/expedientes ofrecidos a modo de ejemplo, se dan detalles del método de transferencia de genes utilizado y de un análisis molecular de la inserción de ADN resultante, que habitualmente forman parte de la solicitud de notificación o autorización reglamentaria.

En el expediente de la aplicación no se suelen ofrecer detalles de los protocolos técnicos y prácticos de laboratorio para la transferencia de ADN recombinante debido a las políticas de información de las entidades comerciales. En el Recuadro 4.1 se explican con mayor detalle algunos de los aspectos mecanicistas generales del proceso de transformación que son pertinentes para la evaluación de la inocuidad de las plantas de ADN recombinante.

## Referencias

- Arencibia, A.D., Carmona, E.R., Tellez, P., Chan, M.T., Yu, S.M., Trujillo, L.E. y Oramas, P. 1998. An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res.* 7: 1–10.
- Birch, R.G. 1997. Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 297–326.
- Cheng, M., Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, W. y Wan, Y.C. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* 115: 971–980.
- Cheng, X.Y., Sardana, R., Kaplan, H. y Altosaar, I. 1998. *Agrobacterium*-transformed rice expressing synthetic cry1Ab and cry1Ac genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95: 2767–2772.
- Cooley, J., Ford, T. y Christou, P. 1995. Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration. *Theor. Appl. Genet.* 90: 97–104.
- Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Sansonov, D.L., de la Riva, G.A. y Selman-Housein, G. 1998. Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* 206: 20–27.
- Fagard, M. y Vaucheret, H. 2000. (Trans)gene silencing in plants: how many mechanisms? *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 167–194.
- Gelvin, S.B. 1998. The introduction and expression of transgenes in plants. *Curr. Opinion Biotechnol.* 9: 227–232.
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. y Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271–282.
- Hooykaas, P.J.J. y Schilperoort, R.A. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19: 15–38.
- Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. y Kumashiro, T. 1996. High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnol.* 4: 745–750.

- Kononov, M.E., Bassuner, B. y Gelvin, S.B. 1997. Integration of T-DNA binary vector “backbone” sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J.* 11: 945–957.
- Matzke, A.J.M. y Matzke, M.A. 1998. Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 142–148.
- May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J. y Arntzen, C.J. 1995. Generation of transgenic Banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnol.* 13: 486–492.
- OCDE. 1993. Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology, concepts and principles. Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Paris.
- Powlowski, W.P. y Somers, D.A. 1996. Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Mol. Biotechnol.* 6: 17–30.
- Powlowski, W.P. y Somers, D.A. 1998. Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95: 12106–12110.
- Ramanathan, V. y Veluthambi, K. 1995. Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Mol. Biol.* 28: 1149–1154.
- Wenck, A., Czako, M., Kanevski, I. y Marton, L. 1997. Frequent colinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 34: 913–922 ●

