

# **EVALUACIÓN DE RIESGO DE LOS CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS**

## **Parte II: Principios y prácticas para la evaluación de la seguridad de los nuevos alimentos**

### **Caso de estudio: evento de maíz MON810**

La información contenida en este manual fue preparada y publicada por AGBIOS, y traducida al español por ArgenBio. Las referencias bibliográficas correspondientes, los enlaces relacionados, así como la descripción de otros eventos, están disponibles en [www.agbios.com](http://www.agbios.com)

AGBIOS es una compañía dedicada a brindar su experiencia en evaluación de riesgo y políticas públicas y regulatorias relacionadas con los productos de la biotecnología.

[www.agbios.com](http://www.agbios.com)

ArgenBio (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología) es una institución sin fines de lucro que tiene como misión divulgar información sobre la biotecnología, contribuyendo a su comprensión a través de la educación y estimulando su desarrollo.

[www.argenbio.org](http://www.argenbio.org)

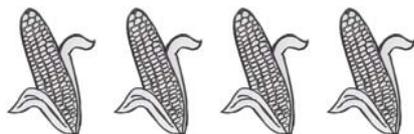
# EVALUACIÓN DE RIESGO DE LOS CULTIVOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

## Parte II: Principios y prácticas para la evaluación de la seguridad de los nuevos alimentos

### Caso de estudio: evento de maíz MON810

#### Índice:

Capítulo 1 - Descargo de responsabilidades y prefacio	Pág. 3
Capítulo 2 - Conceptos y principios	Pág. 5
Capítulo 3 – El organismo hospedador	Pág. 10
Capítulo 4 - El organismo donante	Pág. 13
Capítulo 5 - Método de transformación	Pág. 17
Capítulo 6 - Caracterización molecular del ADN insertado	Pág. 24
Capítulo 7 - Estabilidad genética de la característica introducida	Pág. 29
Capítulo 8 - Material expresado / efecto	Pág. 31
Capítulo 9 - Datos nutricionales	Pág. 41
Capítulo 10 - Evaluación toxicológica	Pág. 52
Capítulo 11 - Potencial alergénico	Pág. 57
Glosario	Pág. 65





## Capítulo 1 - Descargo de responsabilidades y prefacio

### Descargo de responsabilidades

La firma Monsanto ha cedido generosamente la información provista en varias de las presentaciones regulatorias del evento MON810 como herramienta de práctica. Nótese, sin embargo, que con el propósito de incrementar la utilidad del caso de estudio como herramienta de práctica, se han tomado ciertas libertades con respecto a la información provista en las solicitudes originales. La información presentada en este estudio es sólo una parte de la presentada en realidad. El caso de estudio no constituye de forma alguna una solicitud completa ni debe ser considerado como una evaluación de riesgo completa. Por eso, el uso de esta información como herramienta de práctica no constituye una aprobación de la información ni del producto, ni debe ser considerada como un fiel reflejo de las presentaciones originales.

### Prefacio

Este módulo educativo ha sido desarrollado como una herramienta para proveer a los organismos reguladores (y sus miembros) de un entrenamiento práctico en la evaluación de la seguridad ambiental de las plantas transgénicas. Los conceptos de evaluación de riesgo, tal como se discuten en este texto, no reflejan el enfoque regulatorio de ningún país en particular, sino que más bien han sido formados en base a documentos de consenso internacional, como los emitidos por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) de las naciones Unidas (ONU).

Con el fin de proveer información similar a la usualmente presentada para avalar la evaluación ambiental, se ha desarrollado un caso de estudio usando el evento MON810 de maíz (*Zea mays*), obtenido por técnicas de ingeniería genética, y su progenie. El contenido del estudio incluye extractos de solicitudes presentadas ante autoridades regulatorias de Japón, Unión Europea, Reino Unido, y Estados Unidos (EE.UU.).

La línea MON810 de maíz (nombre comercial YieldGard®) fue desarrollada por medio de una modificación genética específica para que sea resistente al ataque del barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), un insecto plaga del maíz de gran importancia agronómica. La nueva variedad produce una versión truncada de la proteína insecticida, Cry1Ab, derivada de *Bacillus thuringiensis*. Las delta-endotoxinas, como la proteína Cry1Ab expresada en MON810, actúan uniéndose selectivamente a sitios específicos localizados en las microvellosidades del epitelio del intestino medio de especies de insectos susceptibles. Luego de la unión, se forman poros permeables a cationes que alteran el flujo iónico en el intestino medio, causando así la parálisis y posterior muerte del insecto susceptible. Cry1Ab presenta actividad insecticida sólo contra insectos lepidópteros, y su especificidad de acción se atribuye directamente a la presencia de sitios de unión específicos (receptores) en los insectos blanco. No existen dichos sitios de unión a delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de mamíferos, por lo tanto, ni el ganado ni el hombre son susceptibles a estas proteínas.

El evento MON810 recibió su primera aprobación regulatoria en EE.UU. en 1995 (USDA, Departamento de Agricultura de EE.UU.), y desde entonces ha sido aprobado para liberación al medioambiente y para uso en alimentación animal y/o humana en varios países, incluyendo Argentina, Canadá, Japón, Sudáfrica y Unión europea (Tabla 1).

Tabla 1. Situación de aprobaciones regulatorias del maíz resistente a insectos evento MON810

País	Ambiental (Año)	Alimentación humana y/o animal (Año)	Comercialización (Año)
Argentina	1998	1998	
Australia		2000	
Bulgaria	2000	2000	
Canadá	1997	1997	
Unión Europea	1998		1998
Japón	1996	1997	
Rusia		2000	
Sudáfrica	1999	1999	
Suiza		2000	
Reino Unido		1997	
Estados Unidos	1996	1996	

#### **Nota aclaratoria sobre los estándares de calidad para la documentación de las solicitudes de aprobación regulatoria**

La evaluación de una solicitud para liberación ambiental es comparable a la revisión exhaustiva por profesionales expertos de un manuscrito para su publicación en una revista científica. Por consiguiente, la calidad del texto y de la información presentada debe estar a un nivel acorde con ello.

Los procedimientos experimentales se deben describir en detalle suficiente (o citados en forma acorde) como para que la metodología pueda ser repetida. La redacción y estilo idiomático deben ser estándar y se debe evitar el uso de la jerga de laboratorio. Se recomienda la adopción de nomenclatura estándar internacional, como las descritas en los *International Union of Biochemistry and Molecular Biology's Biochemical Nomenclature and Related Documents (1992) 2nd Ed. Portland Press, Inc., Chapel Hill, NC*, los cuales contienen las reglas de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica (*International Union of Biochemistry*) para aminoácidos, péptidos, ácidos nucleicos, polinucleótidos, vitaminas, coenzimas, quinonas, ácido fólico y compuestos relacionados, corrinoides, lípidos, enzimas, proteínas, ciclitoles, esteroides, carbohidratos, carotenoides, hormonas peptídicas, e inmunoglobulinas humanas. Se deben utilizar los nombres químicos correctos y se deben especificar las cepas de los organismos. Se deben identificar los nombres comerciales. Cuando sea posible, se deben usar los símbolos y unidades del Sistema Internacional.

Las ilustraciones, tablas y figuras deben ser claras y legibles. Se aceptan ilustraciones originales, fotografías de alta calidad o impresiones láser, pero no las reproducciones de baja calidad que usualmente son el resultado de impresiones fotocopiadas. Particularmente, las reproducciones de geles o transferencias (*blots*) deben ser de una calidad suficiente como para mostrar en forma clara los resultados.



## Capítulo 2 - Conceptos y principios

Durante los 10.000 años pasados, con excepción de los últimos 100, la agricultura se basó en el mejoramiento animal y vegetal realizado por prueba y error. En el caso de las plantas, se seleccionaron sobre la base de un aspecto saludable, crecimiento vigoroso, mayor rendimiento y mejor apariencia, sabor y aroma de las porciones comestibles. Desde los comienzos de los 1900s, el mejoramiento se empezó a realizar sobre la base de conocimientos científicos. En los últimos 20 años, la aplicación de las herramientas de biología molecular permitió la producción de plantas y animales con nuevas características, las que no podrían haber sido introducidas por las técnicas de mejoramiento tradicional.

La comida es más que una fuente de energía y nutrición, tiene un importante significado simbólico y es una de las maneras en que las culturas humanas se diferencian entre sí. No es sorprendente que nuestras creencias sobre la seguridad y aceptación de los alimentos estén basadas más en la cultura y la tradición que en pruebas objetivas de seguridad alimentaria. Aunque la selección y mejoramiento tradicional de las plantas podría haber incluido una evaluación de seguridad, ésta no fue formalmente reconocida en ningún caso y hay muy poca documentación sobre el proceso que debe realizarse para determinar la seguridad de los alimentos nuevos.

La diversidad de las nuevas características que pueden introducirse en los alimentos por biotecnología ha desafiado a nuestro enfoque tradicional de la seguridad alimentaria. Los nuevos alimentos producidos por la biotecnología han sido evaluados mucho más que cualquier otro alimento, y las exigencias públicas sobre la determinación de la seguridad de estos productos es mayor que la de cualquier otro alimento producido por métodos más convencionales. Es más, la evaluación rigurosa de estos nuevos alimentos nos ha servido para percibir las limitaciones de nuestro conocimiento con respecto a los niveles normales y la variabilidad de los componentes de los alimentos, incluyendo los efectos a corto y mediano plazo que éstos tienen sobre la salud.

Aunque la biotecnología moderna contempla la posibilidad de introducir cambios genéticos en los organismos que se usan para fabricar alimentos, esto no implica necesariamente que estos alimentos nuevos sean menos seguros que los producidos por técnicas convencionales. Este principio tiene importantes consecuencias en la evaluación de la seguridad de los alimentos nuevos y los generados por ingeniería genética. Esto significa que no se necesita un estándar nuevo o diferente, y que los principios establecidos previamente para evaluar la seguridad alimentaria aún son válidos. Más aún, la precisión propia de los métodos de biología molecular para la introducción de cambios genéticos específicos podría permitir una evaluación de la seguridad alimentaria más directa y puntual.

### **Equivalencia sustancial**

Hasta hoy, la evaluación de la seguridad de los alimentos nuevos y generados por ingeniería genética se ha basado en el principio de que estos productos pueden compararse con los alimentos tradicionales que tienen un historial de uso considerable. Aún más, esta comparación puede basarse en el examen de los mismos factores de riesgo que ya se han determinado para su par no transgénico. El objetivo es determinar si el alimento nuevo presenta algún otro riesgo adicional, o mayor, en comparación con su par tradicional, o si puede intercambiarse con el tradicional sin afectar la salud o el estado nutricional de los consumidores. El objetivo no es establecer un valor absoluto de seguridad, sino más bien la seguridad relativa del nuevo producto tal que haya una certidumbre razonable de que su uso no producirá daños intencionales bajo las condiciones de procesamiento y consumo.

Es importante considerar también los patrones de procesamiento y consumo de los alimentos, aún para los tradicionales. Hay plantas que son habitualmente consumidas por las personas y que son tóxicas en su estado crudo, pero aceptadas como alimento porque los métodos de procesamiento alteran o eliminan tal toxicidad. Por ejemplo, la yuca o mandioca (cassava, en

inglés) es un tubérculo bastante tóxico, pero la cocción lo vuelve un alimento nutritivo y muy empleado en el mundo. La soja y el poroto lima o pallar, entre otros cultivos, contienen antinutrientes (por ej.: lectinas e inhibidor de tripsina en soja) y requieren ser procesados correctamente para su consumo. Las papas (patatas) y tomates pueden contener niveles tóxicos de los glicoalcaloides solanina y alfa-tomatina, respectivamente. Es decir, la presencia de tóxicos en una variedad vegetal no necesariamente elimina su uso. Al evaluar la seguridad de un nuevo alimento, es importante estudiar el rango de tóxicos posibles, los nutrientes críticos u otros factores relevantes, como su procesamiento, uso previsto y exposición.

Este enfoque comparativo es la base del concepto de equivalencia sustancial, que fue desarrollado antes que cualquier alimento generado por ingeniería genética llegara al mercado. Fue descrito en 1993 en una publicación de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD 1993). Este documento fue el resultado del trabajo de unos 60 expertos de 19 países de la OCDE, quienes discutieron durante más de dos años cómo evaluar la seguridad de los alimentos genéticamente modificados. El concepto de equivalencia sustancial fue luego avalado por la Consulta Conjunta de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (WHO) en 1996 (FAO/WHO 1996). La Consulta reconoce que el establecimiento de la equivalencia sustancial no es una evaluación de riesgo *per se*, pero que si las características y composición de un nuevo alimento son equivalentes a sus pares convencionales con un historial de consumo seguro, significa que el nuevo producto no será menos seguro bajo patrones de consumo y prácticas de procesamiento similares.

En la Consulta Conjunta de 1996 se previeron tres posibles escenarios que podrían surgir de la evaluación de la equivalencia sustancial (FAO/WHO 1996):

- Cuando se ha establecido la equivalencia sustancial para un organismo o producto, se lo considera tan seguro como su par convencional y por lo tanto no se requieren más ensayos de seguridad.
- Cuando se ha establecido la equivalencia sustancial salvo para determinadas diferencias definidas, los ensayos de seguridad adicionales deberían concentrarse en esas diferencias. Se debería usar un enfoque basado en las secuencias para estudiar los productos de los nuevos genes y su estructura, función, especificidad, e historial de uso. Si surgiera un riesgo potencial de este análisis para alguno de los productos de los nuevos genes, deberían realizarse estudios *in vitro* y/o *in vivo* adicionales.
- Cuando no puede establecerse la equivalencia sustancial, esto no quiere decir necesariamente que el producto alimenticio no sea seguro. No todos los productos requerirán una evaluación exhaustiva de seguridad. El diseño de cualquier programa de ensayos debería establecerse sobre una base caso por caso, teniendo en cuenta las características de cada alimento o componente alimenticio. Los objetivos deberían ser claros, teniéndose particular cuidado en los diseños experimentales. Pueden requerirse otros estudios, como ensayos de alimentación en animales, especialmente cuando se pretende que el nuevo alimento reemplace a una buena parte de la dieta.

Uno de los beneficios del concepto de equivalencia sustancial es que provee una flexibilidad que puede ser útil en la evaluación de la seguridad alimentaria. Es una herramienta que ayuda a identificar cualquier diferencia, intencional o no intencional, que debería ser el foco de estudios de seguridad adicionales. Como es un proceso comparativo para evaluar la seguridad, la determinación de la equivalencia sustancial debería hacerse en varios puntos de la cadena alimentaria (por ej.: producto recién cosechado o sin procesar, fracciones individuales del procesamiento, y/o alimento o ingrediente final).

La Consulta Conjunta FAO/WHO más reciente sobre los alimentos derivados de la biotecnología (FAO/WHO 2000) concluyó que la aplicación del concepto de equivalencia sustancial contribuye a la robustez del sistema de evaluación de seguridad. La Consulta se mostró satisfecha con el enfoque usado para evaluar la seguridad de los alimentos nuevos y

genéticamente modificados que han sido evaluados para uso comercial. La evaluación de la seguridad basada en el concepto de equivalencia sustancial ha mostrado ser el enfoque más práctico para analizar la seguridad de los alimentos e ingredientes alimentarios desarrollados por la biotecnología moderna. De hecho, no hay hasta el presente estrategias alternativas que brinden una mejor garantía de seguridad (FAO/WHO 2000).

Como un ejemplo de la aplicación del concepto de equivalencia sustancial, se pueden considerar las papas (patatas) que han sido genéticamente modificadas para expresar la proteína de la cubierta del virus de la papa Y (PVY), y que por lo tanto resultan resistentes a la enfermedad causada por este virus:

- En las papas no transformadas, la presencia de las proteínas de la cubierta viral es debida a la infección natural por el virus. Es común hallar estas proteínas en las papas, o sea que tienen una larga historia de consumo seguro.
- Las proteínas de la cubierta del virus (ya sea PVY o cualquier otro virus vegetal) nunca han sido asociadas a toxicidad o casos de alergia.
- Consecuentemente, las papas transgénicas que expresan a las proteínas de la cubierta del virus PVY serían consideradas sustancialmente equivalentes a las papas no transformadas infectadas con el mismo virus, teniendo en cuenta que las cantidades de proteínas virales expresadas no son significativamente diferentes a los niveles encontrados en los tubérculos infectados.

Esta analogía se aplica sólo a las proteínas de la cubierta del virus expresadas en las partes de la planta que se consumen habitualmente (tubérculo, considerando también cualquier efecto adverso sobre el nivel de glicoalcaloides y almidones nutritivos clave, así como patrones de consumo).

### **Limitaciones de la equivalencia sustancial**

La aplicación del concepto de equivalencia sustancial requiere que haya datos suficientes disponibles en la literatura, o generados a través de análisis, que permitan una comparación efectiva entre el nuevo alimento y su par tradicional. Esto sugiere una limitación básica del concepto de equivalencia sustancial: la dependencia de un comparador o par, y de la información disponible o que puede generarse a partir del comparador, o sea que el grado de seguridad depende de los componentes analizados para un comparador particular. La elección del comparador es por lo tanto crucial para la aplicación efectiva del concepto de equivalencia sustancial para establecer la seguridad de un nuevo alimento. Un comparador apropiado debe tener un historial de uso bien documentado. Si hay efectos adversos asociados a un tipo particular de alimento, los componentes específicos que se consideran que causan esos efectos deberían describirse y caracterizarse en detalle para permitir una comparación efectiva.

Sin excepción, todos los alimentos nuevos aprobados hasta hoy resultaron de la incorporación (o fueron seleccionados para) uno o dos características simples en las plantas. Todos estas características, salvo las variedades de canola y soja con composición de aceites modificada (por ej.: alto ácido láurico, alto ácido oleico) y los tomates de maduración retardada, han sido introducidas para reducir los costos en el campo, confiriéndole resistencia a insectos y/o virus, o tolerancia a herbicidas de amplio espectro más amigables con el medio ambiente. Estos productos fueron diseñados especialmente para ser comparables en composición y calidad nutricional a sus pares tradicionales, haciendo simple la demostración de la equivalencia sustancial (con las diferencias definidas).

La próxima generación de productos será mucho más compleja y desdibujará la frontera que hay entre los alimentos y los fármacos. De esta mezcla surgirán productos como los nutraceuticos, las vacunas comestibles, y los medicamentos producidos en plantas y animales. Para estos productos será mucho más difícil encontrar los comparadores adecuados, y el enfoque de la evaluación de la seguridad, desde el punto de vista de la equivalencia sustancial, podrá no ser efectivo.

### Efectos no intencionales

Como lo demuestran los ejemplos siguientes, los productos nuevos en los que se han modificado los perfiles nutricionales desafiarán nuestra capacidad de evaluar las consecuencias no intencionales.

El primer ejemplo se refiere al arroz genéticamente modificado para contener menos glutelina<sup>a</sup>, a través de la introducción de la región codificante del gen de la glutelina en la orientación anti-sentido, para la producción comercial de sake. La disminución en los niveles de glutelina fue, sin embargo, asociada a una disminución no intencional de los niveles de prolaminas. Este cambio en los niveles de prolaminas no fue detectado por los análisis nutricionales convencionales, como el perfil de proteínas totales y de aminoácidos, sino que sólo fue observado por electroforesis en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). Aunque el cambio en los niveles de prolaminas no afectaría su aplicación industrial, podría afectar la calidad nutricional y el potencial alergénico si este arroz se usara como alimento.

El segundo ejemplo está relacionado con el “arroz dorado”, modificado genéticamente para expresar mayores niveles de beta caroteno, un precursor de la vitamina A. Inesperadamente, se observó que esta modificación era acompañada por un aumento en los niveles de xantofilas, un aumento que no hubiera sido detectado por los análisis nutricionales corrientes pero sí por el análisis de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para los carotenoides.

Como ilustran estos dos ejemplos, dirigir la modificación a un sólo nutriente puede llevar a alteraciones no intencionales en los niveles de otros componentes, y pueden requerirse metodologías analíticas especiales para evaluar los cambios en el perfil nutricional total.

Otra consecuencia de la introducción de un cambio nutricional significativo en un alimento puede ser la necesidad de un monitoreo post-comercial para determinar si la dieta ha sido alterada y en qué grado, antes de que pueda realizarse una evaluación precisa del impacto sobre el status nutricional.

### Consideraciones sobre la seguridad

El objetivo del proceso de evaluación de riesgo para un alimento genéticamente modificado es examinar las consecuencias intencionales y no intencionales de una modificación específica, incluyendo a los tóxicos, en comparación con un par que tenga un historial de uso seguro. Dentro de este marco general deben considerarse las variaciones caso por caso.

La discusión internacional entre los países de la OCDE y dentro de la Consulta Conjunta de expertos FAO-WHO, resultó en un consenso sobre los aspectos de seguridad específicos que deberían ser considerados cuando se evalúa un nuevo alimento (OECD 2000). Éstos incluyen:

- Una descripción del organismo hospedador que fue genéticamente modificado, incluyendo información sobre la composición nutricional, antinutrientes conocidos, tóxicos y potencial alergénico, y cualquier otro cambio significativo en éstos que pudieran ocurrir debido al procesamiento normal;
- Una descripción del organismo donante, incluyendo cualquier toxicidad y alergenicidad conocidas asociadas, y los genes introducidos;
- La caracterización molecular de la modificación genética, incluyendo una descripción del proceso de modificación, y la estabilidad de la característica introducida;

---

<sup>a</sup> Ciertas proteínas de la semilla conocidas como globulinas que son insolubles en agua pero solubles en mezclas etanol-agua. Las prolaminas contienen una gran cantidad de los aminoácidos glutamina y prolina (del cual deriva el nombre de prolamina), pero poca cantidad de arginina, lisina e histidina. La gliadina de trigo contiene el 14% de su peso de prolina, 45% de glutamina, y muy poca lisina. La hordeína es la prolamina de la cebada, y la zeína es la del maíz. El término glutelina es usado para las globulinas de semillas que son insolubles en agua pero solubles en soluciones ácidas o básicas. Tanto las prolaminas como las glutelinas son mezclas de varias proteínas similares.

- La identificación de los productos génicos primarios y secundarios, incluyendo una descripción de las características del gen insertado;
- La evaluación de la seguridad de las sustancias nuevas en el alimento, incluyendo la evaluación de cualquier toxina producida por la modificación;
- La evaluación del potencial alergénico del nuevo alimento; y
- La evaluación de los efectos no intencionales sobre la composición del alimento, incluyendo (a) la evaluación de cambios en la concentración de nutrientes o tóxicos naturales, (b) la identificación de los antinutrientes que han sido alterados significativamente en el alimento nuevo, y (c) la evaluación de la seguridad de los compuestos que muestran una concentración significativamente alterada.

Evaluando estos aspectos de la seguridad, se debería considerar también la versión procesada del alimento, si es que normalmente sufre un procesamiento o manufactura, y aspectos del consumo del alimento, incluyendo: i) la identificación de la población humana que potencialmente consumiría el alimento genéticamente modificado y la cantidad que se espera que consuma, y ii) la evaluación de cualquier efecto que pudiera ocurrir si la ingesta del alimento nuevo difiriera de la ingesta de su par convencional.

### **Referencias**

1. FAO/WHO (1996): Biotechnology and food safety, Report of a joint FAO/WHO consultation. FAO Food and Nutrition Paper 61, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
2. FAO/WHO (2000): Safety aspects of genetically modified foods of plant origin, FAO/WHO consultation 29 May – 2 June 2000. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
3. OECD (1993): Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology, Concepts and Principles. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
4. OECD (2000): Report of the task force for the safety of novel foods and feeds. C(2000)86/ADD1 Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.



## Capítulo 3 – El organismo hospedador

En gran medida, la utilidad del concepto de equivalencia sustancial, como un punto de partida para la evaluación de los riesgos de los alimentos nuevos y genéticamente modificados, depende de un profundo conocimiento del organismo hospedador no modificado.

En el caso de la evaluación de la seguridad alimentaria, este conocimiento es crítico para identificar el rango natural y la variación de componentes nutricionales clave, tóxicos conocidos (por ej.: alcaloides en papa y tomate, glucosinolatos y ácido erúxico en canola, curcubícin en zapallo y zapallito), antinutrientes y alérgenos potenciales. Estos compuestos y sus respectivas concentraciones variarán de cultivo a cultivo, o durante las diferentes etapas del desarrollo y/o procesamiento de los componentes vegetales.

Es importante conocer el procesamiento y las propiedades del producto final para establecer el comparador apropiado de un nuevo alimento.

### CASO DE ESTUDIO MON 810

#### Orígenes

El maíz es un miembro de la tribu Maydae, que forma parte de la subfamilia Panicoideae de la familia Gramineae. Los géneros de la tribu Maydae incluyen a *Zea* y *Tripsacum* en el Hemisferio Occidental y a *Coix*, *Polytoca*, *Chionachne*, *Sclerachne* y *Trilobachne* en Asia. El género *Zea* incluye dos subgéneros: *Luxuriantes* y *Zea*. El maíz (*Zea mays* L.) es una especie separada dentro del subgénero *Zea*, junto con tres subespecies. Todas las especies del género *Zea*, salvo el maíz, son diferentes especies de teosinte. Hasta hace poco, las especies de teosinte se incluían en el género *Euchlaena* y no en el género *Zea*.

El maíz, *Zea mays* L., la planta hospedadora, tiene un historial de uso seguro. El maíz es uno de los pocos cultivos indígenas del Hemisferio Occidental y es cultivado en casi todas las áreas del mundo (Hallauer et al. 1988). El origen exacto del maíz moderno ha sido objeto de debate entre los botánicos durante años, aunque hay evidencias que avalan un conjunto de teorías basadas en el teosinte y la intervención del hombre (Aldrich et al. 1986; Galinat 1988; Jugenheimer 1976; Mangelsdorf 1974).

#### El maíz como fuente de alimento para el hombre

Aunque es una fuente ideal de energía, las personas de todo el mundo consumen muy poco el grano entero o el maíz procesado, comparados con los ingredientes alimenticios basados en el maíz (Hodge 1982; Watson, 1988). Los precios bajos y la buena disponibilidad del maíz han resultado en el desarrollo de una gran cantidad de usos alimenticios e industriales. El maíz es una excelente materia prima para la manufactura del almidón, no sólo por el bajo costo y disponibilidad, sino también porque el almidón puede obtenerse del maíz muy fácilmente y con un alto rendimiento y pureza (Anderson & Watson 1982). El almidón de maíz se vende tal cual, sin embargo la mayor parte del almidón es convertido en una variedad de edulcorantes y productos de fermentación, incluyendo el jarabe de maíz de alta fructosa y el etanol (Watson 1988; Anderson & Watson 1982). Además, el aceite de maíz es procesado a partir del germen para ser empleado como aceite vegetal (Orthofer & Sinram 1987). Cada uno de estos materiales es un componente de los muchos productos alimenticios generados por la industria panadera, láctea, de bebidas, de confitería y de la carne.

#### Maíz y nutrición animal

La alimentación animal es de lejos el uso más importante del maíz en todo el mundo, destinándose la mayor parte de la producción para la alimentación del ganado vacuno, aviar y porcino (Hodge 1982; Perry 1988; Watson 1988). De aproximadamente 200 millones de toneladas de grano producidas en Estados Unidos, entre un 40 y un 50% es para la

alimentación animal. Otras 1,5 a 2 millones de toneladas de los productos de las industrias de las moliendas húmedas y secas del maíz, sobre todo gluten, son administradas directamente o en alimentos balanceados (Perry 1988). Además del maíz cultivado para grano, un área importante del maíz es utilizada para silo de maíz de planta entera, utilizado mayormente para alimentar a los rumiantes (Watson 1988; Perry 1988). El maíz es consumido fácilmente por el ganado y, debido a su alto contenido en almidón y bajo contenido en fibra, es una de las fuentes más concentradas de energía, conteniendo más nutrientes digeribles que cualquier otro forraje.

### **Producción de sustancias perjudiciales fisiológicamente activas**

Las plantas y los granos de maíz no son tóxicos para humanos ni para animales domésticos o salvajes. El maíz no contiene toxinas endógenas ni niveles significativos de factores antinutritivos (Watson 1988; Wright 1988; Watson 1982).

### **Alergenicidad**

Hay casos informados de alérgenos en maíz, especialmente en el polen (White & Pollack, 1995). Las proteínas responsables de esta alergenicidad no han sido identificadas aún.

### **Consumo seguro**

Literalmente, miles de productos alimenticios e industriales dependen de ingredientes derivados del maíz. El maíz y los productos procesados del maíz no suponen un riesgo para la salud del hombre, animales domésticos o salvajes. El maíz es uno de los forrajes más importantes producidos en todo el mundo. La producción anual en Estados Unidos es de aproximadamente 200 millones de toneladas. De éstas, el 40%-50% se usa para alimentar a los animales directamente con grano. Otras 1,5 a 2 millones de toneladas de co-productos de las industrias de la molienda seca y húmeda son utilizadas directamente o en alimentos balanceados. Unas 40 millones de toneladas adicionales se exportan a países europeos y asiáticos, donde se usan mayormente como forraje.

### **El material receptor**

El tejido vegetal de maíz que es el receptor del gen *cry1Ab* introducido es derivado de las líneas endogámicas de maíz A188 y B73. Estas líneas de maíz están públicamente disponibles, fueron desarrolladas en Estados Unidos por la Universidad de Minnesota y la Universidad Estatal de Iowa, respectivamente (Armstrong et al., 1991), y han sido muy usadas por los fitomejoradores de maíz para producir nuevas variedades para Estados Unidos y Europa.

### **Perfiles de exposición y consumo**

Los productos alimenticios del maíz resistente a insectos, que es el asunto de esta aplicación, son el maíz y sus productos derivados (grano, aceite, almidón y proteína). Los usos del maíz como forraje incluyen al grano y a fracciones ricas en proteínas, como el "gluten meal" y el "gluten feed". Se espera que las variedades de maíz resistentes a insectos reemplacen a parte de las variedades de maíz que se usan actualmente, de modo que representará tanto en la ingesta como en el uso una fracción de los productos totales de maíz. No se espera que el consumo total del maíz o de los productos derivados del maíz cambie por la introducción de variedades de maíz resistentes a insectos.

## Referencias

1. Aldrich, S.R., Scott, W.O. & Hoefft, R.G.. (1986). Modern Corn Production, Third Edition. A & L Publications, Inc., Champaign, Illinois, USA.
2. Anderson, R.A. & Watson, S.A. (1982). The corn milling industry. pp. 31 - 78. In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Wolff, I.A. (ed.), Volume II: Part 1, Plant Products. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
3. Armstrong, C. L., Green, C. E. & Phillips, R. L. (1991). Development and Availability of Germplasm with High Type II Culture Formation Response. *Maize Genetics Cooperation News Letter* **65**, 92-93.
4. Galinat, W.C. (1988). The Origin of Corn. pp. 1 - 31. In: Sprague, G.F. and Dudley, J.W., Editors. Corn and Corn Improvement, Third Edition. Number 18 in the series Agronomy. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin, USA.
5. Hallauer, A.R., Russell, W.A. & Lamkey, K.R. (1988). Corn Breeding. pp. 463- 564. In Sprague, G.F. and Dudley, J.W., Editors. Corn and Corn Improvement, Third Edition. Number 18 in the series Agronomy. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Wisconsin, USA.
6. Hodge, J.E. (1982). Food and feed uses of corn. pp. 79-87 In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture. I.A. Wolff ed. Volume II: Part 1, Plant Products. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL U.S.A.
7. Jugenheimer, R.W. (1976). Corn: Improvement, Seed Production, and Uses. pg 227. John Wiley & Sons, New York.
8. Mangelsdorf, P.C. (1974). Corn - Its Origin, Evolution, and Improvement. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts, USA.
9. Orthoefer, F.T. & Sinram, R.D. (1987). Corn oil: composition, processing, and utilization. pp. 535-551. In Corn Chemistry and Technology. Watson, S.A. and R.E. Ramstad, Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.
10. Perry, T.W. (1988). Corn as livestock feed. Pp. 941-963. In Corn and Corn Improvement, 3rd ed.; G.F. Sprague and J. W. Dudley, (eds). American Society of Agronomy, Inc. Wisconsin.
11. Watson, S. A. (1982). Corn: Amazing Maize. General Properties. Pg 3-29. In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Volume II: Part 1 Plant Products. I.A. Wolff (ed). CRC Press, Inc., Florida.
12. Watson, S.A. (1988). Corn marketing, processing and utilization. pp 881-940. In Corn and Corn Improvement, Third Edition. Sprague, G.F. and J.W. Dudley, eds. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc. Madison, WI.
13. White, P.J. & Pollak, L.M. (1995). Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, products, composition, and nutritive values. *Cereal Foods World* Vol. **40**, No. 10.
14. Wright, K.N. (1988). Nutritional properties and feeding value of corn and its by-products. pp 447-478. In Corn Chemistry and Technology. Watson, S.A. and P.E. Ramstad, eds. American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minnesota.



## Capítulo 4 – El organismo donante

La información sobre la historia natural del organismo donante es necesaria, particularmente si el donante u otro miembro de su género muestran normalmente características de patogenicidad o toxicidad ambiental, o poseen otras características que afecten la salud humana.

### CASO DE ESTUDIO MON810

#### Los genes de los organismos donantes

MON810 contiene secuencias de ADN derivadas de los siguientes organismos donantes:

- Gen *cry1Ab* de *Bacillus thuringiensis*. el gen *cry1Ab* utilizado para producir las líneas MON810 de maíz protegido contra insectos es una versión modificada del gen *cry1Ab* aislado del ADN de *B. thuringiensis subsp. kurstaki* cepa HD-1, y originalmente se lo designaba *cryIA(b)* acorde a la nomenclatura de Höfte y Whitely (1989), que desde ese entonces ha sido cambiado por una revisión a *cry1Ab* (Crickmore *et al.*, 1998). [En este módulo se usa la nomenclatura de Crickmore *et al.* (1998)]. El gen nativo de longitud completa que codifica para la proteína Cry1Ab y su secuencia nucleotídica completa fueron descritos por Fischhoff *et al.* (1987).
- Promotor 35S potenciado del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). El promotor del transcripto 35S del virus del mosaico de la coliflor (Odell *et al.* 1985) con la región potenciadora (*enhancer*) duplicada (Kay *et al.* 1985).
- El intrón del gen *hsp70* de maíz (*heat shock protein* o proteína de choque térmico). El gen *hsp70* que codifica para la proteína hsp70 provee niveles de transcripción incrementados (Rochester *et al.* 1986).
- La región 3' no traducida del gen *nopalina sintasa* (3' *nos*) del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*. La secuencia 3' nos provee la señal de poliadenilación para la expresión estable del transgén (Fraley *et al.*, 1983).

Ninguna de las secuencias insertadas posee actividad patogénica o características perjudiciales. Las siguientes secuencias también estaban presentes en el/los plásmido/s usados en el proceso de transformación, pero NO se integraron al genoma de MON810:

- Gen marcador de selección *cp4 epsps*. El gen que codifica para la enzima CP4 EPSPS de *Agrobacterium sp.* cepa CP4 fue utilizado como marcador de selección vegetal para identificar las pocas células de maíz que originalmente recibieron el gen *cry1Ab* introducido, responsable de la protección contra insectos, en las etapas iniciales de selección en el cultivo *in vitro* en el laboratorio, luego de la transformación. Las proteínas EPSPS producidas naturalmente por las plantas se encuentran en el cloroplasto. Por lo tanto, la secuencia que codifica para el péptido señal de tránsito a cloroplasto, *ctp2* del gen *epsps* de *Arabidopsis thaliana* (Klee & Rogers, 1987), fue fusionada al extremo amino de la proteína CP4 EPSPS con el fin de que la CP4 EPSPS sea dirigida a los cloroplastos, el sitio de actividad de EPSPS y de acción del glifosato (Kishore & Shah, 1988).
- Gen marcador (*gox*) codificante para la enzima glifosato oxidasa. El gen *gox*, clonado de *Achromobacter sp.* cepa LBAA, también fue utilizado como marcador de selección. La proteína GOX es dirigida a los plástidos por medio de la secuencia péptido señal de tránsito a cloroplasto *ctp1*, derivada del gen *ssu1A* de *Arabidopsis thaliana* (Timko *et al.*, 1988).
- Gen marcador de selección bacteriano que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II (*nptII*). El gen marcador de selección bacteriano, *nptII*, aislado del transposón procariota Tn5 (Beck *et al.*, 1982), codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa II, la cual confiere resistencia a los antibióticos aminoglucósidos (ej.:

kanamicina, neomicina) que se utilizan para la selección de *Escherichia coli* recombinantes que contienen el plásmido de transformación. El promotor de este gen es activo únicamente en células bacterianas.

- *lac Z*. Una secuencia parcial codificante del gen *lacI* de *E. coli*, el promotor *Plac*, y una secuencia parcial codificante para la proteína beta-D-Galactosidasa o LacZ, provenientes de pUC119 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).
- *ori-pUC*. Origen de replicación de los plásmidos pUC que permiten la replicación del plásmido dentro de *E. coli* (Vieira & Messing, 1987).
- CTP2. Secuencia del péptido señal de tránsito al cloroplasto, correspondiente a la EPSPS de *Arabidopsis thaliana* (Klee & Rogers, 1987), e incluida para dirigir la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, el sitio de síntesis de los aminoácidos aromáticos.

### Patogenicidad potencial del organismo donante

*Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* (B.t.k.) es una bacteria gram-positiva formadora de esporas y estructuras cristalinas, que ha sido utilizada comercialmente durante los últimos 30 años para controlar insectos plaga. Estos microbios se encuentran naturalmente en el suelo en todas partes del mundo. Esta cepa controla insectos plaga por medio de la producción de proteínas insecticidas cristalinas conocidas como delta-endotoxinas. Para ejercer su actividad contra el insecto blanco, la proteína debe ser ingerida. En el intestino del insecto la proteína se une a receptores específicos del intestino medio, se inserta en la membrana de las células intestinales y forma poros permeables específicamente a iones. Este evento interrumpe el proceso digestivo y causa la muerte del insecto.

No existen receptores para las delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de mamíferos, por lo tanto los humanos no son susceptibles a estas proteínas. Esto se ha confirmado en numerosos estudios de bioseguridad llevados a cabo en animales de laboratorio, que son tradicionalmente sustitutos experimentales de humanos. Los resultados de algunos de estos ensayos se han publicado en revisiones científicas (Ignoffo, 1973; Shaddock *et al.*, 1983; Siegel & Shaddock, 1989). Los resultados no publicados de los ensayos de bioseguridad generados por firmas que registraron las preparaciones comerciales de *B. thuringiensis*, han sido igualmente resumidas en los Estándares de Registro para Formulaciones de Bt de la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU. (*Environmental Protection Agency*, EPA 1988). Una formulación típica está compuesta por esporas Bt y endotoxinas proteicas Bt, consistiendo estas últimas en hasta un tercio del peso de las esporas. Los insectos blanco son susceptibles a dosis orales de proteínas Bt, mientras que, por su parte, no existe evidencia de efecto tóxico alguno en mamíferos, peces o aves de laboratorio, a los que se les suministró dosis equivalentes de hasta 10 µg de proteína por gramo de peso corporal. No se observaron efectos negativos en insectos no blanco con dosis más de 100 veces superior a la necesaria para controlar insectos plaga (EPA, 1988). Además de la falta de receptores para las proteínas Bt, la ausencia de efectos adversos en animales no blanco es mayor aún por la poca solubilidad y estabilidad de las proteínas Bt en el medio ácido del estómago. Las condiciones ácidas estomacales y la presencia de ácidos biliares desnaturalizan las proteínas Bt, facilitando su rápida degradación (EPA MRID no. 43439201). Las delta-endotoxinas activadas enzimáticamente *in vitro* resultan también no tóxicas cuando se administran oralmente a animales de laboratorio. Incluso si las toxinas proteicas Bt activadas pudieran ingresar al tracto digestivo de mamíferos, no existen receptores en la superficie del tejido gastrointestinal que permitan la adhesión de la toxina proteica a la superficie celular.

Estas consideraciones científicas demuestran el historial de uso seguro de las preparaciones de *B. thuringiensis*. Basándose en la información científica disponible, la EPA y otras instituciones científicas regulatorias en todo el mundo han determinado que el uso de productos de *B. thuringiensis* registrados no poseen riesgos significativos para la salud humana u organismos no blanco.

Tabla 1. Endotoxinas Bt y sus actividades contra determinadas especies de insectos<sup>1</sup>

Proteína Cry	Origen (subespecies Bt)	Insectos blanco principales	
		Orden <sup>2</sup>	Nombres comunes
Cry1Aa	<i>kurstaki</i>	L	gusano de seda, polilla del tabaco, barrenador europeo del maíz
Cry1Ab	<i>berlineri</i>	L, D	polilla del tabaco, polilla del repollo, mosquito
Cry1Ac	<i>kurstaki</i>	L	gusano cogollero del tabaco, gusano falso medidor del repollo, isoca del algodón
Cry1Ad1	<i>aizawai</i>	L	varios Lepidópteros
Cry1Ae1	<i>alesti</i>	L	gusano cogollero del tabaco
Cry1Ba1	<i>thuringiensis</i>	L	gusano del repollo
Cry1Bc2	<i>morrisoni</i>	L, D	varios lepidópteros
Cry1Ca3	<i>entomocidus</i>	L	oruga de la hoja del algodón, mosquito
Cry1Cb1	<i>galleriae</i>	L	oruga militar
Cry1Da1	<i>aizawai</i>	L	oruga militar, polilla del tabaco
Cry1E	<i>kenyae</i>	L	oruga de la hoja del algodón
CryEb1	<i>aizawai</i>	L	varios lepidópteros
CryFa	<i>aizawai</i>	L	barrenador europeo del maíz, oruga militar
Cry2Aa	<i>kurstaki</i>	L, D	lagarta peluda, mosquito
Cry2Ab	<i>kurstaki</i>	L	lagarta peluda, gusano falso medidor del repollo, polilla del tabaco
Cry2Ac	<i>shangai</i>	L	polilla del tabaco, lagarta peluda
Cry3Aa	<i>san diego</i>	C	escarabajo de la papa del Colorado
Cry3Aa3	<i>tenebrionis</i>	C	escarabajo de la papa del Colorado
CryBa	<i>tolworthi</i>	C	escarabajo de la papa del Colorado
Cry7Aa	N/D <sup>3</sup>	C	escarabajo del pepino
Cry4Aa	<i>israelensis</i>	D	mosquito (Aedes y Culex)
CryBa	<i>israelensis</i>	D	mosquito (Aedes)
Cry9Aa	<i>galleriae</i>	L	polilla de la cera o falsa tiña
Cry9Ba	<i>galleriae</i>	L	polilla de la cera o falsa tiña

1. Adaptado de Krattiger (1997)

2. L: Lepidoptera; C: Coleoptera; D: Diptera

3. N/D: No disponible

## Referencias

1. Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. & Schaller, H. (1982). Nucleotide Sequence and Exact Localization of the Neomycin Phosphotransferase Gene from Transposon Tn5. *Gene* 19, 327-336.
2. Crickmore, N., Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. & Dean, D. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 807-813.
3. EPA (1988). Guidance for the registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as an active ingredient. NTIS PB 89-164198.
4. EPA MRID no. 43439201. Ream, J.E. (1994). Assessment of the In Vitro Digestive Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-I Protein., Study Number 93-01-39-04, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
5. Fischhoff, D.A., Bowdish, K.S., Perlak, F.J., Marrone, P.G., McCormick, S.M., Niedermeyer, J.G., Dean, D.A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E.J., Rochester, D.E., Rogers, S.G. & Fraley, R.T. (1987). Insect Tolerant Transgenic Tomato Plants. *Biotechnology* 5, 807-813.
6. Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffman, N.L. & Woo, S.C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 4801-4807.
7. Höfte, H. & Whiteley, H.R. (1989). Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Reviews* 53, 242-255.
8. Ignoffo, C.M. (1973). Effects of entomopathogens on vertebrates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 217, 144-172.

9. Kay, R., Chan, A., Daly, M. & McPherson, J. (1985). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236, 1299-1302.
10. Kishore, G. & Shah, D. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 627-663.
11. Klee, H.J. & Rogers, S.G. (1987). Cloning of an Arabidopsis Gene Encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase: Sequence Analysis and Manipulation to Obtain Glyphosate-Tolerant Plants. *Mol. Gen. Genet.* 210, 437-442.
12. Krattiger, A.F. (1997). Insect resistance to crops: A case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt) and its transfer to developing countries. ISAAA Briefs No. 2. ISAAA: Ithaca, NY. pp. 42.
13. Odell, J.T., Nagy, F. & Chua, N-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313, 810-812.
14. Rochester, D.E., Winer, J.A. & Shah, D.M. (1986). The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *EMBO J.* 5, 451-458.
15. Shaddock, J.A. (1983). Some observations on the safety evaluation of nonviral microbial pesticides. *Bull. W.H.O.* 61, 117-128.
16. Siegel, J.P. & Shaddock, J.A. (1989). Safety of microbial insecticides to vertebrates - humans. In: *Safety of Microbial Insecticides*, pp. 101-114. CRC Press, Inc., Florida, U.S.A.
17. Timko, M.P., Herdies, L., de Alameida, E., Cashmore, A.R., Leemans, J. & Kreffers, E. (1988). Genetic Engineering of Nuclear encoded Components of the Photosynthetic Apparatus of Arabidopsis In: *The Impact of Chemistry on Biotechnology - A Multidisciplinary Discussion*. ACS Books, Washington, DC. pp. 279-295.
18. Vieira, J. & Messing, J. (1987). Production of Single Stranded Plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* 153, 3-11.
19. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 Phage Cloning Vectors and Host Strains: Nucleotide Sequences of the M13 mp18 and pUC19 Vectors. *Gene* 33, 103-119.



## Capítulo 5- Método de transformación

Se requiere una descripción detallada de las características moleculares de la planta transgénica para demostrar que el obtentor ha analizado críticamente dicha planta y sus productos, incluyendo todos los genes y proteínas nuevas. El método por el cual se introduce la nueva característica en la planta receptora determina, en parte, los requerimientos de información para la evaluación de la biología molecular de la planta. Los dos métodos principales para introducir nuevo material genético en células vegetales son el bombardeo con micropartículas y la transformación mediada por *Agrobacterium*. Cada una de estas técnicas, descritas en mayor detalle a continuación, presenta cuestiones específicas que deben ser tratadas.

### Transformación mediada por *Agrobacterium*

*Agrobacterium* es un microorganismo fitopatógeno del suelo que usa procesos de ingeniería genética para “dominar” parte de la maquinaria metabólica de la célula vegetal hospedadora, de modo de derivar algunas de las fuentes de carbono y nitrógeno de la célula hospedadora para la producción de nutrientes bacterianos (opinas), los cuales pueden ser catabolizados específicamente por la bacteria invasora (Tempe & Schell, 1977). Las células parasitadas son también inducidas a proliferar, y el tumor resultante en la enfermedad “agalla de la corona” es un resultado directo de la incorporación de una región del ADN transferido, ADN-T, derivado de un megaplásmido circular Ti (inductor de tumor, 150-250 kB) de *A. tumefaciens*, en el genoma de la planta hospedadora.

La comprensión de este proceso natural de transformación, junto con la idea de que cualquier porción de ADN foráneo colocada entre las secuencias borde del ADN-T puede ser transferida a células vegetales, llevó a la construcción del primer vector y sistema bacteriano de transformación vegetal (para una revisión bibliográfica ver Hooykaas & Shilperoort, 1992). Desde el primer informe de una planta transgénica de tabaco que expresaba genes foráneos (Fraleley *et al.*, 1983), se ha logrado un gran progreso en el conocimiento a nivel molecular del proceso de transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*. *A. tumefaciens* infecta naturalmente sólo especies dicotiledóneas, aunque los métodos de transformación mediada por *Agrobacterium* también se han aplicado a plantas monocotiledóneas recientemente. Tal es el caso del arroz (Hiei *et al.* 1994; Cheng *et al.* 1998), banana (May *et al.*, 1995), maíz (Ishida *et al.*, 1996), trigo (Cheng *et al.*, 1997) y caña de azúcar (Enríquez-Obregón, 1997 y 1998; Arencibia *et al.*, 1998). Se ha publicado un análisis exhaustivo de las estrategias para la aplicación práctica de esta metodología (Birch, 1997).

La transformación de tejido vegetal mediada por *Agrobacterium* resulta generalmente en un bajo número de copias, mínimos rearrreglos, y una eficiencia de transformación superior a la obtenida por métodos de transformación directa, como el bombardeo con micropartículas (Pawlowski & Somers, 1996; Gelvin, 1998).

Hasta 1995 se pensaba que las secuencias comprendidas entre el borde izquierdo y derecho del ADN-T eran los únicos elementos transgénicos que se transferían a la célula receptora. Ramanathan y Veluthambi (1995), Wenk *et al.* (1997) y Kononov *et al.* (1997) demostraron que hay secuencias del vector por fuera de los bordes del ADN-T que también podían ser integradas junto con los genes de interés. Los ensayos de Kononov *et al.* (1997) demostraron que las secuencias plasmídicas podían integrarse al genoma receptor acopladas a las secuencias del borde izquierdo o derecho, o como una unidad independiente no ligada al ADN-T. Matzke & Matzke (1998) establecieron que las secuencias plasmídicas que se unen al ADN-T y al ADN receptor parecen ser especialmente deletéreas para la expresión génica, y esta observación fue avalada por el hallazgo, por parte de los mismos autores, de que fragmentos plasmídicos separados del ADN-T se correlacionaban con transgenes expresados en forma estable.

Las plantas que se transforman en forma independiente con el mismo plásmido tendrán comúnmente diferentes niveles de expresión, un fenómeno que no siempre se correlaciona con el número de copias (Gelvin, 1998). En cambio, la expresión diferencial de los transgenes ha sido atribuida por algunos autores a “efectos posicionales”, donde la posición del sitio de integración del ADN-T en el genoma receptor afecta el nivel de expresión del transgén. Sin embargo, otras investigaciones han indicado que otros factores, además -o más allá- de la posición del sitio de integración, contribuyen al nivel de expresión del transgén (Gelvin, 1998). Esto es particularmente cierto para los arreglos variables que las secuencias transgénicas pueden adquirir en el genoma receptor.

El ADN-T se puede integrar en el genoma receptor en patrones alternativos al de copia única en un único sitio. También pueden ocurrir múltiples copias o repeticiones invertidas y otros patrones complejos. La presencia de insertos de ADN-T multiméricos, especialmente estructuras repetidas invertidas, se correlaciona fuertemente con el fenómeno de silenciamiento del transgén (Gelvin, 1998).

La expresión variable de los transgenes o el silenciamiento génico es un fenómeno ubicuo en las plantas transgénicas, así hayan sido producidas por métodos de transformación directa o mediada por *Agrobacterium*. El silenciamiento génico puede ser el resultado de las interacciones entre las múltiples copias del transgén y genes endógenos relacionados, y está asociado con mecanismos basados en homología de secuencia que actúan tanto a nivel transcripcional como post-transcripcional (Matzke & Matzke, 1998). El silenciamiento que es resultado del impedimento de la iniciación de la transcripción está usualmente asociado a la metilación de las citosinas y/o a la condensación de la cromatina (Fagard & Vaucheret, 2000), mientras que el silenciamiento post-transcripcional (co-supresión) involucra una incrementada degradación del ARN en el citoplasma (Matzke & Matzke, 1998).

Una tercera categoría de silenciamiento ha sido propuesta para las consecuencias de los efectos posicionales, donde el ADN vegetal flanqueante y/o la localización cromosómica desfavorable ejercen un efecto de silenciamiento sobre el transgén (Matzke & Matzke, 1998). Acorde a Matzke & Matzke (1998), este tipo de silenciamiento refleja el estado epigenético de las secuencias endógenas flanqueantes al sitio de inserción o la tolerancia de regiones particulares del cromosoma para la inserción de ADN foráneo.

### **Bombardeo con micropartículas**

El bombardeo con micropartículas (también conocido como biobalística o aceleración de partículas) es una técnica usada para hacer llegar ADN en forma directa al genoma receptor, y se comprobó que es útil para la transformación de especies recalcitrantes a la infección por *Agrobacterium*. En resumen, el ADN plasmídico o lineal con el/los gen/es de interés se fija a partículas de tungsteno u oro (micropartículas o *microcarriers*), las cuales son impulsadas hacia las células receptoras a alta velocidad de modo que logren penetrar sus núcleos. Dentro del núcleo, el ADN se separa de la micropartícula y se integra al genoma receptor. El bombardeo con micropartículas se puede utilizar para transformar tejidos de la mayoría de las especies vegetales, sin embargo es relativamente ineficiente comparado con *Agrobacterium* para producir células vegetales transformadas en forma estable.

La transformación de tejidos vegetales por biobalística da como resultado patrones de integración de los transgenes que generalmente muestran: al transgén integrado en su longitud completa, rearrreglos del transgén que difieren en tamaño con el inserto de longitud completa, concatenación ocasional del plásmido introducido que lleva el transgén, y variación en el número de copias entre los elementos transgénicos de longitud completa y parcial (Pawlowski & Somers, 1996). El número de copias del transgén puede variar desde 1 hasta 20. Las copias múltiples usualmente co-segregan como un *locus* transgénico, indicando que las secuencias se han integrado en *loci* cercanamente ligados o en un único *locus*, en vez de haberse integrado aleatoriamente a lo largo de todos los cromosomas (Pawlowski & Somers, 1996).

La caracterización molecular de las plantas transgénicas obtenidas por bombardeo con micropartículas ha evidenciado grandes rearrreglos de las secuencias transgénicas (Pawlowski & Somers, 1996). Estos rearrreglos pueden observarse en análisis de Southern blot como

fragmentos de hibridación de tamaño distinto al inserto de longitud completa. Los fragmentos mayores son indicativos de concatenación (en la misma dirección o en dirección invertida). Los concatémicos de insertos de ADN se pueden deducir al digerir al ADN genómico con una enzima de restricción que corte en un único sitio dentro del elemento transgénico; entonces se resolverán múltiples copias del inserto de ADN por Southern blot. Los concatémicos se pueden formar por recombinación homóloga del ADN transformado o por ligación de extremos romos obtenidos a partir de extremos cohesivos producidos por una actividad exonucleasa limitada (Folger *et al.*, 1982 y Rohan *et al.*, 1990 en Pawlowski & Somers, 1996). Los fragmentos menores al de longitud completa son evidencia de deleciones o truncamientos.

Los fragmentos de ADN transgénico mayores al de longitud completa también pueden ocasionarse por intercalación del ADN insertado con ADN del receptor. Powlowski y Somers (1998) informaron que cada una de las 13 líneas de avena transformadas usando bombardeo con micropartículas tenía copias intactas del transgén, además de fragmentos múltiples, rearrreglos y/o transgenes truncados. Los sitios de inserción variaron entre 2 y 12, y todos los fragmentos de ADN transgénico cosegregaron. Los autores determinaron que el ADN transgénico estaba intercalado con ADN genómico receptor/endógeno. Este mismo fenómeno también ha sido informado para arroz (Cooley *et al.*, 1995).

## CASO DE ESTUDIO MON810

### Descripción del método de transformación

El ADN plasmídico se introdujo por el método de aceleración de partículas de Klein *et al.* (1987) en la línea Hi-II de maíz, derivada de las líneas endocriadas A188 y B73 (Armstrong *et al.*, 1991). Estas son líneas endocriadas públicas desarrolladas en EE.UU. por la Universidad de Minnesota y la Universidad Estatal de Iowa, respectivamente. El ADN plasmídico se precipitó sobre micropartículas de tungsteno u oro usando cloruro de calcio y espermidina. Una gota de las partículas recubiertas fue colocada sobre un proyectil (*macrocarrier*) plástico, el cual fue acelerado a alta velocidad a través del cañón de aceleración por la fuerza explosiva de una descarga de pólvora. Las células vegetales blanco fueron incubadas en un medio de cultivo de tejidos suplementado con 2,4-D para permitir el desarrollo de callos.

A pesar de que la solución de ADN utilizada para la transformación contenía genes codificantes para la tolerancia a glifosato (genes *cp4 epsps* y *gox*) que permiten la selección de las células transformadas en medios de cultivo adicionados con glifosato, estos genes no están presentes en las plantas MON810. La célula que dio origen a la línea MON810 fue probablemente un escape a la selección con glifosato. Las células en el entorno a la que originó MON810 pudieron haber degradado el glifosato disponible, permitiendo que la célula en cuestión sobreviviera. Las plantas fueron subsecuentemente regeneradas a partir de tejido de callo en ausencia de glifosato y fueron evaluadas para determinar la expresión de la proteína Cry1Ab.

### La construcción

La línea MON810 de maíz se obtuvo transformando el genotipo Hi-II de maíz con una solución de ADN que contenía dos plásmidos, PV-ZMBKO7 y PV-ZMGTI0. El plásmido PV-ZMBKO7 contiene el gen *cry1Ab* y el plásmido PV-ZMGTI0 contiene los genes *cp4 epsps* y *gox*. Ambos plásmidos contienen el gen *nptII* bajo el control de un promotor bacteriano necesario para la selección de las bacterias que contengan cualquiera de los dos plásmidos, y un origen de replicación del plásmido pUC (ori-pUC) necesario para la replicación del plásmido dentro de la bacteria. Una descripción de los elementos de ADN incluidos en PV-ZMBKO7 se encuentra en la Tabla 1. Aunque también se proveen los detalles del vector PV-ZMGTI0, ninguna de las secuencias de ADN provenientes de dicho vector están presentes en MON810.

Tabla 1. Resumen de los elementos genéticos del plásmido PV-ZMBK07

Elemento genético	Tamaño (kb)	Función
E35S	0,61	Promotor del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) (Odell et al 1985) con la región potenciadora (enhancer) duplicada (Kay et al 1985)
intron <i>hsp70</i>	0,80	Intrón del gen <i>hsp70</i> (proteína de choque térmico) del maíz para aumentar los niveles de transcripción (Rochester et al 1986)
<i>Cry1Ab</i>	3,46	Gen que codifica la proteína Cry1Ab idéntica a la natural (Fischloff et al 1987)
NOS 3'	0,26	Región 3' no traducida del gen de la nopalina sintasa que termina la transcripción y dirige la poliadenilación (Fraley et al 1983)
<i>lacZ</i>	0,24	Una secuencia codificante parcial del gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> , el promotor <i>P<sub>lac</sub></i> y la secuencia codificante parcial de la proteína beta galactosidasa de pUC119 (Yanisch-Perron et al 1985)
ori-pUC	0,65	Origen de replicación para el plásmido pUC que permite la replicación en <i>E. coli</i> (Vieira & Messing 1987)
<i>nptII</i>	0,79	Gen de la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II. Confiere resistencia a antibióticos aminoglicósidos y así permite la selección de bacterias que contienen el plásmido (Beck et al 1982)

**Vector PV-ZMBK07 de expresión en planta:** El vector plasmídico PV-ZMBK07 (7,794 pb; Fig. 1) contiene el gen *cry1Ab* proveniente de *B. thuringiensis* bajo el control del promotor potenciado del transcripto 35S del CaMV (*E35S*) (Kay et al., 1985; Odell et al., 1985), de aproximadamente 0,6 kb. Localizado entre el promotor *E35S* y el gen *cry1Ab*, se encuentra el intrón de 0,8 kb del gen *hsp70* (*heat shock protein*) de maíz, incluido para incrementar los niveles de transcripción del gen (Rochester et al., 1986). El intrón *hsp70* se encuentra seguido por el gen *cry1Ab* de 3,47 kb (Fischhoff et al. 1987). El gen *cry1Ab* está unido a la secuencia 3' no traducible de 0,27 kb del gen *nopalina sintasa*, 3' nos (Fraley et al., 1983), la cual provee la señal de poliadenilación del ARNm.

El gen *cry1Ab* tiene una longitud de 3.468 nucleótidos y codifica para la proteína Cry1Ab [B-t-k. HD-1] completa de 1156 aminoácidos (Fischhoff et al., 1987), la cual, al ser sometida a tripsina, da como producto una proteína activa resistente a tripsina de aproximadamente 600 aminoácidos en planta e *in vitro* (EPA MRID no. 43533203). La secuencia del gen *cry1Ab* fue modificada para aumentar los niveles de expresión en maíz (Perlak et al., 1991). El gen *cry1Ab* en la línea MON810 de maíz codifica para la proteína Cry1Ab idéntica a la de la naturaleza (Fischhoff et al. 1987). La secuencia aminoacídica deducida para la proteína Cry1Ab se encuentra en la Fig. 2.

La región alfa del gen *lacZ*, que codifica para la enzima beta-galactosidasa, se encuentra presente en el plásmido PV-ZMBK07 bajo el control de un promotor bacteriano. Esta región contiene un sitio de múltiple clonado (*polylinker*) que permite el clonado de los genes deseados dentro del vector (Vieira y Messing, 1987). La región alfa del gen *lacZ* está seguida por un origen de replicación plasmídico de 0,65 kb funcional en *E. coli* (Vieira y Messing, 1987).

A continuación de la región ori-pUC se encuentra el gen que codifica para la enzima neomicina fosfotransferasa tipo II (*nptII*). Esta enzima confiere resistencia contra antibióticos aminoglucósidos (por ej.: kanamicina y neomicina) y fue utilizado para la selección de bacterias transformadas durante la etapa de construcción del plásmido. La secuencia codificante del gen *nptII* deriva del transposón procariota Tn5 (Beck et al., 1982) y se encuentra bajo su propio promotor bacteriano.

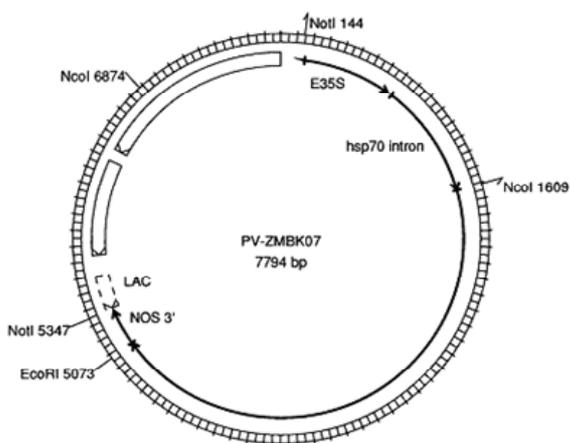


Fig. 1. Mapa del plásmido PV-ZMBK07. Se muestran los sitios de restricción (y sus localizaciones en pares de bases) usados en el análisis de Southern blot

1	MDNNPNINEC	IPYNCLSNPE	VEVLGGERIE	TGYTPIDISL	SLTQFLLSEF
51	VPGAGFVLGL	VDIIWGFIFG	SQWDAFLVQI	EQLINQRIEE	FARNQAIISRL
101	EGLSNLYQIY	AESFREWEAD	PTNPALREEM	RIQFNDMNNSA	LTTAIFLFAV
151	QNYQVPLLSV	YVQAANLHLS	VLRDVSVFQO	RWGFDAATIN	SRYNDLTRLI
201	GNYTDHAVRW	YNTGLERVWG	PDSRDWIRYN	QFRRELTLTV	LDIVSLFPNY
251	DSRTYPIRTV	SQLTREIYTN	PVLENFDGSF	RGSAAQIEGS	IRSPHLMNIL
301	NSITIYTDH	RGEYYWSGHQ	IMASPVGFSG	PEFTFPLYGT	MGNAAPQQRI
351	VAQLGQGVYR	TLSSSTLYRRP	FNIGINNQQL	SVLDTGTEFAY	GTSSNLPSAV
401	YRKSQTVDSL	DEIPPQNNV	PPRQGFSHRL	SHVSMFRSGF	SNSSVSIIRA
451	PMFSWIHRSA	EFNNIIPSSQ	ITQIPLTKST	NLGSQTSVVK	GPFTGGDIL
501	RRTSPGQIST	LRVNIPTAPLS	QRYRVIRIYA	STTNLQFHTS	IDGRPINQGN
551	FSATMSSGSN	LQSGSFRTVG	PTTFFNFNSG	SSVFTLSAHV	FNSGNEVYID
601	RIEFVPAEVT	FEAEYDLERA	QKAVNELFTS	SNQIGLTKDV	TDYHIDQVSN
651	LVECLSDFC	LDEKKELSEK	VKHAKRLSDE	RNLLQDPNFR	GINRLDRGW
701	RGSTDITIQG	GDDVFKENYV	TLLGTFDECY	PTYLYQKIDE	SKLKAYTRYQ
751	LRGYIEDSQD	LEIYLIRYNA	KHETVNVPGT	GSLWPLSAPS	PIGKCAHSH
801	HFSLDIDVGC	TDLNEDLGWV	VIFKIKTDQG	HERLGNLEFL	EGRAPLVGEA
851	LARVKRAEKK	WRDKREKLEW	ETNIVYKEAK	ESVDALFVNS	QYDRLQADTN
901	IAMIHAADKR	VHSIREAYLP	ELSVIPGVNA	AIFEELEGRI	FTAFSLYDAR
951	NVIRKNGDFN	GLSCWNVKGH	VDVEEQNNHR	SVLVVPWEA	EVSQEVRCPC
1001	GRGYILRVTA	YKEGYGEGCV	TIIHEIENNTD	ELKFSNCVEE	EYVPPNNTVTC
1051	NDYTATQEEY	EGTYTSRNRG	YDGAYESNSS	VPADYASAYE	EKAYTDGRDR
1101	NPCESTRGYG	DYTPLPAGYV	TKELEYFPET	DKVWIEIGET	EGTFIVDSVE
1151	LLLMEE				

Fig. 2. Secuencia de aminoácidos deducida de la proteína Cry1Ab.

**Vector PV-ZMG10 de expresión en planta:** Esta descripción de las funciones de las secuencias contenidas en PV-ZMG10 es netamente informativa, ya que ninguna de las secuencias génicas de este vector se ha detectado en MON810. El plásmido PV-ZMG10 contiene los genes *gox* y *cp4 epsps* fusionados a los péptidos señal de tránsito a cloroplasto *ctp1* y *ctp2*, respectivamente. Ambas regiones codificantes se encuentran bajo el control del promotor 35S potenciado, el intrón de *hsp70* de maíz y la secuencia terminadora 3' *nos*. El vector PV-ZMG10 contiene las mismas regiones alfa *lacZ*, *ori-pUC* y *nptII* descritas para PV-ZMBK07.

El gen *cp4 epsps* fue aislado de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 (Barry *et al.*, 1992) y se ha demostrado que tiene el potencial de otorgar alta resistencia a la inhibición por glifosato cuando se lo introduce en plantas (Padgett *et al.* 1993). El glifosato se une y bloquea la actividad de su enzima blanco, EPSPS, una enzima de la ruta biosintética de los aminoácidos aromáticos. La proteína CP4 EPSPS representa una de las tantas formas distintas de proteína EPSPS que se encuentran en la naturaleza (Schuls *et al.*, 1985). CP4 EPSPS es altamente tolerante a la inhibición por glifosato y tiene una alta eficiencia catalítica, comparada con la mayoría de las proteínas EPSPS (Barry *et al.*, 1992; Padgett *et al.*, 1993). Las células vegetales que expresan la proteína CP4 EPSPS son tolerantes al glifosato cuando se encuentra presente en los medios de crecimiento, ya que la acción continua de la enzima CP4 EPSPS logra cumplir la función necesaria para la síntesis de los aminoácidos aromáticos. El gen *cp4 epsps* no se encuentra presente en la línea MON810.

El gen *cp4 epsps* presente en PV-ZMG10 contiene un péptido de tránsito a cloroplasto, *ctp2*, aislado del gen *epsps* de *Arabidopsis thaliana* (Klee & Rogers, 1987), el cual dirige a la proteína CP4 EPSPS al cloroplasto, que es la localización de la proteína EPSPS en las plantas y el sitio de la síntesis de los aminoácidos aromáticos (Kishore and Shah, 1988). El gen *cp4 epsps* con su *ctp2* tiene una longitud aproximada de 1,7 kb. El *casete* del gen *cp4 epsps* (promotor hasta secuencia de terminación 3') está unido al *casete gox*.

El gen *gox*, que codifica para la enzima glifosato oxidoreductasa (GOX) que metaboliza al glifosato, fue clonado a partir de *Achromobacter* sp. (nuevo género *Ochrobactrum anthropi*) cepa LBAA (Hallas *et al.*, 1988; Barry *et al.*, 1992; Barry *et al.*, 1994). La proteína GOX se dirige a los plástidos con un péptido señal de tránsito a cloroplasto, *ctp1*. La secuencia *ctp1* deriva del gen que codifica para la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa (*ssu1a*) de

*Arabidopsis thaliana* (Timko *et al.*, 1988). La enzima GOX degrada el glifosato convirtiéndolo en ácido aminometilfosfónico (AMPA) y glioxilato (Padgett *et al.*, 1994). El gen *gox* no se encuentra en la línea MON810.

## Referencias

1. Arencibia, A.D., Carmona, E.R., Tellez, P., Chan, M.T. Yu, S.M., Trujillo, L.E. & Oramas, P. (1998). An efficient protocol for sugarcane (*Saccharum* spp. L.) transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* **7**, 1-10.
2. Armstrong, C.L., Green, C.E. & Phillips, R.L. (1991). Development and availability of germplasm with High Type II culture formation response. *Maize Genetics Corporation Newsletter* **65**, 92-93.
3. Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., Re, D., Eichholtz, D., Fincher, K. & Hallas, L. (1992). Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. pp. 139 - 145. In: *Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants*. Singh *et al.* (eds.). American Society of Plant Physiologists.
4. Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. & Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* **19**, 327-336.
5. Birch, R.G. (1997). Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 297-326.
6. Cheng, M, Fry, J.E., Pang, S.Z., Zhou, H.P., Hironaka, C.M., Duncan, D.R., Conner, W. & Wan, Y.C. (1997). Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiology* **115**, 971-980.
7. Cheng, XY, Sardana, R., Kaplan, H. & Altosaar, I. (1998). *Agrobacterium*-transformed rice expressing synthetic cry1Ab and cry1Ac genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc. of the Natl. Acad. of Sci.* **95**, 2767-2772.
8. Cooley, J., Ford, T. & Christou, P. (1995). Molecular and genetic characterization of elite transgenic rice plants produced by electric-discharge particle acceleration. *Theor. Appl. Genet.* **90**, 97-104.
9. Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-padrón, R.I., Prieto-sansonov, D.L., de la Riva, G.A. & Selman-Housein, G. (1998). Herbicide resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta* **206**, 20-27.
10. Enríquez-Obregón, G.A., Vázquez-Padrón, R.I., Prieto-Samsónov, D.L., Pérez, M. & Selman-Housein, G. (1997). Genetic transformation of sugarcane by *Agrobacterium tumefaciens* using antioxidant compounds. *Biotecnología Aplicada* **14**, 169-174.
11. EPA MRID no. 43533203. Lee, T.C., Bailey, M. & Sanders, P.R. .Compositional Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-I Protein Produced in ECB Resistant Corn and the Commercial Microbial Product, DIPEIXY., Study Number 94-01-39-12, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
12. Fagard, M. & Vaucheret, H. (2000). (Trans) gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 167-194.
13. Fischhoff, D. A., Bowdish, K.S., Perlak, F.J., Marrone, P.G., McCormick, S.M., Niedermeyer, J.G., Dean, D.A., Kusano-Kretzmer, K., Mayer, E.J., Rochester, D.E., Rogers, S.G. & Fraley, R.T. (1987). Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology* **5**, 807-813.
14. Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. & Woo, S.C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **80**, 4803-4807.
15. Gelvin, S.B. (1998). The introduction and expression of transgenes in plants. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 227-232
16. Hallas, L. E., Hahn, E. M. & Komdorfer, C. (1988). Characterization of microbial traits associated with glyphosate biodegradation in industrial activated sludge. *J. Industrial Microbiol.* **3**, 377-385.
17. Harrison, L.A., Bailey, M.R., Leirngruber, R.M., Smith, C.E., Nida, D.L., Taylor, M.L., Gustafson, M., Heeren, B. & Padgett, S.R. (1993). Characterization of microbially-expressed protein: CP4 EPSPS. Study Number 92-01-30-14, MSL-12901, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MWD no. 43643301.
18. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T. & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oriza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* **6**, 271-282.

19. Hooykaas, P.J.J. & Shilperoort, R.A. (1992). *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Molecular Biology* **19**, 15-38.
20. Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. & Kumashiro, T. (1996). High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature Biotechnology* **4**, 745-750.
21. Kay, R., Chan, A., Daly, M. & McPherson, J. (1985). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**, 1299-1302.
22. Kishore, G. & Shah, D. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Ann. Rev. Biochem.* **57**, 627-663.
23. Klee, H. J. & Rogers, S. G. (1987). Cloning of an Arabidopsis gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.* **210**, 437-442.
24. Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. & Sanford, J.C. (1987). High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids in living cells. *Nature* **327**, 70-73.
25. Kononov, M.E., Bassuner, B. & Gelvin, S.B. (1997). Integration of T-DNA binary vector "backbone" sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *The Plant Journal* **11**, 945-957.
26. Matzke, A.J.M. & Matzke, M.A. (1998). Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 142-148.
27. May, G.D., Afza, R., Mason, H.S., Wiecko, A., Novak, F.J. & Arntzen, C.J. (1995). Generations of transgenic Banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotechnology* **13**, 486-492.
28. Odell, J.T., Nagy, F. & Chua, N-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**, 810-812.
29. Perlak, F.J., Fuchs, R.L., Dean, D.A., McPherson, S.L. & Fischhoff, D.A. (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 3324-3328.
30. Powlowski, W.P. & Somers, D.A. (1996). Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Molecular Biotechnology* **6**, 17-30.
31. Powlowski, W.P. & Somers, D.A. (1998). Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 12106-12110.
32. Ramanathan, V. & Veluthambi, K. (1995). Transfer of non-T-DNA portions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid pTiA6 from the left terminus of TL-DNA. *Plant Molecular Biology* **28**, 1149-1154.
33. Rochester, D.E., Winer, J.A. & Shah, D.M. (1986). The structure and expression of maize genes encoding major heat shock protein hsp70. *EMBO J.* **5**, 451-458.
34. Schulz, A., Kruper, A. & Amrhein, N. (1985). Differential sensitivity of bacterial 5 enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases to the herbicide glyphosate. *FEMS Microbiology Letters* **28**, 297-301.
35. Tempe, J. & Schell, J. In: Translation of Natural and Synthetic Polynucleotides, A.B. Legocki, Ed. (Poznan University of Agriculture, Poznan, Poland, 1977) p.416.
36. Timko, M. P., Herdies, L., de Alarneida, E., Cashmore, A.R., Leemans, J. & Kreffers, E. (1988). Genetic engineering of nuclear-encoded components of the photosynthetic apparatus of Arabidopsis. In: The Impact of Chemistry on Biotechnology – A Multidisciplinary Discussion. ACS Books, Washington, DC. pp. 279-295.
37. Viera, J. & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Meth Enzymol.* **153**, 3-11.
38. Wenck, A., Czako, M., Kanevski, I. & Marton, L. (1997). Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Molecular Biology* **34**, 913-922.
39. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 Vectors. *Gene* **33**, 103-119.

## Capítulo 6 – Caracterización molecular del ADN insertado



Es necesaria una descripción detallada de las características moleculares de la planta modificada para demostrar que el obtentor ha analizado críticamente la planta y sus productos, incluyendo todos los genes y proteínas nuevas. Se usa la caracterización de una planta transgénica a nivel molecular para proveer información acerca de: la composición e integridad del ADN insertado; el número de copias del ADN insertado; el número de sitios de inserción; y el nivel de expresión de la(s) nueva(s) proteína(s) a lo largo del tiempo y en los diferentes tejidos. El conocimiento de los genes introducidos, o modificados, su regulación y el sitio de integración dentro del genoma receptor en el caso de las plantas transgénicas, puede brindar información sobre posibles consecuencias directas e indirectas de la modificación genética.

Por ejemplo, el potencial de que resulten efectos adversos debido a la activación o inactivación producidas por la inserción, puede evaluarse caracterizando el ADN receptor adyacente y evitando aquellos productos que contengan transgenes en la proximidad de genes endógenos que se sabe que afectan la producción de compuestos alergénicos o tóxicos potenciales. Por otro lado, la caracterización molecular de plantas transgénicas usualmente recibe una cantidad desproporcionada de atención por parte de los reguladores en relación a la información que imparte en términos de alimento humano, animal o seguridad ambiental. En parte, la razón de esto puede ser que la información generada a partir de los análisis moleculares es normalmente menos abierta a interpretaciones que la información suministrada para responder preguntas acerca de, por ejemplo, el impacto de una planta transgénica sobre la biodiversidad.

Mientras que la información sobre la integridad y el número de copias del ADN insertado es requerida normalmente por las autoridades regulatorias, no existe evidencia que sugiera que las plantas transgénicas que contienen múltiples copias del ADN insertado son menos “seguras” que las plantas similares que contienen sólo una única copia. Un ejemplo de un evento aprobado que contiene un alto número de copias lo representa una línea de canola (*Brassica napus*, evento 23-198, 23-18), la cual fue desarrollada introduciendo un gen codificante de tioesterasa proveniente del laurel californiano (*Umbellularia californica*) para aumentar los niveles de ácido láurico (12:0) y, en menor medida, ácido mirístico (14:0). Se estimó que el evento de transformación original 23 contenía 15 copias de los genes, en cinco loci genéticos independientes, tal como lo demostraron los análisis de Southern blot y de segregación.

Resulta importante enfatizar que, si bien es necesaria, la caracterización molecular del ADN introducido (o modificado) no es un medio suficiente para predecir posibles consecuencias imprevistas ni es un sustituto para las determinaciones directas de la expresión génica o cambios en el nivel de nutrientes y antinutrientes, tóxicos endógenos o posibles alérgenos.

Debido a su método de obtención, las plantas transgénicas resultan más sencillas para caracterizar genética y molecularmente en forma exhaustiva que otra planta obtenida por otros métodos de mejoramiento. En este sentido, es importante distinguir entre “**necesidad de conocer**” y “**curiosidad por conocer**” en el contexto de evaluación de seguridad. Este tema es de particular relevancia en Canadá, donde la regulación de alimentos nuevos y plantas con nuevas características incluye productos obtenidos por métodos de mejoramiento tradicional de los cuales no es factible suministrar información molecular detallada. En estos últimos ejemplos, resulta difícil argumentar que la evaluación de seguridad se haya visto afectada como consecuencia de una incompleta información sobre secuencias de ADN. En resumen, cuando se sigue un enfoque basado en el producto para la regulación y evaluación de riesgos, debería haber un estándar de evidencia comparable para la seguridad de los productos regulados en forma similar dado que éstos presentan riesgos equivalentes.

## CASO DE ESTUDIO MON810

### Materiales y Métodos

**Purificación de ADN:** El ADN de las líneas MON810 y control MON818 fue purificado de tejido foliar joven proveniente de plantas crecidas en invernadero a partir de semillas cosechadas de ensayos a campo (Sanders & Patzer, 1995). Las hojas jóvenes fueron retiradas de las plantas de ensayo, molidas en nitrógeno líquido, y mezcladas con aproximadamente 6 ml de solución tamponada (*buffer*) CTAB precalentada a 65°C [2.6%(p:p) sorbitol, 0.22 M Tris pH 8, 21 mM EDTA, 0.8 M NaCl, 22 mM CTAB, y 1% (p/v) N-laurilsarcosina]. Las muestras fueron incubadas 30 minutos a 60°C con inversión frecuente. Luego se separó por centrifugación, se extrajo el sobrenadante con fenol:cloroformo (1:1 v/v), cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se lo precipitó con isopropanol. Los precipitados de ADN se lavaron con etanol 70%, se secaron por vacío, y se resuspendieron en TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). El ADN fue tratado con RNasa, cuantificado y conservado a aprox. 4°C.

Se usaron aproximadamente 10-15 µg del ADN purificado de las líneas control y MON810 para la digestión con enzimas de restricción. El ADN plasmídico de PV-ZMBK07 y PV-ZMG TIO fue utilizado como estándares de referencia. Las digestiones fueron realizadas con enzimas de restricción adquiridas a la firma Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN).

**Preparación de la sonda de ADN:** Se prepararon sondas homólogas a las regiones genéticas *cry1Ab*, *cp4 epsps*, *gox*, *nptII*, y *ori-pUC* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o a partir de ADN plasmídico de PV-ZMBK07 y PV-ZMG TIO usando digestión con enzimas de restricción, separación en gel de agarosa y purificación (Gene Clean Kit, Bio 101, Vista, CA o QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Chatsworth, CA). Todas las sondas fueron marcadas radiactivamente con <sup>32</sup>P usando el método de cebadores al azar (*random priming*) (Prime-It® II Random Priming Kit, Stratagene, La Jolla, CA).

**Análisis de Southern blot:** Las muestras de ADN digeridas con enzimas de restricción fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa. Además de las muestras de ADN, dos marcadores de peso molecular (MPM) se mezclaron y corrieron en el gel y se agujerearon los sitios correspondientes a sus respectivas bandas. Luego de la transferencia, los agujeros fueron marcados con puntos de tinta indeleble y posteriormente con tinta marcada con <sup>35</sup>S, transfiriendo efectivamente los estándares de peso correcto. La calle que contenía las marcas de los MPM no fue incluida en las figuras. El ADN del gel de agarosa fue transferido en *buffer* SSC 20X a una membrana de nylon Hybond-N<sup>R</sup> (Amersham, Arlington Heights, IL) usando un Turboblotter (Schleicher & Schuell, Keene, NH). El ADN fue unido covalentemente a la membrana con un Stratalinker (Stratagene, La Jolla, CA). La membrana con el ADN transferido fue prehibridizada en 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 7% SDS, hibridizada con la sonda marcada radiactivamente durante 14-16 horas a aprox. 65°C y luego lavada con 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. Los tiempos usuales de exposición fueron 1-3 días.

### Resultados

El ADN de las plantas MON810 fue digerido con una variedad de enzimas de restricción y sometido a análisis de Southern blot para caracterizar el ADN que fue transferido al genoma del maíz durante el proceso de transformación. Específicamente, se examinó el número de insertos (número de sitios de integración dentro del genoma de maíz) y el número de copias e integridad de cada gen. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen del análisis de Southern blot del ADN genómico de MON 810

Elemento genético	Maíz MON810
<i>cry1Ab</i>	1 copia
gen CP4 EPSPS	ausente
<i>gox</i>	ausente
<i>nptII</i> – <i>ori pUC</i>	ausente

**Número de insertos:** Para determinar el número de insertos de ADN plasmídico en la línea MON810 de maíz, el ADN genómico se digirió con la enzima de restricción Nde I. Como los plásmidos PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 no contienen sitio de restricción para Nde I, esta enzima corta efectivamente por fuera de cualquier inserto, liberando un fragmento que contiene el ADN insertado más ADN genómico adyacente. El ADN de las líneas transgénica MON810 y control MON818 fue digerido con Nde I e hibridado con el ADN del plásmido PV-ZMBK07 como sonda. Los resultados se muestran en la Fig. 1. El ADN de MON818 (calle 1) produjo una banda muy tenue y difusa de aprox. 21,0 kb, la cual se asumió que era inespecífica, ya que está presente en el ADN de ambas líneas, MON818 y MON810. El ADN de MON810 produjo una banda de aprox. 5,5 kb (calle 2). Este resultado estableció que la línea de maíz MON810 protegida contra insectos contiene un fragmento de ADN integrado.

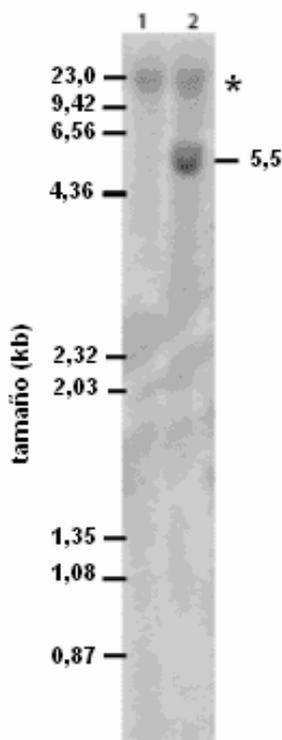


Fig.1. Análisis por Southern blot del ADN de MON 810. Los ADN genómicos del control MON 818 (calle 1) y del transgénico MON 810 (calle 2) se digirieron con *Nde*I e hibridaron con un fragmento de restricción marcado con  $^{32}$ P del plásmido PV-ZMBK07. Se indican los marcadores de peso molecular. El símbolo (\*) señala bandas inespecíficas (ruido de fondo).

### Composición del inserto

**Integridad del gen *cry1Ab*:** El ADN de MON818 y MON810 digerido con *Nco*I/*Eco*RI fue hibridado con una sonda del gen *cry1Ab*. Estos resultados se muestran en la Fig. 2, calles 1-3. El control positivo de hibridización produjo un único fragmento de 3,46 kb, correspondiente al tamaño esperado del gen *cry1Ab*. El ADN plasmídico no fue mezclado con el ADN de MON818, por ello es que la banda parece mayor que su verdadero peso molecular. El ADN de MON818 (calle 2) no produjo ninguna banda, como era de esperar para esta línea control. El ADN de MON810 (calle 3) produjo una única banda de aproximadamente 3,1 kb.

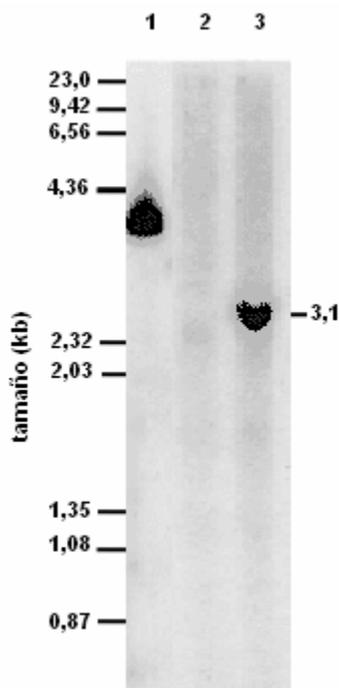


Fig. 2. Análisis por Southern blot del plásmido PV-ZMBK07 (calle 1), del ADN genómico del control MON818 (calle 2), o del transgénico MON810 (calle 3), digeridos con *Nco*I y *Eco*RI e hibridizados con una sonda marcada con  $^{32}$ P específica para el gen *cry1Ab*.

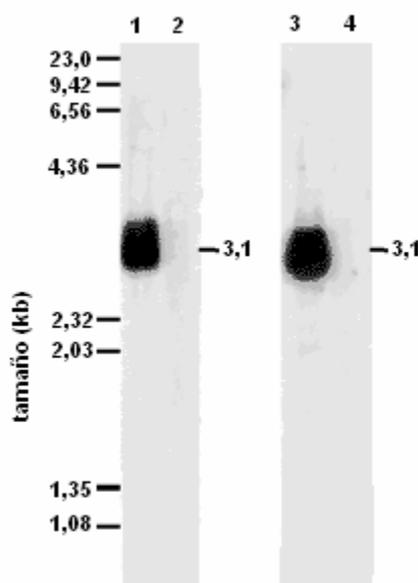


Fig. 3. Análisis por Southern blot de una mezcla de los plásmidos PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 (calles 1 y 3) y del ADN genómico de MON810 (calles 2 y 4), digeridos con *Nco*I y *Bam*HI e hibridado con una sonda marcada con  $^{32}$ P específica para el gen *CP4 EPSPS* (calles 1 y 2) o *gox* (calles 3 y 4).

**Integridad del gen *cp4 epsps*:** El ADN de los plásmidos PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 y el ADN genómico de MON810 fueron digeridos con *Nco*I/*Bam*HI e hibridados con una sonda del gen *cp4 epsps*. Los resultados se muestran en la Fig. 3, calles 1 y 2. Aproximadamente 50 pg de una mezcla de ADN de PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 (calle 1) produjo una banda de tamaño aproximado a 3,1 kb, lo cual corresponde al tamaño esperado para el fragmento *cp4 epsps* como se predice a partir del mapa del plásmido PV-ZMGT10 (Fig. 3). El ADN de MON810 (calle 2) no mostró señal de hibridación con la sonda *cp4 epsps*, permitiendo establecer que MON810 no contiene el gen *cp4 epsps*.

**Integridad del gen *gox*:** El ADN de los plásmidos PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 y el ADN genómico de MON810 fueron digeridos con *Nco*I/*Bam*HI e hibridados con una sonda del gen *gox*. Los resultados se muestran en la Fig. 3, calles 3 y 4. Aproximadamente 50 pg de una mezcla de ADN de PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 (calle 3) produjo una banda, un fragmento *Nco*I/*Nco*I de aproximadamente 3,1 kb, que corresponde al tamaño esperado para el fragmento *gox* como se predice a partir del mapa del plásmido. El ADN de MON810 (calle 4) no mostró señal de hibridación con la sonda *gox*, permitiendo establecer que MON810 no contiene el gen *gox*.

**Integridad del resto del plásmido vector:** Los ADN del plásmido PV-ZMBK07, de la línea control MON818, y de MON810, fueron digeridos con *Nco*I/*Eco*RI para liberar la secuencia del vector *nptII/ori-pUC* y luego se hibridizó con el gen *nptII* como sonda. Los resultados se muestran en la Fig. 4 (calles 1-3). Aproximadamente 50 pg de ADN de PV-ZMBK07 produjeron dos bandas de 2,5 y 1,8 kb (calle 1). Dichas bandas corresponden al tamaño esperado para las secuencias del vector PV-ZMBK07. El ADN de MON818 solo (calle 2) no produjo banda alguna, como se esperaba para la línea control no transformada. El ADN de MON810 (calle 3) no mostró bandas, permitiendo establecer que no se integraron secuencias del vector al genoma de MON810. El Southern blot *Nco*I/*Eco*RI fue enjuagado y vuelto a hibridar con una sonda correspondiente a la región genética de *ori-pUC*. El ADN combinado de PV-ZMBK07/PV-

ZMGT10 (calle 4) produjo una banda de 1,8 kb, correspondiente al tamaño esperado para el vector PV-ZMBK07. El ADN de MON818 solo (calle 5) no produjo banda alguna, como se esperaba para la línea control no transformada. El ADN de MON810 (calle 3) no hibridó con la sonda ori-pUC, permitiendo establecer que no se integraron secuencias del vector al genoma de MON810.

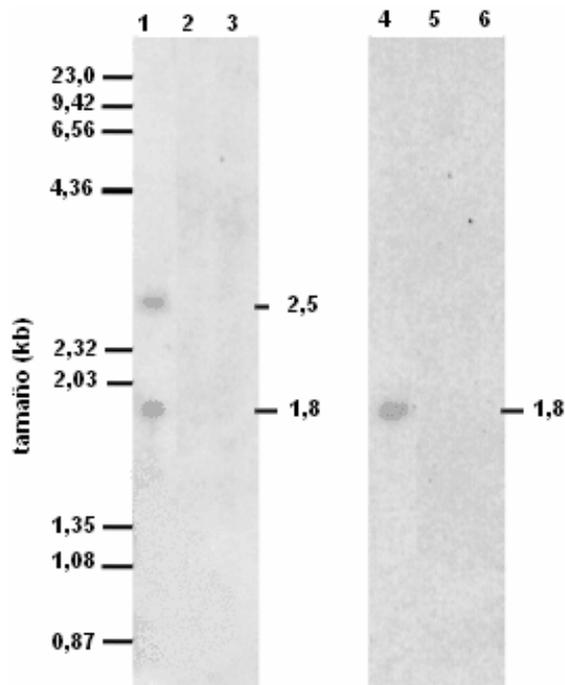


Fig. 4. Análisis por Southern blot del plásmido PV-ZMBK07 (calles 1 y 4), del ADN genómico del control MON 818 (calles 2 y 5) o del transgénico MON 810 (calles 3 y 6), digeridos con *Nco*I y *Eco*RI e hibridados con una sonda marcada con <sup>32</sup>P específica para la región *nptII* (calles 1-3) u *ori-pUC* (calles 4-6).

### Conclusiones

La línea de maíz MON810 se obtuvo por la tecnología de aceleración de partículas con una solución de ADN que contenía los genes *cry1Ab*, *cp4 epsps*, *gox* y *nptII*. La línea de maíz MON810 tiene una única copia de ADN integrado contenida en un fragmento de restricción con *Nde* I de aprox. 5,5 kb, el cual contiene el promotor *E35S*, el intrón *hsp70* de maíz y el gen *cry1Ab*.

### Referencias

1. Sanders, P.R. & Patzer, S.S. (1995). Compositional analyses of MON801 grain and silage from the 1993 and 1994 corn field trials. Study Number 94-01-39-08, an unpublished study conducted by Monsanto Company.

## Capítulo 7 – Estabilidad genética de la característica introducida



Se debe determinar la estabilidad y herencia de cada una de las características introducidas y que sean funcionales en la planta transformada. Para cada característica nueva, además del patrón y la estabilidad de la herencia, también debe demostrarse su nivel de expresión.

Generalmente se utilizan técnicas serológicas para medir la expresión de la característica tanto cualitativamente (por ej., Western blot, ELISA, etc.) como cuantitativamente (por ej., ELISA, radioinmunoensayos, etc). Si la característica nueva es de las que no producen como resultado una proteína nueva o modificada (por ej., plantas transgénicas que contienen secuencias antisentido insertadas, como el tomate Flavr Savr® que contiene una secuencia antisentido correspondiente al gen que codifica para la enzima poligalacturonasa), entonces su patrón de herencia deberá determinarse examinando directamente el ADN insertado o midiendo la producción del ARN transcrito.

### CASO DE ESTUDIO MON810

#### Análisis de segregación de MON810

En la Tabla 1 se presentan los datos de segregación de las plantas BC0F1 (derivadas de la cruce de R0 con una línea endocriada), BC1F1 (derivadas de la cruce de BC0F con la misma línea endocriada usada para cruzar con las plantas R0), y BC1F2 (derivadas de la cruce de plantas BC0FB individuales con una planta de prueba no transgénica y del posterior análisis de las generaciones subsiguientes por el sistema “espiga por surco” (ear to row). Los resultados son consistentes con un único inserto activo que segrega según la genética mendeliana.

Tabla 1. Datos y análisis segregacional de la progenie del maíz MON 810.

Generación	Real	Esperado	Chi cuad.
BC0F1 <sup>1</sup>	44:47	45,5:45,5	0,044*
BC1F1 <sup>2</sup>	10:4	7:7	1,786*
BC1F2 progenie <sup>3</sup>	69:181:77	81,75:163,5:81,75	4,138**

1. Los datos se presentan como el número de plantas que expresan la proteína:plantas que no la expresan, basados en ensayos de alimentación en barrenador europeo del maíz.

2. Los datos se presentan como el número de plantas que expresan la proteína:plantas que no la expresan, basados en ensayos de ELISA para Cry1Ab.

3. Los datos se presentan como el número de hileras en la espiga con plantas homocigotas para la expresión:número de hileras en la espiga con plantas segregantes:número de hileras en la espiga con plantas homocigotas susceptibles, basados en el ensayo de alimentación en barrenador europeo del maíz.

\*No significativo, p=0,05 (Chi cuad 3,84, 1 grado de libertad)

\*\*No significativo, p=0,05 (Chi cuad 5,99, 2 grados de libertad)

El gen *cry1Ab* en la línea de maíz MON810 demostró ser estable a través de siete generaciones de cruzamientos con un parental recurrente (B73) y seis generaciones de cruzamientos con una segunda línea endocriada no relacionada (Mo17) (Tabla 2). Las pruebas estadísticas de chi cuadrado para las retrocruzas con B73 y con Mo17 no mostraron desviaciones con respecto a los valores esperados con un valor p = 0,05.

Tabla 2. Estabilidad de la transferencia génica basada en los datos de segregación para los derivados de las retrocruzas de MON 810 en dos líneas híbridas no relacionadas (B73, Mo17).

Generación	Real	Esperado	Chi cuad
BC6F1(B73) <sup>1</sup>	8:13	10,5:10,5	0,762*
BC5F1(Mo17) <sup>1</sup>	11:11	11:11	0,045*

1. Los datos se presentan como el número de plantas que expresan la proteína:número de plantas que no la expresan, basados en el ELISA para Cry1Ab. \*No significativo, p=0,05 (chi cuad=3,84, 1 grado de libertad).

## Conclusión

Los datos de segregación y estabilidad (Tablas 1 y 2) son consistentes con un único sitio activo de inserción para el gen *cry1Ab* en el ADN genómico de la línea MON810 de maíz. La estabilidad de esta inserción se ha demostrado a través de siete generaciones de cruzamientos.

## Estabilidad del integrón

Con el fin de demostrar la integración estable del gen *cry1Ab* en MON810 y su progenie, se analizó por Southern blot el ADN de dos conjuntos de plantas MON810, que representaban tres generaciones (Fig.1).

Se utilizaron muestras de hoja de dos conjuntos de plantas MON810 para evaluar la estabilidad del ADN insertado por medio del análisis de Southern blot (Southern, 1975). El maíz MON810 plantado en los ensayos a campo de 1994, lote de semillas MON81000 (calle 3), representa la generación F1 de cruzamiento con B73. El maíz MON810 plantado en los ensayos a campo de 1995, lote de semillas MON81010 (calle 4), era un híbrido obtenido por cruzamientos adicionales (F4). La línea control no transgénica, MON 820 (lote de semillas MON 82010) fue corrida junto con los plásmidos de transformación (calle 1, como marcador de peso molecular y control de hibridación) y solo (calle 2) como control. Las muestras de ADN de maíz fueron digeridas con las enzimas de restricción *NcoI/EcoRI* e hibridadas con una sonda correspondiente a una porción del gen *cry1Ab*.

El ADN de MON 820 más los plásmidos (calle 1) muestra el fragmento *cry1Ab* de 3,46 kb tal como se encuentra presente en el plásmido de transformación. El ADN de control solo (calle 2) muestra dos bandas tenues de fondo debidas a hibridación inespecífica (indicadas con asteriscos). Ambas muestras de ADN MON810 (calles 3 y 4), representantes de distintas líneas de cruzamientos, contienen el mismo fragmento *NcoI/EcoRI cry1Ab* de 3,1 kb. (Kania *et al.*, 1995).

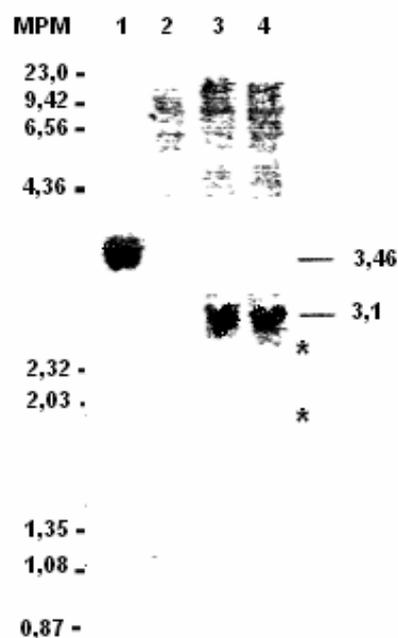


Fig. 1. Análisis por Southern blot de MON810. Las calles 1-4 contienen las siguientes muestras de ADN digeridas con *NcoI/EcoRI* e hibridadas con el gen *Cry1Ab*: ADN de MON82010 con ~15 pg de PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10 (calle 1); ADN de MON82010 (calle 2); ADN de MON81000 (calle 3); ADN de MON 81010 (calle 4).

## Conclusión

Este análisis por Southern blot demuestra que la integración de *cry1Ab* fue estable a través de tres generaciones de cruzamientos de MON810.

## Referencias

1. Kania, J., Keck, P.J., Levine, E. & Sanders, P.R. (1995). Molecular analysis of insect-protected corn line MON 810. Report Number MSL-14382, an unpublished technical report by Monsanto Company.
2. Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.



## Capítulo 8 – Material expresado / efecto

La identificación del riesgo requiere el conocimiento de los genes introducidos, de las características, concentración y localización de los productos expresados, y las consecuencias de dicha expresión.

En los casos en que el resultado de la modificación es la expresión de una nueva proteína, o polipéptido, este material debe ser caracterizado en cuanto a: identidad, funcionalidad, y, cuando corresponda, similitud con productos de fuentes tradicionales.

La concentración de la nueva proteína expresada en los tejidos de la planta transgénica puede ser muy baja, muchas veces menos del 0,1% del peso seco. Ciertos estudios, tales como la evaluación de toxicidad aguda, que requieren relativamente grandes cantidades de material, suelen no ser factibles al utilizar la proteína purificada a partir de los tejidos de la planta. En reemplazo, dichos estudios utilizan normalmente la proteína purificada a partir de sistemas de producción bacterianos. En esos casos, es necesario demostrar la equivalencia funcional (es decir, propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas equivalentes) de las proteínas purificadas de las dos fuentes. Cuando se demuestra la equivalencia en base a estudios de reactividad serológica cruzada, es importante usar antisueros (policlonales o monoclonales) cuya especificidad haya sido bien caracterizada.

La posibilidad de modificaciones postraduccionales (por ej., glicosilación) en sistemas eucariontes también debe ser considerada, ya que puede afectar el potencial alergénico.

En los casos en los cuales la modificación resulte en la expresión de un transcrito de ARN no traducible nuevo, se deberá establecer la sensibilidad y especificidad de la acción deseada. Ejemplos de ello incluyen la producción de ARNm antisentido u otras especies de ARN que resultan en la producción reducida de una proteína endógena (por ej., plantas transgénicas que contienen secuencias antisentido insertadas). Al evaluar la seguridad de la planta modificada se deberán investigar alteraciones en la regulación o la expresión de genes endógenos no blanco.

### CASO DE ESTUDIO MON810

#### Ensayos a campo

En 1994 y 1995 se realizaron ensayos a campo de MON810 en localidades de las principales regiones maiceras de EE.UU. Italia y Francia. La identidad y los niveles de expresión de la proteína Cry1Ab en las muestras de tejidos vegetales colectados en estos sitios fue determinada por la técnica de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) (Ledesma *et al.*, 1995).

**Ensayos a campo en Estados Unidos:** En 1994, los ensayos a campo se realizaron en seis localidades distribuidas a lo largo de la principal región maicera, representando una variedad de condiciones ambientales (Sanders *et al.*, 1995). De cada sitio se colectaron muestras de MON810 y de la línea control, MON818. Los niveles de las proteínas Cry1Ab, CP4 EPSPS y GOX fueron evaluados en los tejidos de maíz por ensayos de ELISA validados y específicos para cada proteína (Tabla 1; Ledesma *et al.*, 1995; Davies & Sanders, 1995; Elswick, 1995). Las plantas enteras se colectaron dos semanas luego de la polinización. Las hojas jóvenes se recolectaron tres veces, con intervalos de dos semanas para estimar los niveles de expresión durante la campaña de cultivo (expresión foliar a lo largo de la campaña). Debido a que el gen *nptII* se encuentra bajo el control de un promotor específico bacteriano y que la falta de su expresión se había demostrado previamente para MON801 en 1993 (Davies, 1995), no se realizaron estudios más detallados para la proteína NPTII en 1994.

Tabla 1. Resumen de los niveles de proteínas específicas en tejidos de MON810 cosechados en los ensayos de campo de Estados Unidos en 1994<sup>1,2</sup>

Proteína	Hoja a lo largo de la campaña						
	Hoja	Grano	Planta <sup>3,4</sup>	Polen <sup>3</sup>	1°	2°	3°
Cry1Ab	9,35	0,31	4,15	0,09	9,78	8,43	4,91
CP4EPSPS	ND <sup>5</sup>	ND	ND	NA <sup>6</sup>			
GOX	ND	ND	ND	NA			
NPTII	NA	NA	NA	NA			

1. Las medias se calcularon del análisis de seis muestras vegetales, una de cada uno de los seis ensayos, a menos que se indique lo contrario
2. Todos los valores se expresan como µg de proteína/g de peso fresco
3. Las medias se calcularon del análisis de muestras vegetales de un sitio
4. Las medias se calcularon del análisis de dos muestras réplica de un sitio.
5. No detectado
6. No analizado

Los niveles de expresión de la proteína Cry1Ab en la línea MON810 de maíz fueron bajos en relación a la proteína total en hoja, grano y planta entera, pero resultó suficiente para otorgar control contra el barrenador europeo del maíz durante toda la campaña. Los mayores niveles de proteína se encontraron en hoja con 9,35 µg de Cry1Ab por gramo de peso fresco (pf), en comparación con 0,31 µg proteína/g pf en grano y 4,15 µg de la proteína/g pf en la planta completa (los rangos fueron: Cry1Ab 7,93-10,34 µg/g pf en hoja joven, 3,65-4,65 µg/g pf en planta entera y 0,19-0,39 µg/g pf en grano cosechado). Estos valores equivalen a 0,020, 0,0004 y 0,026% de la proteína por peso seco en hoja, grano y planta entera, respectivamente. La expresión de la proteína Cry1Ab en el polen estuvo apenas por encima del límite de detección (0,08 µg de la proteína/g pf). La expresión de la proteína Cry1Ab en la hoja se mantuvo alta durante los estadios de desarrollo vegetativo de la planta de maíz, tal como se detectó en los análisis de las muestras de hojas a lo largo de la campaña.

Las proteínas CP4 EPSPS y GOX no se detectaron en hoja, grano o planta entera de maíz cuando se evaluó por la técnica de ELISA. El análisis molecular de la línea MON810 de maíz también había confirmado la ausencia de los genes *cp4 epsps* y *gox* y de secuencias de *gox* y de *nptII*. Debido a que el gen *nptII* se encuentra bajo el control de un promotor específico bacteriano, el análisis de la proteína NPTII no se llevó a cabo.

**Ensayos a campo en Europa:** En 1995 se realizaron cinco ensayos a campo en las principales regiones maiceras de Francia e Italia. Las localidades comprendieron un rango de condiciones ambientales y de desafío por infestación con insectos plaga importantes agrónomicamente. Se colectaron muestras de plantas de MON810 y de la línea control, MON820. Se colectaron muestras de hojas jóvenes en todas las localidades; las muestras de forraje y grano se colectaron de todos los sitios excepto de Mogliano Veneto TV, que fue prematuramente destruido. En el diseño de ensayo de 1995, se colectó forraje más que plantas enteras, ya que el forraje se utiliza como alimento para animales. El forraje fue cosechado en estadio de grano pastoso. Los niveles de expresión de las proteínas Cry1Ab, CP4 EPSPS y GOX se evaluaron en las plantas de maíz usando ELISAs validados específicos para cada proteína, y se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los niveles de proteínas específicas en tejidos de MON810 cosechados en ensayos europeos en 1995<sup>1</sup>.

		Proteína ( $\mu\text{g/g}$ peso fresco)		
		Cry1Ab	CP4 EPSPS <sup>2</sup>	GOX <sup>2</sup>
Hoja	media <sup>3</sup>	8,60	ND <sup>4</sup>	ND
	rango <sup>5</sup>	7,59-9,39	NA <sup>6</sup>	NA
Forraje <sup>7</sup>	media	6,08	ND	ND
	rango	4,21-9,23	NA	NA
Grano <sup>8</sup>	media	0,53	ND	ND
	rango	0,42-0,69	NA	NA

1. Todos los valores se expresan como  $\mu\text{g}$  de proteína/g de peso fresco
2. El análisis molecular demostró que los genes CP4epsps y gox no están presentes en MON810
3. Las medias se calcularon del análisis de una muestra combinada (pool) de 5 sitios
4. No detectado
5. El rango indica los valores máximos y mínimos del análisis de las muestras de 5 sitios.
6. No aplicable. Como la proteína no se detecta, no hay rango.
7. La media y el rango se calcularon del análisis de dos plantas combinadas (pool) de 4 sitios

Los niveles de la proteína Cry1Ab oscilaron entre 7,59 – 9,39  $\mu\text{g/g}$  pf en hoja joven, 4,21-9,23  $\mu\text{g/g}$  en forraje y 0,42-0,69  $\mu\text{g/g}$  en grano cosechado. Las proteínas CP4 EPSPS y GOX no se detectaron en los tejidos de las plantas MON810. Los niveles de la proteína Cry1Ab en estos tejidos son similares a los obtenidos en las plantas crecidas en los ensayos a campo en EE.UU. y Europa durante dos generaciones sucesivas. Los ensayos a campo se realizaron tanto en Italia como en Francia, para producir muestras de hojas, forraje y grano para los análisis de expresión de los híbridos de maíz protegidos contra insectos. Los cinco híbridos de maíz fueron desarrollados cruzando el evento MON810 con líneas endocriadas comerciales. Se usaron versiones no modificadas de los mismos híbridos como controles. Las muestras de hoja se colectaron solo de Italia, mientras que las muestras de forraje y grano se colectaron de ambos sitios. Los niveles de proteína Cry1Ab en las muestras de maíz se evaluaron usando ELISA validado (Tabla 3). Los ELISAs para las proteínas CP4 EPSPS y GOX no se realizaron ya que los genes correspondientes no están presentes en la línea MON810 (la ausencia de estas proteínas fue confirmada en los ensayos a campo previos (Tablas 1 y 2)). Los ensayos a campo fueron autorizados con los permisos N° B/IT/95-23 y 95.03.06 de Italia y Francia, respectivamente. El nivel de la proteína Cry1Ab en la progenie de MON810 osciló entre 8,20-10,51  $\mu\text{g/g}$  pf en hoja joven, 4,00-5,11  $\mu\text{g/g}$  en forraje y 0,35-0,60  $\mu\text{g/g}$  en grano cosechado. Los niveles de la proteína Cry1Ab son similares a los de las plantas derivadas de MON810 por retrocruzadas con B73/Mo17 (Tablas 1 y 2) e híbridos comerciales (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los niveles de la proteína Cry1Ab en tejidos de la progenie de MON810 crecida en los ensayos europeos de 1995<sup>1</sup>

		Proteína Cry1Ab ( $\mu\text{g/g}$ peso fresco)
		Hoja
	rango <sup>3</sup>	8,20-10,51
Forraje <sup>4</sup>	media	4,52
	rango	4,00-5,11
Grano <sup>5</sup>	media	0,46
	rango	0,35-0,60

1. Cinco híbridos plantados en dos sitios. Todos los valores se expresan como  $\mu\text{g}$  de proteína/g de peso fresco.
2. Las medias se calcularon del análisis de alícuotas de muestras combinadas de un sitio en Italia.
3. El rango indica los valores máximos y mínimos del análisis de las muestras de un sitio en Italia.
4. La media y el rango se calcularon del análisis de una o dos plantas colectadas en ambos sitios.
5. La media y el rango se calcularon del análisis de muestras combinadas de granos colectadas en ambos sitios.

## Conclusión

El nivel de la proteína Cry1Ab en las plantas MON810 es similar cuando las plantas se cultivan en distintas condiciones geográficas, y cuando el gen está presente en diferentes fondos genéticos. El nivel de expresión se mantiene constantemente alto como para otorgar control contra los insectos blanco plaga a lo largo de la campaña.

## Análisis por Western blot

### Metodología para la evaluación de la proteína Cry1Ab:

Las muestras para la evaluación de la proteína Cry1Ab se prepararon a partir de tejido foliar (1,0g) moliéndolo en nitrógeno líquido y posteriormente homogeneizándolo en 5 ml de bicarbonato de sodio 0,1 M pH 10,01 con 2-mercaptoetanol 10mM, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 1 mM benzamidina-HCl, 0,5 mM PMSF, 1µg/ml pepstatina A, 40 µg/ml bestatina, 1mM CWS y 10% (v/v) glicerol. Luego de una centrifugación (20.000 g x 15 min) para remover los desechos celulares, una alícuota de 2,5 ml de la solución del sobrenadante fue desalada por cromatografía de exclusión en gel de Sephadex PD-10 (Farmacia). El volumen de exclusión fue concentrado 4-5 veces usando un microconcentrador Centricon 30 (Amicon) y un volumen de 100 µl de la solución concentrada fue combinado 1:1 con una mezcla para muestra en SDS-PAGE, desnaturizado por calor (5 min a 100°C), y sometido a electroforesis utilizando el método de Laemmli (1970).

La tripsinización de las alícuotas de 200 µl de cada extracto (ver más arriba) fue iniciada con la adición de 7 µl de una solución de tripsina pancreática bovina (5 mg/ml en 50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM CaCl<sub>2</sub>) tratada con TPCK (N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona). Las muestras se incubaron durante ~18 horas y luego se inactivó la reacción con 1,25 µl de PMSF 200 mM. Alícuotas (50 µl) de cada extracto fueron combinadas 1:1 con una mezcla para muestra en SDS-PAGE, desnaturizadas por calor (5 min a 100°C), y sometidas a electroforesis utilizando el método de Laemmli (1970).

Las muestras para el análisis de las proteínas GOX y CP4 EPSPS fueron preparadas por homogenización de tejido foliar joven en una solución tamponada [100 mM Tris, 100 mM borato de sodio, 5 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7.8, 0.5% (v/v) Tween-20, y 0.2% (w/v) L-ácido ascórbico], seguida por centrifugación (como se indicó más arriba) para remover los desechos celulares. Alícuotas (50 µl) del sobrenadante fueron sometidas a SDS-PAGE como se describe más arriba.

Las proteínas separadas fueron electro-transferidas a una membrana de PVDF (polivinilideno difluoruro) (Immobilon, Millipore Corp.) y los sitios de unión de proteínas no específicos fueron posteriormente bloqueados por incubación con una solución TBST (0.1 M Tris base, 10 mM borato de sodio, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20) adicionada con 5% (v/v) de leche en polvo descremada (1 hora, temperatura ambiente). La membrana con las proteínas transferidas fue incubada secuencialmente con antisuero de conejo contra la proteína Cry1Ab expresada en *E. coli* (1:1000) y con anticuerpos de burro conjugados a fosfatasa alcalina contra IgG de conejo (1:1000; Jackson Immunoresearch). El anticuerpo unido fue visualizado usando el sistema de sustrato colorimétrico NBT/BCIP (Promega).

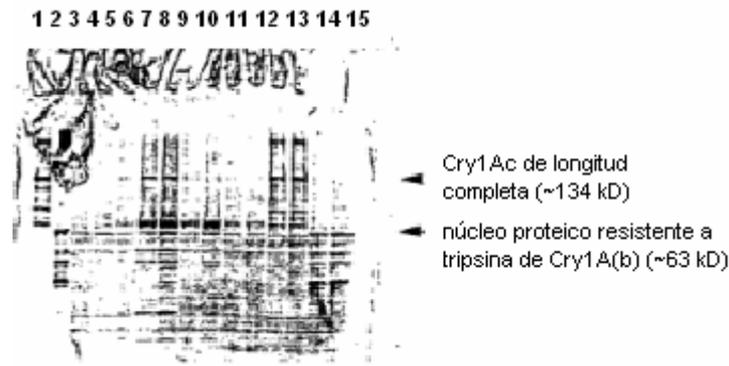


Fig. 1. Análisis de Western blot de la proteína Cry1Ab en extractos de tejidos de maíz. Proteína completa Cry1Ac producida en *E. coli*, ~20 ng (calle 1); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng (calle 2); extracto proteico de hoja de MON 818, ~28 µg (calle 3); extracto proteico de hoja de MON 819, ~24 µg (calle 4); extracto proteico de hoja de MON 801, ~39 µg (calle 5); extracto proteico de hoja de MON 802, ~25 µg (calle 6); extracto proteico de hoja de MON 805, ~32 µg (calle 7); extracto proteico de hoja de MON 809, ~26 µg (calle 8); extracto proteico de hoja de MON 810, ~26 µg (calle 9); extracto proteico de hoja de MON 813, ~27 µg (calle 10); extracto proteico de hoja de MON 814, ~20 µg (calle 11); proteína completa Cry1Ac producida en *E. coli*, ~20 ng agregados a ~19 µg de extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 12); proteína completa Cry1Ac producida en *E. coli*, ~20 ng agregados a ~16 µg de extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 13); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng, agregados a ~19 µg de extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 14); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng, agregado a 16 µg de extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 15).

## Resultados

**Proteína Cry1Ab:** El perfil para la proteína Cry1Ab proveniente de extractos foliares no tripsinizados de siete líneas de maíz protegido contra insectos fue comparado con un estándar Cry1Ac de longitud completa (~134 kD) y con un estándar correspondiente al núcleo proteico resistente a tripsina de Cry1A(b) (~63 kD) (Fig. 1). Se utilizó el estándar Cry1Ac de longitud completa porque es aproximadamente del mismo tamaño que la proteína Cry1Ab de tamaño completo (131 kD) y produce reacción cruzada con el mismo anticuerpo (Lee *et al.*, 1995b). Dos líneas control, MON818 y MON 819, fueron incluidas para representar el fondo genético de las siete líneas del ensayo. Se observaron bandas inespecíficas menores en los extractos correspondientes a las dos líneas control, MON818 y MON 819 (calles 3 y 4). Sin embargo, estas bandas inespecíficas se observaron en los extractos foliares de todas las líneas de maíz (protegidas contra insectos y controles).

Para las líneas MON801, MON802, MON805, y MON809 se observó una banda concordante con la forma de longitud completa en el sitio de peso molecular esperado (~131 kD) (calles 5-8). La línea MON810 contiene un gen *cry1Ab* menor al de longitud completa y por lo tanto no muestra un producto proteico de 131 kD (calle 9, Kania *et al.*, 1995). Del mismo modo que comúnmente se observa en los análisis por Western blot de proteínas provenientes de B.t.k. (Lee *et al.*, 1995b), se observaron múltiples productos proteicos inmunoreactivos para las líneas de maíz protegido contra insectos (calles 5-11). No hubo diferencias aparentes en el rango de tamaños de los productos proteicos menores al de longitud completa observados en las siete líneas de maíz protegido contra insectos producidas con el mismo gen *cry1Ab* de longitud completa (calles 5-11).

Para los extractos tripsinizados, se observaron bandas inmunoreactivas menores en los extractos de ambas líneas control, MON818 y MON 819 (Fig. 2, calles 3 y 4). Sin embargo, estas bandas inespecíficas se observaron para los extractos foliares de la mayoría de las líneas de maíz (protegidas contra insectos y controles). Las siete líneas transgénicas mostraron el núcleo proteico resistente a tripsina a la altura de ~63 kD (Fig. 2, calles 6-12), luego del tratamiento con tripsina, como se informó anteriormente (Lee & Bailey, 1995). En la totalidad de las siete líneas transgénicas evaluadas no se observaron diferencias cualitativas detectables en los extractos tratados con tripsina.

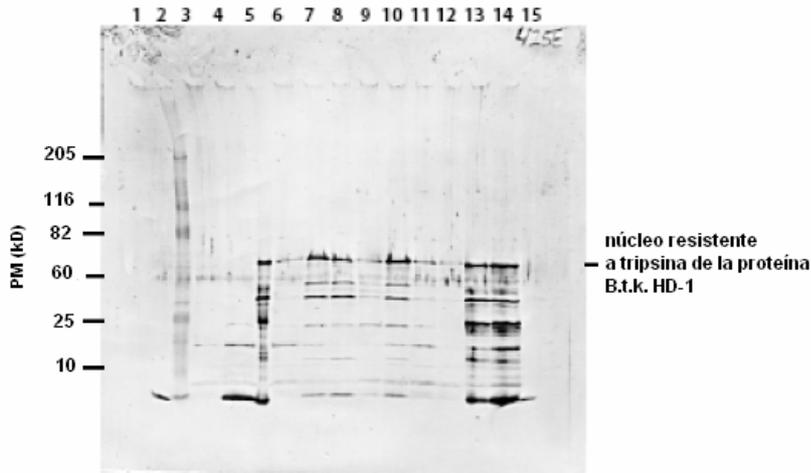


Fig. 2. Análisis por Western blot de las proteínas Cry1Ab tripsinizadas de extractos de tejidos de maíz. Calle en blanco, 1X SeptraSol (calle 1); marcadores de peso molecular coloreados de Sigma (calle 2); extracto proteico de hoja de MON 818, tripsinizado (calle 3); extracto proteico de hoja de MON 819, tripsinizado (calle 4); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab *producida en E. coli*, ~20 ng (calle 5); extractos tripsinizados de las líneas MON 801, 802, 805, 809, 810, 813, y 814 (calles 6-12, respectivamente); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab *producida en E. coli*, ~20 ng, agregado al extracto MON 818 (calle 13); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab *producida en E. coli*, ~20 ng, agregado al extracto de MON 819 (calle 14); calle en blanco, 1X SeptraSol (calle 15). No se determinó la carga/calle de proteínas para los extractos. Se cargaron ~7.5 µl de cada extracto de maíz en un volumen total de ~15 µl (calles 3-4, 6-12). Cuando se agregaron a estándares (calles 13-14), se emplearon ~5 µl del extracto de la línea de maíz control (MON 818 y MON 819) en ~10 µl de volumen total.

**Proteína CP4 EPSPS:** Los extractos de tejido foliar joven de las siete líneas de maíz protegido contra insectos fueron comparados con un estándar de la proteína CP4 EPSPS *producida en E. coli* (Fig. 3). No se observaron bandas para los extractos provenientes de cualquiera de las líneas control, MON818 y MON 819 (calles 5 y 6). No se detectó la proteína CP4 EPSPS para la línea de maíz MON 814 (calle 7). Los extractos proteicos de tejido foliar joven de las líneas MON813, MON809, MON805, MON802 y MON801 mostraron el producto proteico de CP4 EPSPS esperado de 47,6 kD en comparación con el estándar de proteína CP4 EPSPS purificada (calles 8, 10-14). La línea de maíz MON810 no contiene el gen *cp4 epsps* y por lo tanto no expresa la proteína CP4 EPSPS (calle 9) (Kania *et al.*, 1995).

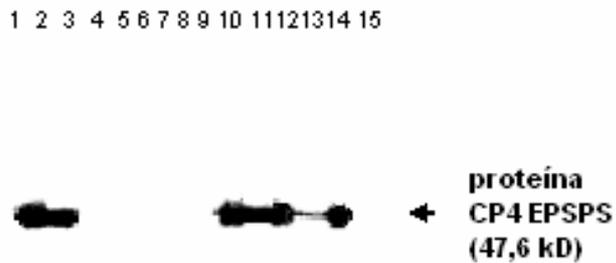


Fig. 3. Análisis por Western blot de la proteína CP4 EPSPS en extractos de tejidos de maíz. Marcadores de peso molecular coloreados de Sigma (calle 1); ~20 ng de la proteína CP4 EPSPS *producida en E. coli* agregada al extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 2); ~20 ng de la proteína CP4 EPSPS *producida en E. coli* agregada al extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 3); en blanco (calle 4); extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 5); extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 6); extracto proteico de hoja de MON 814 (calle 7); extracto proteico de hoja de MON 813 (calle 8); extracto proteico de hoja de MON 810 (calle 9); extracto proteico de hoja de MON 809 (calle 10); extracto proteico de hoja de MON 805 (calle 11); extracto proteico de hoja de MON 802 (calle 12); extracto proteico de hoja de MON 801 (calle 13); ~20 ng de la proteína CP4 EPSPS *producida en E. coli* (calle 14); Marcadores de peso molecular coloreados de Sigma (calle 15).

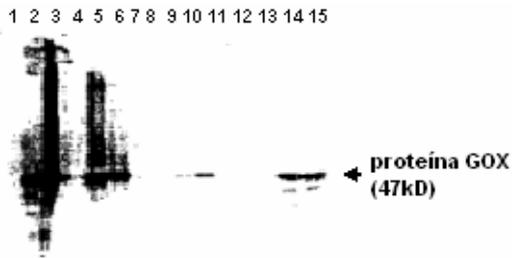


Fig. 4. Análisis por Western blot de la proteína GOX en extractos de tejidos de maíz. Marcadores de peso molecular coloreados de Sigma (calle 1); ~20 ng de la proteína GOX producida en *E. coli* (calle 2); proteína GOX aislada de la línea de maíz 423-06-01 (calle 3); extracto proteico de hoja de MON 801 (calle 4); extracto proteico de hoja de MON 802 (calle 5); extracto proteico de hoja de MON 805 (calle 6); extracto proteico de hoja de MON 809 (calle 7); extracto proteico de hoja de MON 810 (calle 8); extracto proteico de hoja de MON 813 (calle 9); extracto proteico de hoja de MON 814 (calle 10); extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 11); extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 12); en blanco (calle 13); proteína GOX producida en *E. coli*, ~20 ng, agregada a un extracto proteico de hoja de MON 818 (calle 14); proteína GOX producida en *E. coli*, ~20 ng, agregada a un extracto proteico de hoja de MON 819 (calle 15).

**Proteína GOX:** Los extractos de tejido foliar joven de las siete líneas de maíz protegido contra insectos fueron comparados con un estándar de la proteína GOX producida en *E. coli* (Fig. 4). Los extractos proteicos de las líneas de maíz MON802, MON805, MON813 y MON814 (calles 5, 6, 9 y 10) mostraron el producto proteico esperado de 47 kD en comparación con el estándar proteico GOX purificado (calles 2, 14 y 15). La proteína GOX no se detectó en las líneas de maíz MON801, MON809 y MON810 (calles 4, 7 y 8). El nivel de proteína GOX en las hojas de la línea de maíz MON801 está por debajo del límite de detección para los análisis de Western blot y ensayos de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA) (Sanders *et al.*, 1995). La línea de maíz MON810 no contiene el gen *gox* y por lo tanto no expresa la proteína GOX (Kania *et al.*, 1995). Como era de esperar, no se observaron bandas en los extractos provenientes de las dos líneas control, MON88 y MON819 (Fig. 4, calles 11 y 12).

### Conclusión

En resumen, la proteína Cry1Ab en la línea MON810 muestra un producto inmunoreactivo del tamaño esperado cuando se lo compara con un estándar proteico purificado. Las proteínas CP4 EPSPS y GOX no están presentes en MON810.

### Equivalencia de la proteína Cry1Ab expresada en plantas y en bacterias

El bajo nivel de expresión de Cry1Ab en las plantas de maíz protegido contra insectos impide la purificación de proteína en cantidades suficientes como para su caracterización. Como alternativa, se caracterizó la proteína Cry1Ab funcionalmente activa producida en células microbianas para verificar su equivalencia estructural y funcional con la proteína expresada en planta de modo de poder utilizar la proteína expresada en bacterias en la evaluación de seguridad. Como se espera que la proteína Cry1Ab de longitud completa (~131 kD) producida por las plantas de maíz protegidas contra insectos sea rápidamente convertida a la forma de núcleo proteico resistente a tripsina (~63 kD) al ser ingerida, Monsanto propuso y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos aceptó, que el núcleo resistente a tripsina (NRT) de Cry1Ab era un material apropiado para evaluar la seguridad de la proteína de longitud completa.

El NRT de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli* fue purificado (Heeren *et al.*, 1992), caracterizado (Berberich & Lee, 1994), y evaluado para determinar su seguridad en estudios de toxicidad aguda (Taylor, 1992). También se estudió el destino digestivo del NRT de Cry1Ab (Ream, 1994). El NRT de Cry1Ab fue purificado de la línea 754-10-I de maíz protegido contra insectos (Lee *et al.*, 1995c) y mostró ser equivalente al NRT de Cry1Ab producido en *E. coli* cuando se lo estudió utilizando un conjunto exhaustivo de pruebas físicas y funcionales (Lee *et al.*, 1995a). Se realizó una prueba adicional (análisis por Western blot) que mostró que el NRT de Cry1Ab producido en hojas y semillas de la línea de maíz MON801 protegido contra insectos (MON80100) era equivalente al producido tanto en *E. coli* como también en la línea 754-10-I de maíz protegido contra insectos, basándose en los pesos moleculares aparentes y la inmunorreactividad específica (Lee *et al.*, 1995a).

Este estudio evaluó la equivalencia del NRT de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli* y varias otras líneas de maíz protegido contra insectos, incluyendo MON810. Esta evaluación de equivalencia sirve como justificación para el uso de la información de seguridad generada con el NRT de Cry1Ab producida en *E. coli* para avalar la seguridad de la proteína Cry1Ab expresada en estas líneas de maíz.

### **Materiales y Métodos**

La proteína Cry1Ab fue extraída de tejido foliar de MON802, MON805, MON809, MON810, MON813, y MON814, crecidos en condiciones de invernadero. También se prepararon extractos proteicos de hojas de plantas crecidas en invernadero de las líneas MON818 y MON819. Las muestras de referencia fueron el núcleo resistente a tripsina de Cry1Ab de ~63 kD, preparado por tripsinización de la proteína de longitud completa producida en *E. coli* (Berberich & Lee, 1994), y el NRT de la proteína Cry1Ab extraída de la línea de maíz protegido contra insectos MON 801 (Lee et al., 1995a).

Los extractos proteicos de tejido foliar de las líneas de prueba, de referencia, y controles fueron preparados como se indica a continuación para el subsiguiente análisis, usando el procedimiento analítico de Western blot. Las muestras de tejido foliar fueron pulverizadas en nitrógeno líquido, homogeneizadas en solución tamponada TBA (100 mM Tris-HCl, 100 mM borato de sodio, pH 7,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05% (v/v) Tween-20, y 0.2% (p/v) ácido ascórbico) usando una proporción de 0,1 g de tejido en 1 ml de *buffer*, y luego se centrifugaron. Se inició la tripsinización de alícuotas de 200 µl de cada sobrenadante con la adición de 7 µl de una solución de 5 mg/ml de tripsina pancreática bovina (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM CaCl<sub>2</sub>) tratada con TPCK. Las muestras se incubaron durante ~18 horas y luego se inactivó la reacción con 1,25 µl de PMSF 200 mM. Una alícuota (50 µl) de cada extracto fue combinada 1:1 con una mezcla para muestra en SDS-PAGE, desnaturalizadas por calor (5 min; 100°C), y sometidas a electroforesis utilizando el método de Laemmli (1970).

Las proteínas separadas fueron electro-transferidas a una membrana de PVDF (polivinilideno difluoruro) (Immobilon, Millipore Corp.) y los sitios de unión a proteínas no específicos fueron posteriormente bloqueados por incubación con una solución TBST (0.1 M Tris base, 10 mM borato de sodio, 0.15 M NaCl, 0.05% (v/v) Tween-20) adicionada con 5% (v/v) de leche en polvo descremada (1 hora, temperatura ambiente). La membrana con las proteínas transferidas fue incubada secuencialmente con antisuero de conejo contra el NRT de la proteína Cry1Ab expresada en *E. coli* (1:1000) y con anticuerpos de burro conjugados con fosfatasa alcalina contra IgG de conejo (1:1000; Jackson Immunoresearch). El anticuerpo unido fue visualizado usando el sistema de sustrato colorimétrico NBT/BCIP (Promega). El procedimiento analítico de Western blot, tal como se lo utilizó en este estudio, provee una comparación cualitativa, no cuantitativa entre las muestras; por lo tanto, no se emplearon métodos estadísticos para los análisis de Western blot.

### **Resultados**

Los resultados se muestran en la Fig. 5. En los extractos preparados a partir de cada una de las líneas de maíz de prueba (MON802, MON805, MON809, MON810, MON813, y MON814) se observó una banda inmunorreactiva con el mismo peso molecular aparente de ~63 kD que el núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli* utilizado como estándar de referencia y que la línea de maíz de referencia MON801. La banda observada a la altura del peso molecular esperado (~63 kD) en las líneas de maíz de prueba y de referencia resultó ser la banda predominante en todos los casos. Se observaron claramente dos bandas inmunorreactivas de menor tamaño en las líneas de prueba MON802, MON805 y MON810 (calles 7, 8 y 10). Estas bandas indudablemente representan otros fragmentos proteolíticos de Cry1Ab (calles 7, 8 y 10). Estas bandas también se encuentran presentes en otras líneas, pero en menor intensidad. Se observó una banda de aproximadamente 20 kD en los extractos de todas las líneas de maíz, incluyendo las líneas control MON818 (calle 3) y MON 819 (calle 4). Esta banda representa una reactividad cruzada no específica de fondo que no está relacionada

con el NRT de Cry1Ab. Los resultados obtenidos en este estudio claramente demuestran que el NRT de Cry1Ab producido en *E. coli* y en MON810 son equivalentes.

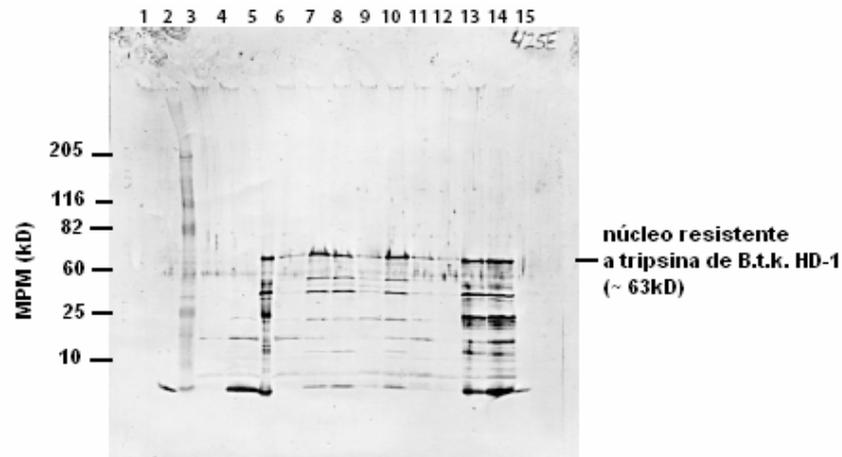


Fig. 5. Análisis por Western blot de las proteínas Cry1Ab tripsinizadas de extractos de tejidos de maíz. Calle en blanco, 1X SeptraSol (calle 1); marcadores de peso molecular coloreados de Sigma (calle 2); extracto proteico de hoja tripsinizado de MON818 (calle 3); extracto proteico de hoja tripsinizado de MON819 (calle 4); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng (calle 5); extractos tripsinizados de las líneas MON801, 802, 805, 809, 810, 813, y 814 (calles 6-12, respectivamente); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng, agregado al extracto de MON818 (calle 13); núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli*, ~20 ng, agregado al extracto de MON819 (calle 14); en blanco, 1X SeptraSol (calle 15). No se determinó la carga proteica para los extractos de maíz. Se agregaron ~7.5 µl de cada extracto de maíz a ~15 µl de volumen total (calles 3-4, 6-12). Cuando se usaron a estándares (calles 13-14), se agregaron ~5 µl del extracto de la línea maíz control (MON818 y MON819) a un volumen total de ~10 µl.

### Conclusión

Se demostró por análisis de Western blot que la línea de maíz MON810 contiene un núcleo proteico de Cry1Ab resistente a tripsina que es equivalente al núcleo proteico de Cry1Ab resistente a tripsina producido en *E. coli* utilizado para los estudios de seguridad. La equivalencia establecida por estos ensayos sirvió como justificación para el uso de la información de seguridad generada con el núcleo proteico de Cry1Ab resistente a tripsina para avalar la seguridad del núcleo proteico de Cry1Ab resistente a tripsina expresado en esta línea de maíz protegido contra insectos.

### Referencias

- Berberich, S. A. & Lee, T. C. (1994). Characterization of purified *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 trypsin-resistant core protein produced in *Escherichia coli*, Monsanto Technical Report, St. Louis, MSL-13479.
- Davies, S.R. (1995). Development and validation of an enhanced chemiluminescence western blot for the detection and quantitation of neomycin phosphotransferase (NPT II) in maize tissues. Report Number MSL-13790, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
- Davies, S. R. & Sanders, P.R. (1995). Validation of a direct ELISA to detect and quantitate glyphosate oxidoreductase, GOX, protein in maize plant tissues. Report number MSL -13527, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
- Elswick, E. (1995). Validation of a direct ELISA to detect and quantitate CP4 5-Enol-Pyruvyl shikimate3-phosphate protein in maize plant tissues. Report Number MSL-13576, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
- Heeren, R. A., Johnson, G. V., Berberich, S. A., Fuchs, R. L., Grabner, R. W. & Gustafson, M. E. (1992). Purification of recombinant *Bacillus thuringiensis* HD-1 tryptic core. Monsanto Technical Report, St. Louis, MSL-11904.
- Kania, J., Keck, P., Levine, E. & Sanders, P. (1995). Molecular analysis of insect protected maize line MON 810. Monsanto Technical Report MSL-14382, St. Louis.
- Laemmli, U. K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

8. Ledesma, B. E., Berberich, S.A. & Sanders, P.R. (1995). Validation of a direct ELISA to detect and quantitate Btk HD-1 protein in European maize borer resistant maize plants. MSL-13664, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
9. Lee, T. C., Bailey, M., Sims, S., Zeng, J., Smith, C. E., Shariff, A., Holden., L. R. & Sanders, P. R. (1995a). Assessment of the equivalence of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 protein produced in *Escherichia coli* and European maize borer resistant maize. Monsanto Technical Report, St. Louis, MSL-13864. EPA MRID # 43533204
10. Lee, T. C., Bailey, M. & Sanders, P. R. (1995b). Compositional comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 protein produced in ECB resistant maize and the commercial microbial product, DIPEL. Monsanto Technical Report MSL-13876, St. Louis. Study Number 94-01-39-12.
11. Lee, T. C., Zeng, J. & Ledesma, B. E. (1995c). Purification of B.t.k. HD-1 Protein from European Maize Borer Resistant Maize. Monsanto Technical Report, St Louis, MSL-13879.
12. Naylor, M. (1992). Acute oral toxicity study of B.T.K. HD-1 tryptic core protein in albino mice. Study number 92069, an unpublished study conducted by Monsanto Compnay. EPA MRID no. 43468001.
13. Ream, J. E. (1994). Assessment of the in vitro digestive fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 protein. Monsanto Technical Report, St. Louis, MSL-13425. EPA MRID # 43439201
14. Sanders, P.R., Elswick, E.N., Groth, M.E. & Ledesma, B.E. (1995). Evaluation of insect protected maize lines in 1994 U.S. field test locations. Study Number 94-01-39-01, MSL-14179, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43665502.



## Capítulo 9 – Datos Nutricionales

Todos los métodos de mejoramiento, tradicionales o modernos, tienen el potencial de alterar el valor nutricional de las plantas u originar cambios intencionales o no intencionales en las concentraciones de varios tóxicos naturales o antinutrientes. Es importante que todas las variedades nuevas sean evaluadas para reducir la probabilidad de que los cambios no esperados produzcan efectos adversos para la salud.

Los cambios no intencionales en los niveles de nutrientes pueden surgir teóricamente de varias maneras. La inserción del material genético podría interrumpir o alterar la expresión de los genes que se expresan normalmente en la planta. La expresión del gen introducido, a través de la síntesis proteica, podría reducir la disponibilidad de aminoácidos necesarios para la síntesis de compuestos normales de la planta. La producción de los compuestos normales de la planta podría también verse afectada si la proteína nueva empleara sustratos de otra vía metabólica importante. Finalmente, tanto la proteína expresada como los niveles alterados de otras proteínas podrían tener efectos antinutricionales. Estas preocupaciones posibles están relacionadas con la aleatoriedad de la inserción del ADN. Sin embargo, los cambios en la expresión de los genes pueden también ocurrir cuando se emplean los métodos de mejoramiento tradicional. Tales cambios pueden ser menos frecuentes en las plantas transgénicas ya que sólo se transfieren un número muy limitado de genes durante la modificación genética.

Toxinas vegetales y antinutrientes en algunos cultivos comunes

Cultivo	Toxina/antinutriente
colza ( <i>Brassica napus</i> , <i>B. rapa</i> )	glucosinolatos ácido erúcico fitato
maíz ( <i>Zea mays</i> )	fitato
tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	alfa-tomatina solanina chaconina lectinas oxalato
papa ( <i>Solanum tuberosum</i> )	solanina chaconina inhibidores de proteasas fenoles
soja ( <i>Glycine max</i> )	inhibidores de proteasas lectinas isoflavonas fitato

La evaluación de la seguridad alimentaria debería considerar la posibilidad de cualquier cambio en la composición nutricional, especialmente en los elementos clave que tienen un impacto significativo en la dieta, así como la posibilidad de cualquier cambio en la biodisponibilidad de los componentes nutricionales clave. Cuando se busca una garantía adicional de la seguridad, los métodos analíticos que se aplican tradicionalmente para la evaluación de los componentes alimenticios, tales como las proteínas totales, grasas, cenizas, fibras y micronutrientes, pueden ser completados con análisis adicionales para identificar efectos inesperados.

Debido al potencial de cambios importantes en los niveles de nutrientes e interacciones con otros nutrientes y efectos no intencionales, puede ser necesario en ciertos casos realizar estudios de alimentación en animales para determinar los resultados originados por los cambios en los perfiles nutricionales y la biodisponibilidad de los nutrientes. Las modificaciones

nutricionales que están dentro del rango normal de la variación nutricional pueden requerir una evaluación menos extensa que las que están fuera de los rangos normales.

Para las plantas modificadas genéticamente que no han sido desarrolladas para tener algún valor nutricional alterado, el objetivo de la evaluación es demostrar que no ha habido cambios no intencionales en los niveles de los nutrientes clave, de los tóxicos naturales, ni en la biodisponibilidad de los nutrientes. Así, la sustitución del alimento convencional por el derivado del cultivo genéticamente modificado no debería afectar negativamente la salud ni el estado nutricional del consumidor. Deberían además considerarse las implicancias para la población como un todo y para subgrupos específicos (por ej.: niños y ancianos).

### CASO DE ESTUDIO MON 810

Los siguientes datos nutricionales se obtuvieron por análisis de grano y forraje cosechados en 6 ensayos de campo realizados en Estados Unidos durante 1994 (Sanders et al., 1995), o de ensayos de campo llevados a cabo en Francia e Italia durante 1995. La línea control MON818 es similar en fondo genético a las líneas MON 810 [(((Hi-II x B73) autofec) x Mo17) autofec], pero no es una aislínea debido a la variabilidad de la línea parental High-Type II.

La composición centesimal (proteínas, grasas, cenizas, carbohidratos, calorías y humedad), la composición de aminoácidos, y el perfil de ácidos grasos, se realizaron a partir de grano molido y usando métodos publicados (AOAC Methods 1990). Los valores informados para el análisis composicional por Corning Hazleton Inc. (Madison, Wisconsin, EEUU) se expresaron como porcentajes del peso seco de la muestra, corregidos para la determinación de humedad. Los valores experimentales se compararon entre la línea de maíz MON810 y el control, así como con los rangos publicados en la literatura (Watson, 1982, 1987; Jugenheimer, 1976), y los valores informados para una línea control de similar fondo genético (Sanders & Patzer, 1995).

#### Análisis centesimal del grano de maíz MON810

##### Métodos

Se emplearon los mismos métodos para analizar grano y ensilaje, excepto para las grasas, como se describe más abajo.

**Humedad:** las muestras se secaron en un horno al vacío a 100°C a un peso constante (aproximadamente 5 horas) (métodos AOAC 926.08 y 925.09, 1990). La pérdida de humedad se determinó gravimétricamente. No hubo sustancia de referencia analítica para estos análisis.

**Proteínas:** el nitrógeno de las proteínas, y otros tipos de nitrógeno orgánico en la muestra, se convirtieron a amoníaco por digestión con ácido sulfúrico conteniendo una mezcla catalítica de mercurio. La digestión ácida se trató con álcali para la producción de amoníaco, el que se destiló y tituló con un ácido estándar. El porcentaje de nitrógeno se determinó y convirtió a proteína usando el factor 6, 25 (métodos AOAC 955.04C y 979.09 1990; Bradstreet 1965; Kalthoff & Sandell 1948). No hubo sustancia de referencia analítica para estos análisis.

**Grasas (ensilaje):** la muestra de ensilaje fue hidrolizada en un baño usando ácido clorhídrico. Las grasas se extrajeron con éter y hexano. El extracto se lavó con una solución alcalina diluida y se filtró a través de una columna de sulfato de sodio. El extracto remanente se evaporó, secó y pesó (métodos AOAC 922.06 y 954.02, 1990). No hubo sustancia de referencia analítica para estos análisis.

**Grasas (grano):** la muestra de grano se pesó en un dedal de celulosa conteniendo arena o sulfato de sodio. El dedal se secó para remover el exceso de humedad. Se agregó pentano gota a gota a través de la muestra para remover las grasas. El extracto se evaporó, secó y pesó (método AOAC 960.39). No hubo sustancia de referencia analítica para estos análisis.

**Cenizas:** la materia orgánica volátil se eliminó al incinerar la muestra a 550°C en un horno eléctrico. El residuo se cuantificó gravimétricamente y se calculó el porcentaje de cenizas (método AOAC 923.03, 1990). No hubo sustancia de referencia analítica para este análisis.

**Calorías:** las calorías se calcularon usando los factores de Atwater para los datos derivados del peso fresco y la siguiente ecuación (USDA Agricultural Handbook No. 8, 1975):

$$\text{calorías (kcal/100g)} = (4 * \% \text{ proteínas}) + (9 * \% \text{ grasas}) + (4 * \% \text{ carbohidratos})$$

No hubo sustancia de referencia analítica para estos análisis.

**Carbohidratos:** los carbohidratos se calcularon por diferencia usando los datos derivados del peso fresco y la siguiente ecuación (USDA Agricultural Handbook No. 8, 1975):

$$\% \text{ carbohidratos} = 100\% - (\% \text{ proteínas} + \% \text{ grasas} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ humedad})$$

No hubo sustancia de referencia analítica para estos análisis.

**Fibra cruda:** la fibra cruda es la pérdida por ignición de los residuos secos que quedan luego de la digestión de las muestras con soluciones de 1,25% ácido sulfúrico y 1,25% hidróxido de sodio, bajo condiciones específicas (método AOAC 962.09, 1990). No hubo sustancia de referencia analítica para este método.

## Resultados

Los niveles de los componentes principales del grano de maíz (proteínas, grasas, cenizas, carbohidratos, calorías y humedad) se resumen en la Tabla 1. Los niveles de proteínas, grasas, cenizas, carbohidratos, calorías y humedad fueron equivalentes para la línea MON810 y la línea control MON818, y estuvieron dentro de los rangos informados y publicados en la literatura para todos los componentes medidos.

Tabla 1. Resumen del análisis centesimal del grano de la línea de maíz MON810

Componente	MON818		MON810		Rango en la literatura	Rango informado <sup>d</sup>
	Media <sup>b</sup>	Rango <sup>c</sup>	Media <sup>b</sup>	Rango <sup>c</sup>		
Proteínas	12,8	11,7-13,6	13,1	12,7-13,6	6,0-12,0 <sup>e</sup> 9,7-16,1 <sup>f</sup>	11,2-12,9
Grasas <sup>a</sup>	2,9	2,6-3,2	3,0	2,6-3,3	3,1-5,7 <sup>e</sup>	3,8-4,2
Cenizas <sup>a</sup>	1,5	1,5-1,6	1,6	1,5-1,7	1,1-3,9 <sup>e</sup>	1,5-1,8
Carbohidratos <sup>a</sup>	82,7	81,7-83,8	82,4	81,8-82,9	no informado	81,7-83,0
Calorías/100g <sup>a</sup>	409	406-410	408	407-410	no informado	412-416
Humedad %	12,0	10,6-14,2	12,4	11,0-14,4	7-23 <sup>e</sup>	13,0-15,8

a. Porcentaje del peso seco de la muestra

b. El valor informado es la media de seis muestras, cada una de un sitio diferente del campo

c. El rango indica los valores más altos y más bajos encontrados en cada sitio para cada línea

d. Sanders & Patzer (1995), rango para un control de similar composición genética

e. Watson 1987

f. Jugenheimer 1976

## Composición de aminoácidos

### Métodos

Las muestras de grano se hidrolizaron con ácido clorhídrico, se ajustó el pH 2.2, y los aminoácidos individuales se cuantificaron usando un analizador automático. Este ensayo se basó en referencias previamente publicadas (método AOAC 982.30, 1990). Las sustancias de referencia para estos análisis fueron: K18 (Beckman, lote #A304008), L-triptofano (Sigma Chemical, lote #60H0635 y 52H0717), L-cisteína monohidrato (Sigma Chemical, lote #50H2616), metionina sulfona (Sigma Chemical, lote #49F0113).

## Resultados

Los resultados del análisis de la composición de aminoácidos de las muestras de grano de maíz para la línea MON810 y el control MON818 se presentan en la Tabla 2. Los valores para cada aminoácido (mg/g) se convirtieron a porcentajes de la proteína total. Los valores de todos los aminoácidos fueron comparables para MON810 y el control MON818, y también para los informados en la literatura (Watson, 1982) y para la línea de maíz de fondo genético similar (Sanders & Patzer, 1995).

Tabla 2. Composición de aminoácidos de la línea de maíz MON 810<sup>a</sup>

Aminoácido	MON818		MON810		Rango de la literatura <sup>b</sup>	Rango Informado <sup>c</sup>
	Media <sup>d</sup>	Rango <sup>e</sup>	Media <sup>d</sup>	Rango <sup>e</sup>		
<b>Esenciales</b>						
Metionina	1,7	1,6-1,7	1,7	1,6-1,9	1,0-2,1	2,0-2,6
Cisteína	1,9	1,8-2,0	2,0	1,9-2,1	1,2-1,6	1,9-2,3
Lisina	2,8	2,7-2,9	2,8	2,5-2,9	2,0-3,8	2,9-2,3
Triptofano	0,6	0,4-0,6	0,6	0,5-0,7	0,5-1,2	0,5-0,6
Isoleucina	3,8	3,6-4,0	3,7	3,3-4,1	2,6-4,0	3,7-3,8
Histidina	2,9	2,8-3,0	3,1	2,9-3,3	2,0-2,8	3,0-3,3
Valina	4,6	4,3-4,8	4,5	4,1-4,9	2,1-5,2	4,5-4,8
Leucina	14,5	13,8-15,0	15,0	14,1-16,7	7,8-15,2	13,6-13,8
Arginina	4,5	4,2-4,7	4,5	4,1-4,7	2,9-5,9	4,4-5,0
Fenilalanina	5,4	5,2-5,6	5,6	5,4-6,1	2,9-5,7	5,2-5,9
Glicina	3,7	3,5-3,8	3,7	3,4-4,0	2,6-4,7	3,9-4,2
<b>No esenciales</b>						
Alanina	7,8	7,5-8,0	8,2	7,8-8,9	6,4-9,9	7,8-8,1
Ácido aspártico	6,6	6,3-6,8	7,1	6,4-8,2	5,8-7,2	6,8-7,2
Ácido glutámico	21,1	21,1-21,6	21,9	20,4-24,4	12,4-19,6	19,9-20,9
Prolina	9,6	9,4-9,8	9,9	9,7-10,5	6,6-10,3	9,0-9,4
Serina	5,2	5,1-5,4	5,5	5,3-5,9	4,2-5,5	5,5-6,0
Tirosina	4,0	3,9-4,1	4,4	4,1-4,8	2,9-4,7	3,8-4,3

a. Los valores se expresan como porcentaje de la proteína total

b. Watson 1982. Los valores son el porcentaje de la proteína total (10,1% proteína total N x 6,25)

c. Sanders & Patzer (1995), rango para un control de similar fondo genético

d. El valor informado es la media de seis muestras, cada una de un sitio diferente del campo (Sanders et al. 1995)

e. El rango indica los valores más altos y más bajos encontrados en cada sitio para cada línea.

## Composición de ácidos grasos

El aceite de maíz es una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados, con un alto nivel del ácido graso esencial ácido linoleico (18:2). Además, tiene naturalmente bajos niveles de los ácidos grasos saturados ácido palmítico (16:0, 11%) y esteárico (18:0, 2%). Se determinaron los perfiles de ácidos grasos en los granos de maíz MON810 y de las líneas control.

## Métodos

Se extrajeron los lípidos de las muestras de granos, se saponificaron con 0,5N hidróxido de sodio en metanol, y se metilaron con 14% trifluoruro de boro:metanol. Los metil-ésteres resultantes se extrajeron con heptano conteniendo un estándar interno y se analizaron por cromatografía gaseosa usando estándares externos para la cuantificación (método AOCS Ce 1-62, 1981).

## Resultados

Los valores para la composición de ácidos grasos del grano de maíz de las líneas MON810 y la línea control MON818 se resumen en la Tabla 3. Los resultados se informan para los ácidos grasos que dieron valores detectables en el ensayo. Los valores para los ácidos grasos fueron comparables entre la línea MON810 y la línea control MON818, y con los valores ya informados en la literatura (Watson, 1982) y para la línea de maíz control con similar fondo genético (Sanders & Patzer, 1995). Los ácidos grasos que no se detectaron en el ensayo fueron: caprílico, cáprico, láurico, mirístico, miristoleico, pentadecanoico, heptadecanoico, eicosadienoico, eicosatrienoico y araquidónico.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos en grano de la línea de maíz MON 810<sup>a</sup>

Componente	MON 818		MON 810		Rango de la literatura <sup>d</sup>	Rango informado <sup>e</sup>
	Media <sup>b</sup>	Rango <sup>c</sup>	Media <sup>b</sup>	Rango <sup>c</sup>		
Linoleico (18: 2)	63,0	61,8-64,6	62,6	59,5-64,7	35-70	61,7-65,0
Oleico (18:1)	22,8	21,6-23,9	23,2	21,5-25,4	20-46	21,3-23,6
Palmítico (16:0)	10,5	10,2-10,7	10,5	10,2-11,1	7-19	10,2-10,8
Estearico (18:0)	1,8	1,8-1,9	1,9	1,7-2,1	1-3	1,6-2,1
Linolénico (18:3)	0,9	0,8-0,9	0,8	0,7-0,9	0,8-2	0,9-1,1

a. Los valores de ácidos grasos se muestran como % de los lípidos totales. Otros ácidos grasos se encontraron por debajo del límite de detección del ensayo

b. El valor informado es la media de seis muestras, cada una de un sitio diferente del campo

c. El rango indica los valores más altos y más bajos encontrados en cada sitio para cada línea

d. Watson 1982

e. Sanders & Patzer (1995), rango para un control de similar fondo genético

## Componentes inorgánicos del grano de maíz MON810

### Métodos

**Calcio:** las muestras de grano y ensilaje se secaron, carbonizaron y llevaron a cenizas durante toda la noche a 500-550°C. Las muestras se trataron con ácido nítrico, se secaron, se volvieron a llevar a cenizas y se solubilizaron en 4% HCl. La cantidad de calcio se determinó a una longitud de onda de 422,7 nm por comparación de la muestra con la señal de una solución estándar. Todas las soluciones contenían 1% lantano y 5% HCl (métodos AOAC 965.09, 968.08 y 985.35). La sustancia de referencia para este método fue una solución de calcio 1.000 ppm (Fisher, lote #940982-24).

**Fósforo:** las muestras de grano y ensilaje se secaron, carbonizaron y llevaron a cenizas durante toda la noche a 500-550°C. Las muestras se trataron con ácido nítrico, se secaron, se volvieron a llevar a cenizas y se solubilizaron en 4% HCl. La cantidad de fósforo se determinó colorimétricamente a una longitud de onda de 420 nm por comparación de la muestra con la señal de una solución estándar, haciendo reaccionar a cada una con una solución de molibdovanadato (métodos AOAC 965.17 y 962.11). La sustancia de referencia para este método fue una solución de fósforo 10.000 ppm (SPEX, lote #E-87P).

### Resultados

Los valores de los componentes inorgánicos del grano de maíz de la línea MON810 y de la línea control MON818 se resumen en la Tabla 4. Los valores de calcio y fósforo fueron comparables para MON810 y el control MON818, y con los valores informados en la literatura (Watson 1982) y para la línea de maíz control con similar fondo genético (Sanders & Patzer 1995).

También se evaluaron en el grano de maíz los componentes de carbohidratos: almidón, fibra cruda, azúcares y ácido fítico (Tabla 4). Los valores para todos los componentes, salvo para la fibra cruda, no resultaron significativamente diferentes para la línea transgénica MON810 en comparación con la línea control. El valor para la fibra cruda en MON810 (2.6%) fue significativamente diferente a la línea control (2.4%), pero no se lo considera como una diferencia de importancia biológica, y se encuentra dentro del rango informado (Watson 1982).

Los tocoferoles están naturalmente presentes en el aceite de maíz y tienen actividad de vitamina E (Watson 1987). Los niveles para los alfa y gamma-tocoferoles en la línea MON810 no fueron significativamente diferentes a los de la línea control. El valor para los beta-tocoferoles en la línea MON810 (8.5%) fue significativamente diferente al de la línea control (7.5%), pero se encuentra dentro del rango informado para las líneas de maíz con fondo genético similar (7,9 – 10,7%). No hay datos publicados en la literatura sobre los niveles de tocoferoles en maíz.

Tabla 4. Análisis de carbohidratos, tocoferoles y componentes inorgánicos en grano de la línea de maíz MON 810<sup>a</sup>

Componente	MON 818		MON 810		Rango de la literatura <sup>d</sup>	Rango informado <sup>e</sup>
	Media <sup>b</sup>	Rango <sup>c</sup>	Media <sup>b</sup>	Rango <sup>c</sup>		
<b><u>Inorgánicos</u></b>						
Calcio %	0,0033	0,0029-0,0037	0,0036	0,0033-0,0039	0,01-0,1	0,003-0,004
Fósforo %	0,348	0,327-0,363	0,358	0,334-0,377	0,26-0,75	0,311-0,363
<b><u>Carbohidratos</u></b>						
Almidón %	66,9	64,6-69,0	67,6	65,3-69,7	64-78,0	
Fibra cruda %	2,4	2,3-2,5	2,6	2,5-2,8	2,0-5,5	
Azúcares g/100g						
Fructosa	0,27	0,22-0,40	0,32	0,23-0,35		
Glucosa	0,41	0,34-0,46	0,44	0,34-0,47		
Sacarosa	0,93	0,68-1,11	0,93	0,79-1,12		
Ácido fítico	0,84	0,79-0,91	0,86	0,81-0,91	0,7-1,0	
<b><u>Tocoferoles</u></b>						
Alfa	10,9	9,9-12,1	10,4	9,7-11,3	3,0-12,1	
Beta	7,5	7,0-7,9	8,5	8,1-9,2		
Gamma	21,6	18,8-27,8	20,2	15,3-24,8		

a. Valores sobre el peso seco

b. El valor informado es la media de seis muestras, cada una de un sitio diferente del campo

c. El rango indica los valores más altos y más bajos encontrados en cada sitio para cada línea

d. Watson 1982, Watson 1987

e. Sanders & Patzer (1995), rango para un control de similar fondo genético

### Niveles de antinutrientes

El maíz contiene pocas toxinas o antinutrientes. Los antinutrientes inhibidores de tripsina y quimotripsina están presentes en el maíz en niveles muy bajos y no son considerados nutricionalmente significativos (Wright 1987). Como no hay una rutina de métodos analíticos para el ensayo de inhibidor de tripsina en maíz, se usó el método desarrollado para soja (método AOCS Ba 12-75, 1997 modificado).

Los datos para el inhibidor de tripsina fueron generados a partir de muestras de grano colectadas de siete híbridos de maíz MON810 de siete ensayos de campo en Estados Unidos, y muestras de maíz no transformado obtenidas de siete ensayos en Estados Unidos y trece híbridos comerciales sembrados en Italia y Francia. Los análisis fueron realizados en forma independiente en los Laboratorios Covance, Madison, Wisconsin. El rango de valores medido

para la línea de maíz MON810 (2,35 – 5,54 U/mg peso seco) fue comparable al informado para la línea control (1,63 – 5,28 U/mg peso seco).

### **Análisis centesimal del forraje MON810**

Los principales componentes del forraje de la línea transgénica MON810 y del control MON820 fueron analizados según las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) a partir de plantas cosechadas en tres ensayos de campo en Francia. La composición centesimal (proteínas, grasas, cenizas, carbohidratos, calorías y humedad), fibra detergente ácida (FDA) y fibra detergente neutra (FDN) se realizaron según los métodos publicados (AOAC 1990; Williams & Norris 1987). Los valores informados para el análisis composicional, según la determinación del método AOAC en Corning Hazleton Inc., Madison, Wisconsin (Tabla 5), se expresaron como porcentaje del peso seco de la muestra, corrigiendo los valores para la determinación de humedad.

Tabla 5. Resumen del análisis centesimal del forraje de la línea de maíz MON 810<sup>a</sup>

Componente	MON 820	MON 810
Proteínas %	4,7-7,4	5,7-8,4
Cenizas %	2,9-4,4	3,1-3,6
ADF %	25,6-29,2	22,6-27,2
NDF %	39,9-43,3	36,9-41,4
Grasas totales %	1,4-2,1	1,3-1,7
Carbohidratos %	88,0-89,1	86,9-89,8
Materia seca %	26,5-31,3	28,7-32,4

a. Se analizaron tres muestras, una de casa sitio del campo. Los valores son rangos, los valores más altos y más bajos encontrados en cada sitio para cada línea.

Los datos de composición para proteínas, grasas, cenizas, fibra detergente ácida, fibra detergente neutra, carbohidratos y materia seca del maíz MON810 fueron similares a los del control MON820.

### **Conclusión**

El análisis de los datos de composición del grano de maíz y del forraje indica que hay muy pocas diferencias significativas en los niveles de los principales componentes, nutrientes, factores antinutritivos o tóxicos naturales entre la línea MON810 resistente a insectos y las líneas de maíz control. Se considera que las diferencias identificadas no representan diferencias importantes ya que los valores fueron consistentes con los informados en la literatura o para líneas de maíz control con similar fondo genético, y por lo tanto representan la variabilidad natural que existe en el maíz.

### **Estudio de apoyo: estudio de alimentación en peces con MON801**

Este estudio se incluye como una ilustración de un método para evaluar la biodisponibilidad de los nutrientes. Fue realizado con la línea de maíz MON801, que es similar a MON810, en el sentido que también fue modificada genéticamente para resistir a insectos por expresión de la proteína Cry1Ab. Pero MON801 además expresa la enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4, y la enzima glifosato oxidoreductasa (GOX) de *Ochrobactrum anthropi*. El objetivo del estudio fue comparar la calidad del maíz MON801 con la del control MON800, para su uso en la alimentación de peces.

## Métodos

**Dieta:** Se incorporaron las semillas molidas de maíz de la línea MON801 y del control a las dietas de los peces en los niveles usados comercialmente (35% p/p o 350.000 ppm). El contenido proteico de ambas dietas se ajustó con la adición de harina de soja a una concentración final de 32%. Para dos lotes de la dieta las concentraciones proteicas que contenían MON801 y el control fueron 31,63 – 32,27% y 30,9 – 32,2%, respectivamente. El análisis centesimal de cada una de los alimentos usados en cada dieta se presenta en la Tabla 6. No se esperó la presencia de contaminantes conocidos en la dieta que pudieran interferir con el estudio. Todas las respuestas se cuantificaron para el maíz MON801 y se relativizaron al control MON800.

Tabla 6. Composición centesimal de los alimentos de maíz<sup>1</sup>

Tratamiento	Humedad <sup>2</sup> %	Proteínas %	Grasas %	Cenizas %
Lote 1				
Control MON 800	14,4	10,6	3,9	1,7
Test MON 801	14,2	11,4	4,4	1,6
Lote 2				
Control MON 800	14,3	10,1	3,4	1,2
Test MON 801	14,8	11,2	3,3	1,1

1. Los datos se presentan como porcentajes del peso húmedo

2. El porcentaje de humedad se calculó a partir del porcentaje de la materia seca.

**Peces:** se emplearon bagres americanos (catfish, *Ictalurus punctatus*), obtenidos del Laboratorio de Investigación Genética en Bagre Americano del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, localizado en Stoneville, Mississippi. Los peces (400) se colocaron en tanques y se mantuvieron durante un período de aclimatación antes del estudio. Durante el pesaje inicial, los peces se pasaron a través de una malla para remover a aquellos menores a los 6 gramos.

Se sacaron veinte o veintiún peces del tanque en forma no sistemática y se pesaron. El análisis estadístico confirmó que no había diferencias significativas en el peso de los peces antes de empezar el estudio. Durante el estudio, 20 o 21 peces se mantuvieron en un acuario de vidrio de 120 L (5 acuarios por tratamiento). Cada tratamiento dietario se realizó con un total de 100 (o 101) peces. Los peces fueron inicialmente alimentados a una tasa de 6% del peso corporal para estimar la saciedad. El peso se calculó durante las semanas en que los peces no fueron pesados asumiendo un índice de conversión alimentaria (FCR): se estimó que 1,3 gramos de alimento producen 1,0 g de ganancia en el peso de los peces por tanque, basado en la experiencia de Edwin Robinson y Scott Jackson del Centro de Investigación Delta y del Centro Efinsion. El FCR se ajustó considerando las mortalidades, agregando a la ganancia total la ganancia del peso de los peces que se perdieron en el experimento. A medida que los peces crecían, se fue ajustando el índice alimentario considerando las observaciones sobre el consumo durante las semanas anteriores al final del ensayo. De esta manera, se mantuvieron los índices cercanos a la saciedad.

**Recolección de datos:** Los peces se pesaron al inicio del experimento, a la semana 2, semana 6, y al final del estudio, pasando los peces del tanque a un balde pesado previamente y conteniendo agua suficiente como para cubrirlos. El índice de conversión alimentaria

acumulado se calculó a las semanas 2 y 6 y al final del estudio, dividiendo la suma del alimento ofrecido en ese punto por la ganancia total.

**Análisis centesimal de los filetes de pescado:** Al final del estudio se seleccionaron tres peces de cada tanque y se filetearon. Los tejidos comestibles (filetes) de los tres pescados se combinaron y sometieron a un análisis centesimal. Se determinaron los porcentajes de humedad, proteínas, grasas y cenizas, de acuerdo con los métodos AOAC (AOAC 1990).

## Resultados

Las cantidades de alimento por pez, los índices de conversión alimentaria, las ganancias de peso y las tasas de sobrevida se resumen en la Tabla 7. La cantidad total de alimento administrado a los peces durante el ensayo entero no fue significativamente diferente entre los peces alimentados con dietas que contenían MON801 o el maíz control. Los peces control se alimentaron con 44,8 gramos de alimento por pez y los que recibieron la dieta que contenía MON801 se alimentaron con 45,0 gramos de alimento por pez. No hubo diferencias en el índice de conversión alimentaria (FCR), porcentaje de ganancia de peso, peso final, ni porcentaje de sobrevida.

Tabla 7. Resumen del ensayo de alimentación en peces (catfish o bagre americano)<sup>1</sup>

Tratamiento	Alimento por pez <sup>2</sup> (g)	FCR <sup>3</sup>	Peso ganado <sup>4</sup> (%)	Peso final <sup>5</sup> (g)	Sobrevida <sup>6</sup> (%)
Control	44,8	1,21	1579	39,4	100
MON 800	(0,7) <sup>7</sup>	(0,03)	(45)	(1,1)	(0,0)
Test	45,0	1,24	1554	38,8	98
MON801	(0,9)	(0,03)	(51)	(1,1)	(1,2)

1. Los valores son medias de 5 tanques réplicas de peces, 20 peces/tanque
  2. Alimento por pez: cantidad total de alimento por tanque – (peso ganado por los muertos x FCR)/número de peces que quedan en el tanque
  3. FCR, índice de conversión alimentaria: (peso final por réplica + muertos) – (peso inicial)/alimento total ofrecido durante el estudio
  4. Porcentaje de peso ganado: (peso final por pez – peso inicial por pez)/peso inicial por pez
  5. Peso final por pez: peso final por réplica (tanque)/ número inicial de peces por réplica (tanque)
  6. Porcentaje de sobrevida: número final de peces por réplica (tanque)/número inicial de peces por réplica (tanque)
  7. Error estándar
- Las medias de los valores de los controles y de los tests para cada medición no son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0,05$ )

Sólo murieron dos peces durante el estudio, uno del grupo control y otro del grupo tratado. No se determinaron las causas de muerte de estos peces, aunque es común la pérdida de algunos pocos peces en este tipo de estudios debido al estrés de la manipulación durante el pesaje y la limpieza de los acuarios.

Se realizó el análisis centesimal de los filetes combinados de los tres pescados de cada tanque, determinándose el porcentaje de humedad, proteínas y cenizas para los alimentados con la dieta que contenía MON801 y los de la dieta control (Tabla 8). El análisis estadístico de los datos reveló una sola diferencia significativa. Ésta fue para el contenido proteico (determinado sobre el peso seco), donde los filetes de los peces alimentados con la dieta con MON810 presentaron una concentración mayor de proteínas.

Tabla 8: Composición centesimal de los filetes de pescado (catfish o bagre americano)<sup>1</sup>

A. Base peso húmedo <sup>2</sup>				
Tratamiento	Humedad <sup>3</sup> %	Proteína %	Grasa %	Ceniza %
Control	78,8	15,9	4,0	1,2
MON 800	(0,3) <sup>4</sup>	(0,1)	(0,3)	(0,02)
Test	79,0	16,6	3,4	1,2
MON 801	(0,3)	(0,4)	(0,2)	(0,01)
B. Base peso seco				
Tratamiento	Humedad <sup>3</sup> %	Proteína %	Grasa %	Ceniza %
Control	21,2	75,4	18,9	5,5
MON 800	(0,3)	(1,2)	(1,4)	(0,09)
Test	21,0	79,1 <sup>5</sup>	16,2	5,5
MON 801	(0,3)	(1,0)	(1,1)	(0,04)

1. Combinación de los filetes de 3 pescados de cada tanque, 5 tanques por tratamiento
2. Los datos se presentan sobre la base del peso húmedo y no son estadísticamente diferentes (alfa = 0,05)
3. Porcentaje de humedad = 100% - porcentaje de materia seca
4. Error estándar
5. Hubo una diferencia estadísticamente significativa en el contenido proteico de la carne sobre la base del peso seco (alfa = 0,05)

## Conclusión

A partir de los datos de este estudio, las dietas que contienen MON801 pueden alimentar a los peces (catfish o bagres americanos) de la misma manera que las dietas que contienen el control MON800, sin efectos adversos medibles.

## Referencias

1. AOAC Method 922.06, 954.02. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.
2. AOAC Method 923.03. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified
3. AOAC Method 926.08, 925.09. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.
4. AOAC Method 955.04C, 979.09. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.
5. AOAC Method 960.39. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.
6. AOAC Method 962.09. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.
7. AOAC Method 965.17, 962.11. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.
8. AOAC Method 965.09, 968.08, 985.35. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.
9. AOAC Method 982.30. (1990). In Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, modified.
10. AOCS Method Ba 12-75 (1997). In Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. American oil Chemists Society, Champaign, Illinois.
11. AOCS Method Ce 1-62. Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists Society. (1981). Method Ce 1-62, American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois, modified.
12. Bradstreet, R.B. (1965). The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen, Academic Press, New York, New York, modified.

13. Jugenheimer, R.W. (1976). *Corn Improvement, Seed Production, and Uses*. John Wiley & Sons, Inc. New York, New York, USA.
14. Kalthoff, I.M. & Sandell, E.B. (1948). *Quantitative Inorganic Analysis*, MacMillan, New York, modified.
15. Sanders, P.R., Elswick, E.N., Groth, M.E., Ledesma, B.E. (1995). Evaluation of Insect Protected Corn Lines in 1994 U.S. Field Test Locations. Study Number 94-01-39-01, MSL-14179, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43665502.
16. Sanders, P.R. & Patzer, S.S. (1995). "Compositional Analyses of MON 801 Grain and Silage from the 1993 and 1994 Corn Field Trials", Study Number 94-01-39-08, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
17. USDA Agriculture Handbook No. 8. (1975). *Composition of Foods*. In *Agricultural Handbook No. 8*. United States Department of Agriculture, Washington, D.C. pp. 159-165.
18. Watson, Stanley A. *Maize: Amazing Corn. General Properties*. (1982). pg 3-29. In: *CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Volume II: Part 1 Plant Products*. I.A. Wolff (ed). CRC Press, Inc., Florida.
19. Watson, S.A. (1987). *Structure and composition*. pp. 53-82. In *Corn Chemistry and Technology*. Watson, S.A. and R.E. Ramstad, Eds. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.
20. Williams, P. & Norris, K. (1987). *Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries*. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.



## Capítulo 10 – Evaluación toxicológica

El foco principal de la evaluación toxicológica es la expresión proteica de los genes insertados. El material genético insertado no es en sí mismo motivo de preocupación con respecto al consumo de las plantas transgénicas y sus productos, ya que el ADN es el mismo en todos los organismos vivos, y no debería diferir de aquel que se ingiere normalmente con la dieta. En humanos, la ingesta de ARN y ADN varía, pero en general se encuentra en el rango de 0,1 a 1,0 g por día (Doerfler & Schubert 1997). Cualquier preocupación sobre la presencia de un nuevo ADN en un alimento genéticamente modificado debe tomar en consideración que este ADN representaría menos del 1/250.000 del total de ADN consumido. Es por eso, y debido a la digestibilidad del ADN que se ingiere con la dieta, que la probabilidad de transferencia de genes de alimentos genéticamente modificados (y de cualquier otro alimento) a células de mamífero, o microorganismos intestinales, es infinitesimalmente pequeña.

Como el material genético insertado en los cultivos deriva frecuentemente de microorganismos que no han estado presentes en gran medida en la dieta de las personas, los productos correspondientes a estos genes son considerados como nuevos con respecto al consumo humano. Para determinar qué datos deben ser requeridos, primero hay que establecer si la proteína nueva se expresará en las partes comestibles de la planta, y si es así, si las condiciones de procesamiento habituales resultarán en la eliminación o desnaturalización del material proteico. Se debería proveer información con respecto a aquellos productos expresados en la planta transgénica, los niveles de expresión de las proteínas relevantes en los diferentes tejidos de la planta (en particular, en aquellas partes que serán consumidas), y qué tipos de procesamientos sufrirán las partes comestibles antes del consumo del producto. Si la preocupación permanece, se requerirán entonces otros datos que permitan evaluar la seguridad de la proteína nueva.

Un tema secundario de la evaluación toxicológica de los nuevos alimentos se refiere a los efectos que resultan de la interrupción de la expresión génica debida a la inserción del ADN del donante en el genoma del hospedador. Mientras los cambios en las vías metabólicas, y por ende en la composición de los nutrientes principales, será analizada en la sección “Datos nutricionales”, el incremento potencial en los niveles de los tóxicos naturales, o alérgenos asociados a los nuevos alimentos, es una preocupación desde el punto de vista toxicológico. Como el potencial de estas sustancias producidas endógenamente es ya conocido, no es necesaria una evaluación toxicológica. Las secciones de evaluación de la información/exposición dietaria debería proveer la garantía de que la concentración de los tóxicos naturales o alérgenos endógenos sea comparable con la variedad comercial de la cual derivan bajo una variedad de condiciones de crecimiento.

Muy pocos de los alimentos que se consumen hoy han sido sometidos a estudios toxicológicos. La evaluación de la seguridad de los varios miles de productos alimenticios lanzados al mercado cada año se basa generalmente en el supuesto de que los ingredientes individuales ya tienen un historial de consumo muy extenso, y que por lo tanto cualquier nueva combinación de estos ingredientes será igualmente segura. Muchos de los alimentos actuales, sin embargo, podrían mostrar efectos adversos si se consumieran en altas dosis. Cuando un alimento es comparado con su par convencional, la intención es determinar si el nuevo alimento es tan seguro como ese par. Como está bien documentado que la soja convencional tiene el potencial de afectar funciones endocrinas, por ejemplo, la soja genéticamente modificada, con similar composición, tendría el mismo potencial.

### Estudios *in vitro*

Para las nuevas proteínas (no así para otros compuestos), se puede predecir que su destino metabólico en el sistema digestivo humano o animal será similar al de las proteínas convencionales de la dieta. Un método que se usa para determinar esta predicción es el ensayo de digestibilidad *in vitro*, que indica la probabilidad de que una proteína tenga

características que no son comunes en las proteínas dietarias. Se asume que todas las proteínas funcionarán como las proteínas de la dieta y serán degradadas a aminoácidos durante la digestión. Si la proteína se degrada rápidamente en el tracto gastrointestinal o es inactivada por calor (como ocurriría durante el procesamiento del alimento), entonces es muy poco probable que provoque algún efecto adverso.

Si en cambio una proteína se muestra resistente a los fluidos digestivos típicos, entonces hay una exposición adicional de la proteína intacta o a polipéptidos de alto peso molecular derivados de ella. Esto puede ser importante para las proteínas con actividades biológicas potenciales, ya sean toxicológicas o alergénicas. No hay consenso sobre el hecho de que las proteínas resistentes constituyan un riesgo significativamente diferente cuando ningún otro ensayo de toxicidad realizado con la proteína nativa resulta adverso.

Como las proteínas tóxicas generalmente ejercen su efecto en una ventana de tiempo pequeña, los ensayos de toxicidad aguda se han considerado adecuados para la determinación de toxicidad. Frecuentemente, la proteína a evaluar está presente en la planta en niveles muy bajos y entonces es necesario expresarla en bacterias para producirla en cantidades suficientes para el ensayo. En esos casos, deberían presentarse datos que demuestren la equivalencia entre las proteínas de ambas fuentes (ver Material expresado/efecto).

### **Estudios en animales**

Los estudios en animales son el elemento principal de la evaluación de riesgo de muchos compuestos, como los pesticidas, fármacos, compuestos químicos industriales y aditivos alimentarios. En la mayoría de los casos, la sustancia a evaluar está bien caracterizada y pura, y no tiene valor nutricional. La exposición humana es generalmente baja. Es relativamente simple alimentar a los animales con tales compuestos a diferentes dosis (generalmente con varios órdenes de magnitud por encima de los esperados para la exposición humana), para identificar cualquier efecto adverso potencial de importancia para las personas. Así, es posible en la mayoría de los casos determinar los niveles de exposición a los cuales no se presentan efectos adversos y establecer límites superiores de seguridad aplicando los factores de seguridad apropiados.

Los alimentos, sin embargo, son mezclas complejas de compuestos caracterizados por una amplia variación en su composición y valor nutricional. Debido a su volumen y efecto sobre la sociedad, pueden generalmente administrarse a animales en muy pequeñas raciones, comparadas con las cantidades presentes en la dieta humana. Otro factor a considerar en los estudios de alimentación en animales, con el fin de evitar la introducción de efectos adversos no relacionados directamente con el material en sí mismo, es el valor nutricional y el balance de las dietas empleadas. Identificar efectos adversos potenciales y relacionarlos de forma concluyente con una característica individual del alimento puede ser extremadamente difícil.

Por ejemplo, considerando la evaluación del tomate genéticamente modificado, el hecho de que el tomate no modificado ya tenga sustancias capaces de causar efectos toxicológicos en los animales, también limita la sensibilidad del ensayo con el transgénico. El tomate no es un alimento que normalmente forme parte de la dieta de los roedores, y puede tener su propia toxicidad en estos animales. A menos que se incluyan tratamientos apropiados de control con tomate, o se determinen de antemano parámetros toxicológicos para la característica introducida, pueden surgir complicaciones en la interpretación de los resultados. Este ejemplo particular fue ilustrado cuando se probó la pasta de tomate Flavr Savr™ en roedores (OECD 2000).

Las pruebas en animales son una herramienta importante en circunstancias particulares, pero la necesidad de estos ensayos debería decidirse caso por caso. No hay ninguna evidencia científica que justifique que todos los alimentos nuevos y modificados genéticamente deban someterse a estudios de alimentación a largo plazo, ya que es probable que estas pruebas no brinden ninguna información significativa.

## CASO DE ESTUDIO MON 810

Debido al bajo nivel de expresión relativo de la proteína Cry1Ab en MON810, no fue posible usar a los tejidos vegetales como fuente de la proteína pura para los ensayos de toxicidad. En cambio, se usó la proteína Cry1Ab purificada de *E. coli* transformada con el mismo gen *cry1Ab* usado para producir el MON810, salvo que la expresión fue dirigida por un promotor bacteriano. La proteína entera Cry1Ab fue tratada con tripsina para producir el núcleo resistente a tripsina de la proteína. Los estudios de seguridad que se describen más abajo fueron realizados con el núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab, ya que es la porción insecticida activa de la proteína Cry1Ab detectable en la línea de maíz MON810 (Huber & Lüthy 1981). La equivalencia química y funcional del núcleo de Cry1Ab producido en *E. coli*, y en el maíz MON810, se estableció usando un conjunto de criterios rigurosos que incluyó el peso molecular, la inmunoreactividad, y la actividad insecticida (Lee et al. 1995).

### Digestión de la proteína Cry1Ab en fluidos gástricos e intestinales simulados

El núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab producida en *E. coli* resultó ser rápidamente degradable *in vitro* usando fluidos digestivos simulados (Ream 1994). Más del 90% de la proteína Cry1Ab fue degradada dentro de los dos primeros minutos de incubación con fluidos gástricos simulados, a juzgar por el análisis de Western blot. La actividad insecticida de la proteína Cry1Ab, según el bioensayo con insectos, se redujo en un 74-90% dentro de los dos primeros minutos de incubación con fluidos gástricos simulados.

Para poner en perspectiva la rápida degradación de la proteína Cry1Ab en el sistema gástrico, se estima que aproximadamente el 50% de la comida sólida deja el estómago dentro de las dos horas, mientras que los líquidos lo abandonan en aproximadamente 25 minutos (Sleisenger & Fordtran 1989). Como era de esperar, el núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab no fue degradado en forma significativa luego de 19,5 horas de incubación con fluido intestinal simulado, según surge del análisis por Western blot y el bioensayo con insectos. El núcleo típico de ésta y otras proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* han demostrado ser relativamente resistente a la digestión con serín-proteasas, como por ejemplo la tripsina, proteasa fundamental del fluido intestinal (Bietlot et al. 1989).

### Estudio de toxicidad oral aguda con la proteína Cry1Ab

#### Metodología

Para ensayar la toxicidad potencial asociada con la proteína Cry1Ab se realizó un estudio de toxicidad oral aguda usando el núcleo resistente a tripsina de la proteína producida por *E. coli* (Naylor 1992). La proteína fue administrada por alimentación forzada a tres grupos de diez machos y hembras en dosis de 0, 400, 1.000 y 4.000 mg/kg. La dosis mayor representó la dosis de máximo riesgo. Otro grupo de ratones fue alimentado con una dosis de 4.000 mg/kg de seroalbúmina bovina (BSA). Los ratones fueron observados dos veces por día para detectar signos de toxicidad y se registró el consumo de alimento diariamente. El alimento y el agua se proveyeron *ad libitum*. Todos los animales se sacrificaron luego del día 8 y 9 post-administración, y fueron examinados por necropsia. Se colectaron y guardaron aproximadamente 40 muestras de tejido por animal.

#### Resultados y discusión

Los resultados de este estudio (Tabla 1) demuestran, como se esperaba, que la proteína Cry1Ab no es tóxica para los mamíferos. No hubo diferencias significativas en el peso corporal, la ganancia de peso corporal, o el consumo total de alimento entre los grupos control alimentados con el vehículo o BSA y los tratados con la proteína Cry1Ab. Se observaron unos pocos cambios patológicos incidentales en la necropsia, que se distribuyeron al azar entre los grupos, y que son comunes para la cepa de ratones usada en la prueba de laboratorio. Ninguno de estos hallazgos fueron considerados como relacionados con el tratamiento. La

única diferencia significativa observada fue entre las varianzas para los grupos en el total del alimento consumido. Esta diferencia fue causada por el peso ganado por un solo ratón en el grupo control BSA. La eliminación de este dato resultó en una diferencia no significativa en todos los grupos para todos los parámetros analizados.

Tabla 1. Resumen de los resultados del estudio de toxicidad oral aguda con la proteína Cry1Ab

Grupo	Dosis (mg/kg)		Peso corporal (g)			Consumo total de alimento (g/día)
			pre-test	7 días	acumulado	
<b>Machos</b>						
Control vehículo		Media	31,1	30,0	-0,34	5,3BT
Carbonato de sodio		Desvío estándar	1,40	1,72	0,484	0,68
		Tamaño de la muestra	10	10	10	10
Control vehículo	4000	Media	31,1	31,0	-0,18	6,2
Seroalbúmina bovina		Desvío estándar	1,62	0,97	0,646	1,60
		Tamaño de la muestra	10	10	10	10
Cry 1 A(b)	400	Media	31,1	30,5	-0,58	5,3
		Desvío estándar	1,39	1,18	0,702	1,23
		Tamaño de la muestra	10	10	10	10
Cry 1 A(b)	1000	Media	31,0	31,1	0,09	5,3
		Desvío estándar	1,55	1,64	1,111	0,40
		Tamaño de la muestra	10	10	10	10
Cry 1 A(b)	4000	Media	31,0	30,5	-0,53	5,5
		Desvío estándar	1,47	1,87	1,006	1,12
		Tamaño de la muestra	10	10	10	10
<b>Hembras</b>						
Control vehículo		Media	25,5	25,1	-0,38	6,4
Carbonato de sodio		Desvío estándar	1,50	1,53	1,039	2,14
		Tamaño de la muestra	10	10	10	10
Control vehículo	4000	Media	25,4	24,7	-0,64	7,3
Seroalbúmina bovina		Desvío estándar	1,46	1,39	0,691	2,34
		Tamaño de la muestra	10	10	10	10
Cry 1 A(b)	400	Media	25,4	25,2	-0,16	8,0
		Desvío estándar	1,47	2,13	1,198	3,69
		Tamaño de la muestra	10	10	10	10
Cry 1 A(b)	1000	Media	25,3	25,0	-0,38	8,0
		Desvío estándar	1,64	1,36	0,965	2,32
		Tamaño de la muestra	10	10	10	10
Cry 1 A(b)	4000	Media	25,5	25,5	0,04	6,8
		Desvío estándar	1,65	1,70	1,276	2,65
		Tamaño de la muestra	10	10	10	10

\* -- El test de Dunnett (dos colas) indica diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0,05$ )

\*\*--El test de Dunnett (dos colas) indica diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0,01$ )

BT – El test de Barlett indica diferencias significativas entre varianzas de grupos diferentes ( $P \leq 0,01$ )

NA – El test de Dunnett no es apropiado para este grupo/sexo/fecha

### Falta de homología de la proteína Cry1Ab con toxinas proteicas conocidas

La proteína Cry1Ab no muestra una homología de aminoácidos significativa con ninguna de las toxinas proteicas anotadas en las bases de datos de proteínas PIR, EMBL, SwissProt y GenBank, salvo con otras proteínas Bt (Astwood 1995). El análisis de la homología de Cry1Ab con toxinas proteicas conocidas se basó en el hecho de que los patrones de aminoácidos o regiones de alta homología compartidas entre dos o más proteínas pueden dar una idea de la actividad biológica de las mismas. Los resultados de este análisis establecen que no hay homologías biológicamente significativas entre la proteína completa Cry1Ab y las secuencias proteicas de todas las toxinas que se encuentran en las bases de datos.

## Conclusión

En resumen, la proteína Cry1Ab no muestra similitudes en su secuencia de aminoácidos con toxinas proteicas conocidas, salvo con otras proteínas Bt, es rápidamente degradada y su actividad insecticida es destruida en condiciones de digestión simulada. Aún más, no hubo evidencias de toxicidad aguda determinada por la presencia de efectos adversos en ratones sometidos a alimentación forzada con la proteína Cry1Ab. Estos estudios avalan la seguridad de la proteína Cry1Ab y son completamente consistentes con el historial de uso seguro de la proteína Cry1Ab, que ha demostrado ser muy selectiva para insectos, sin ninguna actividad contra otros tipos de organismos vivos tales como mamíferos, peces, aves o invertebrados (EPA 1988).

## Referencias

1. Astwood, J. (1995). *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 insecticidal protein (B.t.k.HD-1 protein) is homologous to proteins of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene family, but not to protein toxins found in public domain sequence databases. Report Number MSL-14283, an unpublished technical report by Monsanto Company.
2. Bietlot, H., Carey, P.R., Choma, C., Kaplan, H., Lessard, T. & Pozsgay, Z. (1989). Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochem J.* **260**, 87-91.
3. Doerfler, W. & Schubert, R. (1997). Fremde DNA im Saugersystem. *Deutsches Arzteblatt* **94**, 51-52.
4. EPA (1988). Guidance for the registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as an active ingredient. NTIS PB 89-164198.
5. Huber, H.E. & Lüthy, P. (1981). *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: composition and activation. In *Pathogenesis of Invertebrate Microbial Diseases*. E.W. Davidson, ed. pp. 209-234, Allanheld, Osmun Publishers, New Jersey, U.S.A.
6. Lee, T.C., Bailey, M., Sims, S.R., Zeng, J., Smith, C.E., Shariff, A., Holden, L.R. & Sanders, P.R. (1995). Assessment of the Equivalence of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 Protein Produced in *Escherichia coli* and European Corn Borer Resistant Corn. Study Number 94-01-39-09, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43533204.
7. Naylor, M. (1992). Acute Oral Toxicity Study of Btk HD-1 Tryptic Core Protein in Albino Mice. Study Number 92069, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43468001.
8. OECD (2000): Report of the task force for the safety of novel foods and feeds. C(2000)86/ADD1 Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
9. Ream, J.E. (1994). Assessment of the In Vitro Digestive Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 Protein. Study Number 93-01-39-04, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43439201.
10. Sleisenger, M.H. & Fordtran, J.S. (1989). *Gastrointestinal Disease*. Volume 1, Pathophysiology Diagnosis Management. 4th Edition. W.B. Saunders Co., Toronto. pp 685-689.



## Capítulo 11- Potencial alergénico

### Alergenos alimentarios

Las alergias alimentarias son reacciones adversas a un alimento o componente alimentario inofensivo que involucra una respuesta anormal del sistema inmune del organismo a proteínas específicas de los alimentos. Las verdaderas alergias alimentarias pueden incluir varios tipos de respuestas inmunológicas (Sampson & Burks 1996). Las más comunes están mediadas por anticuerpos del tipo de las inmunoglobulinas E (IgE)<sup>b</sup> específicas de alérgeno. Las reacciones mediadas por IgE se conocen como reacciones de hipersensibilidad inmediata porque los síntomas ocurren dentro de los minutos o pocas horas luego de la ingestión del alimento. Estas reacciones pueden ocurrir frente al polen, esporas del moho, caspa de animales, veneno de insectos y otros estímulos ambientales, así como alimentos. Estas reacciones afectan a alrededor del 10-25% de la población en los países desarrollados (Mekori 1996). Las alergias alimentarias representan una pequeña fracción de todas las enfermedades alérgicas, afectando a menos del 2,5% de la población en los países desarrollados (Anderson 1996). Los niños pequeños son comúnmente más afectados por las alergias alimentarias mediadas por IgE que los adultos, siendo la prevalencia entre los niños menores a 3 años tan alta como el 5-8% (Bock 1987; Sampson 1990).

Las alergias alimentarias también incluyen reacciones mediadas por células, que involucran linfocitos sensibilizados capaces de unirse a los tejidos, en lugar de anticuerpos (Sampson 1990). En las reacciones mediadas por células los síntomas ocurren a las 8 horas o más de la ingestión. El papel de los alimentos en las reacciones mediadas por células es aún incierto (Burks & Sampson 1993), pero la enfermedad celíaca, conocida también como enteropatía sensible al gluten, afecta a uno de cada 300 a 3.000 individuos en la población, dependiendo de la región geográfica. La enteropatía sensible al gluten es un síndrome de mala absorción caracterizado por la pérdida de peso, anemia, diarrea y dolor óseo, entre otros síntomas. Tanto las alergias alimentarias mediadas por IgE como la enteropatía sensible al gluten son tratadas con dietas que evitan especialmente la ingestión de ciertos alimentos. Como en ambos casos la dosis umbral es muy baja, se debe tener mucho cuidado al elaborar una dieta específica segura.

#### Los 8 grandes alérgenos alimentarios:

Los 8 alérgenos alimentarios más comunes causan más del 90% de todas las reacciones alérgicas alimentarias. Éstos son:

leche	frutos de mar (crustáceos y moluscos)
huevos	trigo
pescado	maní (cacahuete)
soja	nueces

La Comisión del Codex Alimentarius ha adoptado una lista de los alérgenos alimentarios más comunes a nivel mundial asociados con reacciones mediadas por IgE. Esta lista incluye al maní (cacahuete), soja, leche, huevos, pescado, crustáceos, trigo y nueces. Estos alérgenos comunes son los responsables de más del 90% de todas las reacciones contra los alimentos moderadas a severas, aunque una búsqueda detallada en la literatura reveló que hay más de 160 alimentos asociados con reacciones alérgicas esporádicas (Hefle 1996).

Las reacciones alérgicas a las frutas frescas y hortalizas, incluidas en el llamado “síndrome alérgico oral”, son también comunes (Parker 1990), aunque estos alimentos no están en la lista de la Comisión del Codex Alimentarius porque los síntomas son generalmente muy leves y restringidos a la región orofaríngea, y estos alérgenos son inestables frente a la cocción y digestión. La lista establecida por la Comisión del Codex Alimentarius también incluye al gluten presente en los cereales (trigo, centeno, cebada y avena), implicado en la etiología de la enteropatía sensible al gluten.

<sup>b</sup> La IgE, o inmunoglobulina E, es un anticuerpo que reconoce a un alérgeno. La IgE circula en la sangre y se fija a la superficie de ciertas células (basófilos y mastocitos). Cuando la IgE de la superficie de estas células se une al alérgeno, se dispara la liberación de mediadores químicos que provocan los síntomas asociados a las reacciones alérgicas.

Casi todos los alérgenos alimentarios son proteínas, aunque existe la posibilidad de que otros componentes del alimento puedan actuar como haptenos<sup>c</sup>. Por ejemplo, las proteínas llamadas prolaminas del trigo, centeno, cebada, etc., están involucradas en la estimulación de la enteropatía sensible al gluten. Mientras los cultivos de los cuales derivan los alimentos que constituyen la dieta básica contienen decenas de miles de proteínas diferentes, relativamente pocas son alérgicas. La distribución de estas proteínas varía de planta en planta y puede ser influenciada por factores ambientales, como el clima y las enfermedades. El mejoramiento convencional introduce en los cultivos una diversidad adicional en las proteínas, pero esto tiene un efecto muy pequeño (si es que tiene algún efecto) sobre el potencial alérgico de nuestros principales alimentos.

Secuencias de alérgenos de alimentos de origen vegetal<sup>1</sup>

Especie	Nombre común	Alérgeno	Sinónimo/función	Acceso <sup>2</sup>
<i>Arachis hypogea</i>	maní o cacahuete	Ara h 1	Clon P41b	L34402
			Clon 5A1	L33402
			Clon P17	L38853
		lectina de maní	Aglutinina	S14765
<i>Bertholletia excelsa</i>	nuez de Brasil	Ber e 1	2S albúmina (gen BE2E 1)	X54490
<i>Brassica juncea</i>	mostaza parda	Bra j IE-L	2S albúmina (cadena larga)	S35592
		Bra j IE-S	2S albúmina (cadena corta)	S35591
<i>Carica papaya</i>	papaya	papaína		M15203
<i>Glycine max</i>	soja		glicinina	
			subunidad A1aBx	X02985
			subunidad A2B1a	Y00398
			subunidad A3B4	M10962
			subunidad G1	X15121
			subunidad G2	X15122
			subunidad G3	X15123
			beta-conglicinina	
			subunidad alfa	X17698
			subunidad CGA	S44893
	lectina de soja	aglutinina de soja o soya	K00821	
	inhibidor de tripsina Kuntz			
		subtipo Kti-s	X80039	
		subtipo Kti-a	X64447	
		subtipo Kti-b	X64447	
<i>Hordeum vulgare</i>	cebada	Hor v 1	alfa-amilasa/inhibidor de tripsina	S26197
		Hor v 1	alfa-amilasa/inhibidor de tripsina	S26197
<i>Malus domestica</i>	manzana	Mal d 1	profilina	X83672
<i>Oryza sativa</i>	arroz	RAP	Proteína alérgica del arroz	X66257
		RAG1	Alérgeno del arroz 1	D11433
		RAG2	Alérgeno del arroz 2	D11434
		RAG5	Alérgeno del arroz 3	D11430
		RAG14	Alérgeno del arroz 14	D11432
		RAG17	Alérgeno del arroz 17	D11431
<i>Phaseolus vulgaris</i>	poroto o frijol	PR-1	Proteína asociada a la patogénesis 1	S11929
		PR-2	Proteína asociada a la patogénesis 2	S11929
<i>Sinapsis alba</i>	mostaza blanca	Sin a 1.1	2S inhibidor de albúmina/amilasa	S54101
		Sin a 1.2	2S inhibidor de albúmina/amilasa	PC1247
<i>Triticum aestivum</i>	trigo blando	WGA	Aglutinina de germen de trigo A	M25536
		WGA	Aglutinina de germen de trigo D	M25537
<i>Triticum durum</i>	trigo duro	WGA	Aglutinina de germen de trigo	J02961
<i>Triticum turgidum</i>	trigo candeal	Alérgeno 16K	Inhibidor de alfa-amilasa	S19296

1. Adaptado de Metcalfe et al (1996)

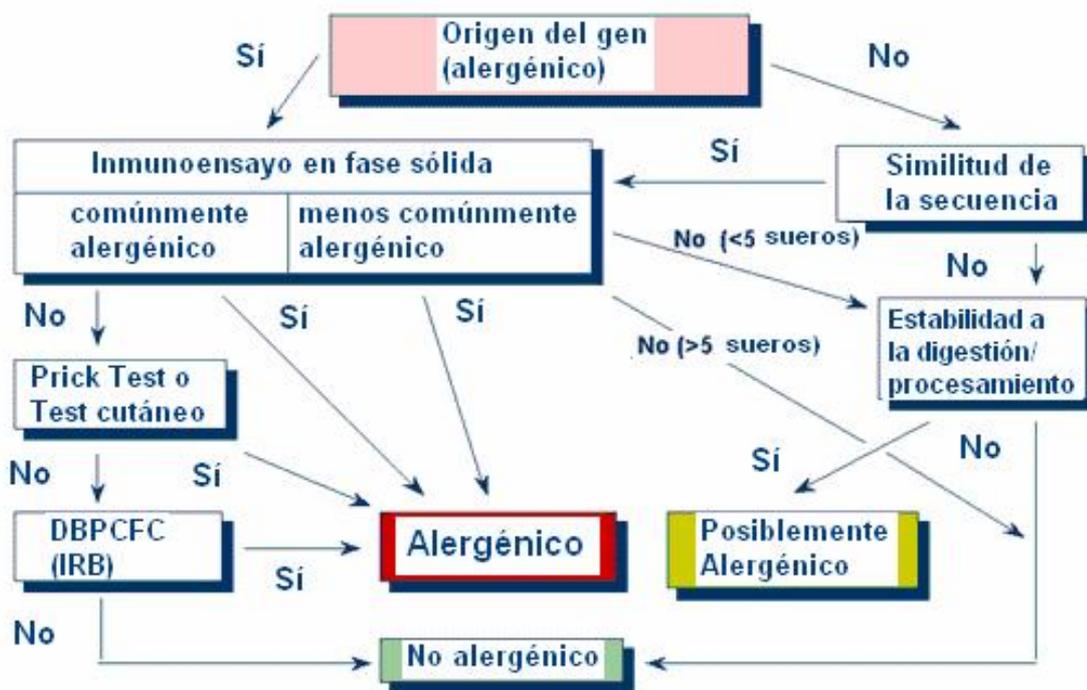
2. Bancos públicos de datos GenBank/EMBL/Genpept ver 86.0, SWISSPROT ver 30, PIR ver 41.

<sup>c</sup> Los haptenos son moléculas pequeñas que pueden interactuar con proteínas del cuerpo o de los alimentos y transformarlas en alérgicas.

### Ensayando el potencial alergénico de los nuevos alimentos

Existe una cierta preocupación sobre la alergenicidad potencial de las proteínas introducidas en la dieta a través de los alimentos derivados de cultivos genéticamente modificados, y sobre las cuales no hay un historial de consumo o cuya fuente no puede ser identificada con precisión. El actual enfoque basado en el árbol de decisiones (Fig. 1, más abajo), desarrollado por el Consejo Internacional de Biotecnología Alimentaria (IFBC) y el grupo de Alergia e Inmunología del Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI) (Metcalfe et al. 1996), requiere el análisis de un número de parámetros que son comunes a muchos de los alérgenos alimentarios. Estas características facilitan la identificación de productos génicos potencialmente alergénicos, aunque ningún criterio único es suficiente para confirmar la alergenicidad o la falta de ella. Los criterios relevantes usados en el árbol de decisiones incluyen:

- Fuente del material genético transferido: se debe tener particular precaución si la fuente de este material contiene alérgenos conocidos.
- Homología de secuencias: La secuencia de aminoácidos de muchos alérgenos está disponible fácilmente.
- Inmunoreactividad de la nueva proteína introducida: Si la nueva proteína es derivada de una fuente de alérgenos conocida, o si tiene homología de secuencia con un alérgeno conocido, entonces se determina la reactividad de esta nueva proteína con las IgE de los sueros de individuos alérgicos.
- Efecto del pH y/o digestión: La mayoría de los alérgenos son resistentes a la acidez gástrica y a las proteasas digestivas (Taylor et al. 1987; Taylor 1992).
- Estabilidad al calor o al procesamiento: los alérgenos lábiles que se ingieren cocidos o sufren otro tipo de procesamiento antes de ser consumidos no requieren particular atención.



Evaluación del potencial alergénico de los alimentos derivados de cultivos genéticamente modificados. Esta figura fue adaptada de un árbol de decisiones desarrollado por el Consejo Internacional de Biotecnología Alimentaria (IFBC) y el grupo de Alergia e Inmunología del Instituto Internacional de Ciencias de la Vida (ILSI) en 1996.

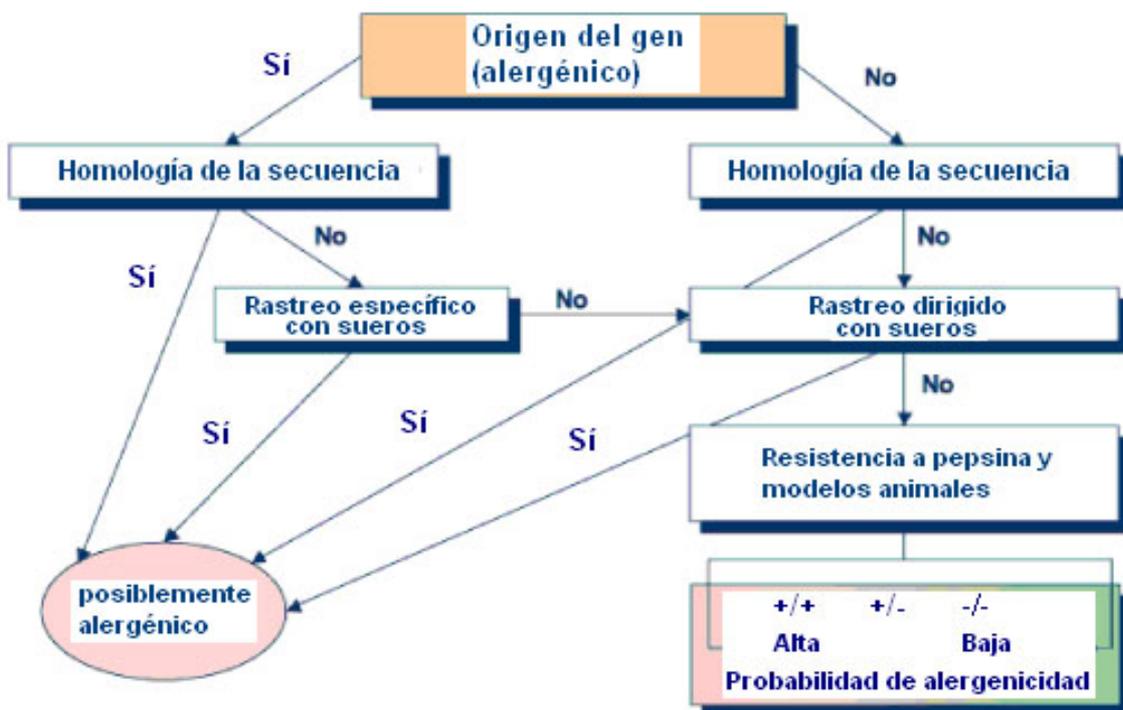
Cuando el alimento genéticamente modificado contiene genes de fuentes sin historial de alergenicidad, el enfoque del árbol de decisiones actual se basa principalmente en la comparación de secuencias con alérgenos conocidos y en la estabilidad de la nueva proteína a la digestión y al procesamiento. Es ampliamente reconocido que estos dos criterios solos pueden no ser suficientes para evaluar el potencial alergénico de los alimentos genéticamente modificados que contienen genes de fuentes sin historial de alergenicidad.

El criterio actual usado para determinar similitudes significativas en las secuencias es el apareamiento de al menos ocho aminoácidos idénticos contiguos (Metcalf et al. 1996), que se basa en la mínima longitud para un epítipo<sup>d</sup> de unión a células T. Este criterio no identifica a epítipes discontinuos o conformacionales que dependen de la estructura terciaria de la proteína (Metcalf et al. 1996), aunque la estabilidad de los alérgenos alimentarios al calor pone en evidencia la significancia de los epítipes lineales en este tipo de alérgenos.

El nivel y lugar de expresión de la nueva proteína son componentes importantes de la evaluación de alergenicidad. Las proteínas nuevas expresadas en relativamente bajas cantidades en el alimento tendrían un limitado potencial de sensibilización alérgica. La mayoría de los alérgenos alimentarios son generalmente proteínas abundantes en los alimentos comunes. Por eso, se debería tomar un cuidado especial con los alimentos genéticamente modificados que contienen proteína nuevas en niveles significativos en el producto final. Las nuevas proteínas que se expresan en las porciones no comestibles de la planta no son motivo de particular preocupación en términos de alergenicidad alimentaria.

**El árbol de decisiones propuesto por FAO/WHO en 2001**

A partir de la Consulta conjunta de FAO/WHO en 2000 sobre los Aspectos de la Seguridad de los Alimentos Genéticamente Modificados de Origen Vegetal, se propuso un nuevo árbol de decisiones para evaluar el potencial alergénico. Este nuevo árbol se basa en el enfoque del árbol de decisiones de 1996 de IFBC/ILSI, pero con algunas diferencias importantes (ver más abajo).



<sup>d</sup> Los epítipes son grupos de aminoácidos dentro de las proteínas que se pueden unir a las células T (epítipo T) o a los anticuerpos IgE. Los epítipes pueden ser lineales o conformacionales.

Contrariamente a los modelos previos, el nuevo árbol de decisiones propuesto requiere de la búsqueda de homología de las secuencias con alérgenos conocidos en todos los casos y no distingue entre fuentes generalmente alérgicas o menos alérgicas con respecto al rastreo específico con sueros. Además, este modelo requiere la prueba con sueros específicos aún en situaciones donde la fuente de genes es no alérgica y donde no se ha encontrado homología de secuencia con alérgenos conocidos.

Dependiendo de la alergenidad o no de la fuente, se recomienda el rastreo con sueros específicos y con sueros direccionados. Los sueros específicos son sueros de pacientes alérgicos al material de la fuente (>10.000 IU/L IgE) y los dirigidos son de pacientes alérgicos a materiales relacionados con la fuente del material génico. En el caso del rastreo con sueros específicos, se recomienda el uso de 24 sueros importantes para asegurar una probabilidad del 99% de detectar a un alérgeno minoritario reactivo para al menos del 20% de la población afectada.

Para el rastreo con sueros direccionados, se distinguen 6 grupos de fuentes de organismos: levaduras/mohos, monocotiledóneas, dicotiledóneas, invertebrados, vertebrados y “otros”. Para rastrear la reactividad cruzada con la proteína expresada se usa un panel de 50 muestras de sueros con altos niveles de IgE contra alérgenos en el grupo de interés. Si se encuentra una reacción positiva, se considera que la proteína expresada es alérgica. Como no se conocen poblaciones de individuos alérgicos (a través de IgE) a proteínas bacterianas, no es factible el rastreo con sueros direccionados en el caso de que la fuente de los genes introducidos sea bacteriana.

Finalmente, en casos donde la homología de secuencia y el rastreo con sueros resultan negativos, se debe someter a la nueva proteína purificada o enriquecida a condiciones de degradación con pepsina para ensayar su estabilidad en condiciones que simular el ambiente gástrico de los mamíferos. Luego del tratamiento, la evidencia de fragmentos intactos o mayores a 3.5 kDa de la nueva proteína sugiere un potencial alérgico para ésta.

Algunos modelos animales que se están desarrollando pueden contribuir con información adicional sobre el potencial alérgico de las nuevas proteínas. Los estudios realizados con ratas Brown Norway han demostrado que luego de repetidas sensibilizaciones orales con ciertos alérgenos alimentarios, la respuesta de anticuerpos inducida se parece a aquella de los pacientes alérgicos. Sin embargo, estos resultados no son aplicables generalmente y no reflejan todos los aspectos de las alergias alimentarias mediadas por IgE. El modelo animal actual no es lo suficientemente robusto como para ser aplicado de rutina.

## Conclusiones

- Todos los alimentos genéticamente modificados y otros alimentos nuevos deben ser evaluados para su alergenidad.
- El árbol de decisiones propuesto en 2001 por FAO/WHO subraya la importancia de la homología de secuencias, del rastreo con sueros específicos o de reactividad cruzada, de los estudios de estabilidad con pepsina y de otros estudios adicionales en animales.
- No son obligatorios los ensayos en humanos.
- Se requieren estudios más profundos para determinar umbrales, si los hay, para la sensibilización alérgica.
- En el futuro, los modelos animales podrían ser herramientas valiosas para predecir alergenidad, pero actualmente son inadecuados.

## CASO DE ESTUDIO MON 810

Se evaluó la alergenicidad potencial de la proteína Cry1Ab expresada en el maíz MON810 analizando: (1) la homología de secuencia con alérgenos conocidos, (2) estabilidad de la proteína ante fluidos gástricos simulados; y (3) el historial de uso seguro de insecticidas microbianos que contienen esta proteína.

### Homología de la secuencia de aminoácidos

Se buscó la similitud de la secuencia de aminoácidos de la proteína Cry1Ab con las secuencias de 219 alérgenos presentes en las bases de datos de dominio público (GenBank, EMBL, PIR, y SwissProt), usando el programa de computación FASTA (Pearson & Lipman 1988). No se encontró ninguna homología significativa (Doolittle 1990) y, basándose en un tamaño de epítipo de 8 aminoácidos contiguos, no se observó ninguna similitud de secuencia inmunológicamente significativa con los alérgenos observados. Se concluyó que los genes introducidos en estos alimentos no codifican para alérgenos conocidos y que la proteína Cry1Ab no comparte secuencias inmunológicamente significativas con alérgenos conocidos.

### Degradación en fluidos gástricos simulados

Los estudios *in vitro* con soluciones digestivas simuladas son muy usados como modelos de la digestión animal. Fueron empleados para investigar la digestibilidad de proteínas vegetales (Nielson, 1988; Marquez & Lajolo 1981), proteínas animales (Zikakis et al. 1977), y aditivos alimentarios (Tilch & Elias 1984) para evaluar la calidad proteica (Akeson & Stahmann 1964), estudiar la digestión en cerdos y aves (Fuller 1991), determinar la velocidad de disolución de tabletas para monitorear la biodegradación con fines farmacéuticos (Alam et al. 1980), y para investigar la liberación controlada de fármacos experimentales (Doherty et al. 1991).

La habilidad de los alérgenos alimentarios de alcanzar y atravesar la mucosa del intestino y entrar así al sistema circulatorio, es un probable prerrequisito para la alergenicidad. Una proteína que es estable a la proteólisis, y a las condiciones ácidas del tracto digestivo, tiene una probabilidad mayor de alcanzar la mucosa intestinal. Muchos alérgenos exhiben estabilidad frente a la proteólisis (King et al. 1967; Kortekangas-Savolainen et al. 1993; Onaderra et al. 1994; Taylor 1992; Taylor et al. 1987; Metcalfe 1985), aunque la mayoría no han sido ensayados aún.

La susceptibilidad de la proteína Cry1Ab a la hidrólisis ácida o proteolítica fue evaluada por incubación de las muestras con la proteína expresada en bacterias en soluciones digestivas simuladas preparadas según la United States Pharmacopeia (1989). El grado de degradación fue determinado por Western blot sobre proteínas separadas por SDS-PAGE y/o por bioensayo en insectos.

El núcleo resistente a tripsina de la proteína Cry1Ab expresada en *E. coli* demostró ser rápidamente degradado *in vitro* usando fluidos digestivos simulados (Ream 1994). Más del 90% de la proteína Cry1Ab inicial fue degradada dentro de los primeros dos minutos de incubación con fluidos gástricos simulados, a juzgar por el ensayo de Western blot. La bioactividad de la proteína Cry1Ab, determinada por el bioensayo en insectos, se redujo en un 74 a un 90% dentro de los dos minutos de incubación. Para poner este ensayo de incubación con fluidos gástricos simulados en perspectiva, se ha estimado que los alimentos sólidos salen del estómago humano, en un 50%, en dos horas, mientras que los líquidos lo hacen en aproximadamente 25 minutos (Sleisenger & Fordtran 1989). Así, toda proteína Cry1Ab consumida sería rápidamente degradada en el sistema gástrico.

### Historial de exposición segura

La proteína Cry1Ab expresada en el maíz MON810 es idéntica a la proteína Cry1Ab contenida en las formulaciones que se han usado comercialmente y de un modo seguro por más de 30 años (EPA MRID no. 43533203; EPA 1988). Estas formulaciones microbianas han sido usadas en una variedad de cultivos, incluyendo hortalizas frescas y sin haberse registrado ningún tipo

de respuesta alérgica, lo que constituye una respuesta contundente a la preocupación sobre la potencial alergenicidad de la proteína Cry1Ab.

### Conclusión

En resumen, los datos de los análisis descriptos más arriba y reunidos en la Tabla 1 indican que la proteína Cry1Ab no deriva de una fuente alergénica, no posee similitudes de secuencia inmunológicamente relevantes con alérgenos conocidos, y no tiene las características típicas de los alérgenos conocidos. Aún más, esta proteína tiene un historial de uso sin evidencias de alergenicidad. Esta información, junto con la digestión extremadamente rápida de esta proteína en condiciones que imitan a la digestión de mamíferos, establece que no hay razones para creer que la proteína Cry1Ab expresada en la planta debería presentar algún riesgo de alergenicidad significativo para el consumo de los productos derivados del maíz MON810.

Tabla 1. Características de proteínas alergénicas conocidas <sup>1</sup>

Característica	Alérgenos	Cry1Ab
Origen alergénico del gen	sí	no
Secuencia similar a alérgenos	sí	no
Estable a la digestión	sí	no
Proteína abundante en el alimento	sí	no

<sup>1</sup> Según Taylor (1992) y Taylor (1987)

### Referencias

1. Akesson, W.R. & Stahmann, M.A. (1964). A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. *J. Nutrition* **83**, 257-261.
2. Alam, A.S., Hagerman, L.M. & Imondi, A.R. (1980). Bioavailability of sulpiride tablet and capsule in dogs. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **247**, 180-189.
3. Anderson, J. A. (1996): Allergic reactions to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S19-S38.
4. Bock, S. A. (1987): Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first three years of life. *Paediatrics* **79**, 683-688.
5. Burks, A. W. & Sampson, H. (1993): Food allergies in children. *Current Problems in Paediatrics* **23**, 230-252.
6. Doherty, A.M., Kalternbronn, J.S., Hudspeth, J.P., Repine, J.T., Roark, W.H., Sircar, I., Tinney, F.J., Connolly, C.J., Hodges, J.C., Taylor, M.D., Batley, B.L., Ryan, M.J., Essenburg, A.D., Rapundalo, S.T., Weishaar, R.E., Humblet, C. & Lunney, E.A. (1991). New inhibitors of human renin that contain novel replacements at the P2 site. *J. Med. Chem.* **34**, 1258-1271.
7. Doolittle, R.F. (1990). Searching through sequence databases. *Methods in Enzymology* **183**, 99-110.
8. EPA (1988). Guidance for the registration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as an active ingredient. NTIS PB 89-164198.
9. EPA MRID no. 4353320: 3 Lee, T.C., Bailey, M., & Sanders, P.R. "Compositional Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 Protein Produced in ECB Resistant Corn and the Commercial Microbial Product, DIPEL®", Study Number 94-01-39-12, an unpublished study conducted by Monsanto Company.
10. FAO/WHO (2001). Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. 22-25 January 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
11. Fuller, M.F. ed. (1991). *In Vitro Digestion for Pigs and Poultry*, C.A.B. International, Wallingford, UK.
12. Hefle, S. L., Nordlee, J. A. & Taylor, S. L. (1996): Allergenic foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S69-S89.
13. King, T.P., Norman, P.S. & Connell, J.J. (1967). Isolation and characterization of allergens from ragweed pollen, IV. *Biochemistry* **6**, 1992-2000.

14. Kortekangas-Savolainen, O., Savolainen, J. & Einarsson, R. (1993). Gastrointestinal stability of baker's yeast allergens: an in vitro study. *Clin. Exp. Allergy* **23**, 587-590.
15. Marquez, U.M.L. & Lajolo, F.M. (1981). Composition and digestibility of albumin, globulins, and glutelins from *Phaseolus vulgaris*. *J. Agric. Food Chem.* **29**, 1068-1074.
16. Mekori, Y. A. (1996): Introduction to allergic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S1-S18.
17. Metcalfe, D.D. (1985). Food allergens. *Clin. Rev. Allergy* **3**, 331-349.
18. Metcalfe, D. D., Astwood, J. D., Townsend, R., Sampson, H. A., Taylor, S. L. & Fuchs, R. L. (1996): Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, S165-S186.
19. Nielson, S.S. (1988). Degradation of bean proteins by endogenous and exogenous proteases - a review. *Cereal Chem.* **65**, 435-442.
20. Onaderra, M., Monsalve, R.I., Mancheno, J.M., Villalba, M., Martinez Del Pozo, A., Gavilanes, G. & Rodriguez, R. (1994). Food mustard allergen interaction with phospholipid vesicles. *Eur. J. of Biochem.* **225**, 609-615.
21. Parker, S. L., Leznoff, A., Sussman, G. L., Tarlo, S. M. & Krondl, M. (1990): Characteristics of patients with food-related complaints. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **86**, 503-511.
22. Pearson, W. & Lipman, D. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.
23. Ream, J.E. (1994). Assessment of the In Vitro Digestive Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 Protein. Study Number 93-01-39-04, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID no. 43439201.
24. Sampson, H. A. (1990): Immunologic mechanisms in adverse reactions to foods. *Immunology and Allergy Clinics of North America* **11**, 701-706.
25. Sampson, H. A. & Burkes, A. W. (1996): Mechanisms of food allergy. *Annual Review of Nutrition* **16**, 161-177.
26. Sleisenger, M.H. & Fordtran, M.D. (1989). Gastrointestinal Disease, Volume 1. In: Pathophysiology Diagnosis Management, 4th, ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
27. Taylor, S.L. 1992. Chemistry and detection of food allergens. *Food Technol.* **39**, 146-152.
28. Taylor, S.L., Lemanske Jr., R.F., Bush, R.K. & Busse, W.W. (1987). Food allergens: Structure and immunologic properties. *Ann. Allergy* **59**, 93-99.
29. Tilch, C. & Elias, P.S. (1984). Investigation of the mutagenicity of ethylphenylglycidate. *Mutation Research* **138**, 1-8.
30. Zikakis, J.P., Rzucidlo, S.J. & Biasotto, N.O. (1977). Persistence of bovine milk xanthine oxidase activity after gastric digestion *in vivo* and *in vitro*. *J. Dairy Sciences* **60**, 533-541.



## Glosario

### **ADN-T**

Segmento de ADN del plásmido inductor de tumor (Ti) de *Agrobacterium tumefaciens* que es transferido dentro del núcleo de las células infectadas, donde se integra en el genoma hospedador y se transcribe.

### **Antisentido**

Hebra de ADN que es complementaria al ARN mensajero

### **Bordes izquierdo y derecho**

Secuencias repetidas de 25 pb que flanquean los extremos izquierdo y derecho del fragmento de ADN-T y que actúan como una señal en *cis* para la maquinaria de transferencia

### **Concatémeros**

Serie de genes unidos covalentemente

### **EMBL**

Laboratorio de Biología Molecular Europeo (*European Molecular Biology Laboratory*), que cuenta con muchos recursos de bioinformática, incluyendo alineamiento de secuencias aminoacídicas y bases de datos de estructura de proteínas.

<http://www.embl-heidelberg.de/Services/index.html>

### **Epigenética**

Estudio de los mecanismos que producen efectos fenotípicos a partir de la actividad génica durante la diferenciación y el desarrollo.

### **GenBank**

Centro Nacional para la Información en Biotecnología (*National Centre for Biotechnology Information*) de Estados Unidos. Cuenta con bases de datos públicas, incluyendo bases de datos de proteínas. La base de datos de proteínas contiene información de las secuencias traducidas a partir de las regiones codificantes de las secuencias de ADN que se encuentran depositadas en el GenBank, EMBL y DDBJ, además de secuencias de proteínas presentadas a PIR, SWISSPROT, PRF, Protein Data Bank (PDB) (secuencias de estructuras resueltas).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>

### **Integrón**

Aquella parte de una construcción genética que se integra en el genoma receptor.

### **Isogénico**

Grupo de líneas que son genéticamente idénticas

### **Metilación de citosinas**

Unión de un grupo metilo a residuos de citosinas en el ADN de los eucariontes y que resulta en la formación de 5-metilcitosina

### **Número de copias**

Número de copias de un transgén que se integraron en el genoma del organismo receptor

### **Péptido señal de tránsito al cloroplasto**

Péptido de tránsito que, al estar fusionado a una proteína, actúa transportando dicha proteína al cloroplasto en una célula vegetal.

### **PIR**

Base de datos internacional de secuencias proteicas (*International Protein Sequence Database de Protein Information Resource*) que contiene información acerca de todas las proteínas que se encuentran en la naturaleza y cuya estructura primaria se conoce.

<http://www-nbrf.georgetown.edu/pirwww/dbinfo/pirpsd.html>

### **Poliadenilación**

Añadición de una secuencia de múltiples adeninas (poliA) en el extremo 3' de un ARNm eucariota luego de la transcripción.

### **Potenciador (*enhancer*)**

Secuencia de ADN que actúa en *cis* y que incrementa la utilización de algunos promotores eucariontes, y que puede funcionar en cualquier orientación y localización (secuencia arriba o secuencia abajo) con respecto al promotor.

**Promotor**

Secuencia de ADN que se encuentra al principio de un gen y que controla su expresión. Los promotores son necesarios para que la ARN polimerasa se una e inicie la transcripción.

**Secuencia del vector plasmídico**

Secuencia de ADN plasmídico que se encuentra por fuera de un marco de lectura abierto y que no se traduce a proteína.

**SwissProt**

Base de datos de secuencias proteicas anotadas, establecida en 1986 y mantenida en colaboración por el *Swiss Institute for Bioinformatics* (SIB) y el *European Bioinformatics Institute* (EBI). <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>

**Tocoferoles**

Cualquiera de los alcoholes que constituyen la vitamina E de la dieta. Se los encuentra en alimentos tales como el aceite de germen de trigo, el aceite de semilla de algodón, la lechuga, la espinaca y la yema de huevo.