

Departamento de Química y Toxicología. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos.

DETECCIÓN Y ENSAYO DE LOS ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Lázaro Núñez Cárdenas¹.

RESUMEN

Con el desarrollo de la Biotecnología, y mediante el uso de la ingeniería genética, se ha logrado la manipulación y transferencia de genes entre organismos vivos de diferentes especies. Todo este proceso es llevado a cabo mediante la aplicación de numerosas técnicas que han contribuido de forma importante al desarrollo de la humanidad. Sin embargo, en el caso particular de los productos obtenidos por medios biotecnológicos, se requiere incrementar el rigor científico para garantizar la inocuidad y seguridad de estos compuestos que son utilizados como alimentos, principios activos de medicamentos, o bioproductos capaces de interactuar con el medio ambiente. Las principales tecnologías que permiten evaluar la presencia de organismos genéticamente modificados (OGM) se basan fundamentalmente en la evaluación del ADN recombinante, o en la detección de la nueva proteína expresada, y que es el producto de las modificaciones hechas en el genoma hospedero. Estos controles han ido en ascenso con el desarrollo de las investigaciones. Sin embargo, en muchos casos el crecimiento exponencial no ha ido aparejado al crecimiento del desarrollo biotecnológico. En el presente trabajo se dan a conocer algunas de las principales técnicas y métodos analíticos utilizadas en la detección de la presencia de un espécimen (animal o vegetal) genéticamente modificado, junto con las bondades, aplicaciones y limitaciones de las mismas.

Descriptor DeCS: Biotecnología / Organismos genéticamente modificados / Organismos transgénicos / Detección / Ensayo.

¹ Máster en Ciencias. Jefe del Proyecto "Detección de organismos genéticamente modificados (OGM) en alimentos." Presidente del Comité Técnico Nacional Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos (CTN-91)

Recibido: 31 de Julio del 2011. Aceptado: 12 de Noviembre del 2011.

Lázaro Núñez Cárdenas. Departamento de Química y Toxicología. INHA Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Calzada de Infanta #1158. La Habana 10300. Cuba. Telefax: 53(7)785919.

Correo electrónico: lanuca35@yahoo.com

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, mediante el uso de la ingeniería genética y la biotecnología, se ha logrado la inserción de material genético foráneo en organismos de diferentes especies. Estos avances, entre otras aplicaciones, han permitido la obtención de plantas que muestran una mayor resistencia a las plagas, a sustancias químicas específicas y/o a los cambios climáticos. Además, ha hecho posible incrementar la producción de determinados compuestos existentes en las especies hospederas, sean éstas de origen animal o vegetal; lograr la expresión de diversas sustancias químicas que inicialmente no formaban parte de su metabolismo, e incluso se ha llevado a cabo el silenciamiento de genes específicos.

Sin embargo, todo proceso de manipulación genética exige del uso de determinadas técnicas de la Biología molecular que permitan garantizar un control adecuado de los nuevos productos biotecnológicos, sobre todas las cosas, en lo relacionado a la evaluación y detección de eventuales perjuicios al ser humano y al medio ambiente.

Los métodos de detección (cualitativos o cuantitativos) de los organismos genéticamente modificados (OGM) se basan, fundamentalmente, en la determinación de las modificaciones introducidas en el ácido desoxirribonucleico (ADN), así como en la detección de las nuevas proteínas secretadas en el organismo genéticamente modificado y que son los productos de la transgénesis. Existe un tercer método que permite determinar la presencia de los OGM a partir del análisis de las variaciones fenotípicas de las especies en estudio, pero solo es aplicable si la transgénesis es evidente en el organismo transgénico, después de comparaciones con el fenotipo de la contraparte no modificado genéticamente.

Métodos de detección de los OGM basados en el análisis del ADN modificado

La reacción en cadena de la polimerasa (referida a lo largo de este trabajo como PCR en alusión a las siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) es el principal método de detección de los OGM a partir de las modificaciones hechas en el ADN nativo. Esta técnica de Biología molecular fue descrita en 1986 por Kary Mullis,¹⁻² y se refiere a la amplificación enzimática de un fragmento de ácido nucleico (ya sea ADN o ARN) que actúa como fragmento original o molde.

Los usos de la PCR son múltiples, pues una vez amplificada la muestra del ADN molde, es posible la identificación de la presencia de microorganismos (virus/bacterias) causante de una enfermedad especificada; la realización de la secuenciación del ADN y el análisis funcional de genes; la identificación de los cadáveres de personas desconocidas; la realización del diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (muy usadas en técnicas forenses y tests de paternidad); y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas, entre otras muchas.¹⁻³

El método de la PCR se basa en la propiedad natural de la enzima polimerasa del ADN de replicar hebras de un ADN molde. Este proceso se logra de manera artificial en un aparato conocido como “termociclador” (que se muestra en la Figura 1) mediante la aplicación de ciclos alternantes de altas y bajas temperaturas que permiten desnaturalizar y renaturalizar, respectivamente, las hebras de ADN recién formadas. Este ciclo se repite varias veces (por lo general 30 en la mayoría de los protocolos) hasta obtener las cantidades deseadas del ADN molde.³⁻⁴

Figura 1. Termociclador empleado en el laboratorio de pertenencia del autor para la amplificación de muestras de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.



En los inicios la técnica era lenta y consumía tiempo valioso, ya que las polimerasas se desnaturalizaban al realizar los cambios de temperatura, y, en consecuencia, era necesario agregar nuevas cantidades de la polimerasa del ADN en cada ciclo. Debido a que las temperaturas de trabajo (del orden de los 95°C) en las fases de desnaturalización del ADN suponen la inmediata desnaturalización de toda proteína. En la actualidad se emplean polimerasas termoestables que han sido extraídas de microorganismos termófilos tales como el *Thermus aquaticus* (la ampliamente usada polimerasa Taq), el *Pyrococcus furiosus* (polimerasa Pfu), el *Thermococcus litoralis* (polimerasa Vent), y el *Thermus thermophilus* (polimerasa Tth).³⁻⁴

El montaje de una técnica tradicional de PCR requiere de tres etapas: extracción y purificación del ADN/ARN (Pre-PCR), la amplificación (la PCR en sí misma, y que puede ser anidada, múltiplex, asimétrica, o asociada a transcripción reversa, de tantos protocolos posibles); y la visualización del resultado logrado (post-PCR). Esto es: una

vez finalizada la amplificación, se deben realizar diferentes procesos para lograr la detección y/o cuantificación de los productos de amplificación (los denominados amplicones), por lo que este tipo de reacción se considera de punto final.³⁻⁴

De forma habitual la PCR se realiza en volúmenes de reacción de 0.2-0.5 mL, mediante el uso de pequeños tubos o placas que se colocan en el termociclador. La reacción consume reactivos y soluciones específicas, como desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs), que actuarán como los sustratos en el proceso de polimerización de la nueva hebra de ADN;¹⁻⁴ cebadores (también denominados *primers* en el argot del laboratorio de Biotecnología), que representan dos secuencias cortas de oligonucleótidos de entre seis a cuarenta nucleótidos (normalmente entre 18 y 22) que son reconocidos por la polimerasa para de esta manera iniciar la reacción; iones divalentes que actúan como cofactores de la polimerasa, y de los cuales el más usado es el magnesio (Mg^{2+}) en la forma salina de cloruro de magnesio ($MgCl_2$); soluciones tampón que proporcionan el pH adecuado para el funcionamiento de la enzima polimerasa;¹⁻⁴ el ADN/ARN molde, que contiene la región de ADN/ARN que se va a amplificar;¹⁻⁴ y la polimerasa del ADN, siendo la polimerasa Taq la más usada en los protocolos publicados, y que se distingue por una temperatura óptima en las cercanías de los 70°C.¹⁻⁴

La PCR, tal y como se realiza en el termociclador, comprende los procesos siguientes: inicialización, desnaturalización, alineamiento (unión del cebador), extensión de la cadena del ADN, elongación final, y verificación. El proceso de inicialización consiste en elevar la temperatura de la reacción hasta los 94-96°C durante aproximadamente 5 minutos (o 98°C si se está usando una polimerasa termoestable

extrema). Este proceso sólo es necesario para las polimerasas que requieran activación por calor.¹⁻⁴ El siguiente paso de desnaturalización puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento de la muestra (94-95°C) el más habitual. La desnaturalización se utiliza para separar las dos hebras que constituyen el ADN molde y posteriormente el ADN sintetizado. La temperatura de trabajo a la cual se decide realizar la desnaturalización de las moléculas de ADN depende, por ejemplo, de la proporción de bases nitrogenadas guanina y citosina (esto es: el contenido G + C) que tenga la hebra, como también del largo de la misma. Existen otros métodos de desnaturalización del ADN, pero son raramente empleados en la técnica de la PCR debido a que se pueden convertir en contaminantes y/o inhibidores de la reacción. De ellos, se pueden mencionar la adición de sales o agentes químicos.¹⁻⁴

Al disminuir la temperatura de la mezcla de reacción entre 50-65°C durante 20-40 segundos (según sea el caso) ocurrirá la unión del cebador a la secuencia complementaria presente en el ADN molde mediante la acción de la polimerasa, los cebadores y los dNTPs. Esta unión solo ocurre cuando la secuencia del cebador es complementaria a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde al cebador, y posteriormente comienza la síntesis de ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.¹⁻⁴ La polimerasa, tomando el ADN molde, actúa para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial, que es necesario para la síntesis del nuevo ADN. La polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN complementaria a la hebra molde, añadiendo los dNTP's específicos en dirección 5'→3', de forma tal que el grupo 5'-fosfato de los dNTPs se une al grupo 3'-hidroxilo del final de la hebra de ADN

creciente. La temperatura para este paso depende de la polimerasa empleada. Para la polimerasa Taq, la temperatura de máxima actividad está entre 70-80°C (comúnmente 72°C). El tiempo de extensión depende tanto de la polimerasa usada, como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. Cuando la temperatura de la ADN polimerasa es óptima, la velocidad de unión será a razón de mil bases por minuto.¹⁻⁴ La elongación final es una etapa única que se lleva a una temperatura de 70-74°C durante 5-15 minutos, tras el último ciclo de PCR, y con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente amplificado.¹⁻⁴ El producto de la PCR se puede almacenar entre 4-15°C durante varios días e incluso semanas. Si se desea conservar los amplicones por un período de tiempo mayor (varios meses), es recomendable que se almacenen a -20°C.¹⁻⁴

El proceso de verificación de la PCR se realiza cuando se usa un termociclador a tiempo final, y consiste en determinar, al final del proceso de polimerización de ADN, la presencia del ADN amplificado. En el caso que se esté empleando un equipo termociclador en tiempo real, la presencia del ADN amplificado se visualiza de forma constante durante todas las etapas del proceso.¹⁻⁴ El proceso de verificación permite cuantificar en tiempo real, la cantidad de ADN/ARN presente en la muestra original, y además identificar de forma casi exacta muestras de ADN específicas a partir de la temperatura de fusión (que se denota mediante el término T_m , que en inglés quiere decir *melting temperature*).

La verificación de la PCR se basa en el empleo de sondas específicas y fluorocromos no específicos (y que son menos sensibles).⁴⁻⁸ En las técnicas basadas en fluorocromos, el ADN se une al fluoróforo (que generalmente es el SYBR Green), y así emite una señal fluorescente

que es medida por un termociclador apto para *Real Time PCR*. Este método permite cuantificar sólo una secuencia por reacción, pero tiene la ventaja de utilizar cebadores convencionales para la realización de la amplificación. El método PCR con fluorocromos es mucho más económico que la realización de una *Real Time PCR* con sondas específicas.⁴⁻⁸

La PCR con sondas específicas se basa en la unión de una sonda a dos fluorocromos que hibridan en la zona intermedia entre el cebador directo y el inverso, cuando la sonda está intacta, y que presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET del inglés *Fluorescent Resonant Energy Transfer*). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de la actividad 5'-3' exonucleasa de la polimerasa del ADN. Esto permite monitorear los cambios en el patrón de fluorescencia, y deducir así el nivel de amplificación del gen.⁴⁻⁸ La sonda de degradación *Taqman* aprovecha la actividad exonucleasa 5'-3' de la polimerasa Taq para dividir una sonda de degradación durante la PCR. La sonda puede ser un oligonucleótido de entre 20-30 bases de longitud, con una temperatura de 10°C superior a la de los cebadores, y contiene un colorante delator fluorescente en el extremo 5' y un colorante inhibidor en el extremo 3'. Como este extremo está bloqueado, la sonda no puede extenderse como cebador.⁴⁻⁸

Las balizas moleculares son sondas de ADN diseñadas para contener una estructura en forma de pirueta y se diseñan de manera tal que las secuencias del estrechamiento sean mutuamente complementarias. Los extremos 5'-3' de la sonda se unen covalentemente a un fluoróforo y a un inhibidor. Al cerrarse esta estructura de pirueta, el fluoróforo y el inhibidor se aproximan, y todos los fotones emitidos por

el fluoróforo son absorbidos por el inhibidor.⁴⁻⁸

La gran sensibilidad de la PCR, a su vez, puede convertirse en uno de sus grandes inconvenientes, por lo que es necesario realizar la optimización de los diferentes parámetros de la reacción para así disminuir al máximo la contaminación, y por lo tanto, la posibilidad de obtener "falsos positivos". Por consiguiente, se han desarrollado numerosas técnicas y procesos de optimización de la PCR.⁴⁻⁸ La contaminación con ADNs extraños se puede solucionar con el diseño de protocolos y procedimientos que permitan la realización, en locales diferentes, de cada una de las tareas que se llevarán a cabo para la realización de la PCR, tales como un área de extracción y purificación del ADN, otra área pre-PCR (donde se preparan las soluciones a utilizar en la PCR), el área PCR (donde se realiza la PCR); y el área post-PCR, que es donde se llevará a cabo la visualización. Además, es imperativa la limpieza exhaustiva, regular y sistemática de los locales y superficies de trabajo.⁴⁻⁸ Otro de los aspectos a tener en cuenta en la mejoría de los procesos de obtención de productos de PCR es el diseño de los *primers*, la correcta preparación de las soluciones tampones y componentes alternativos, así como la preparación y el uso correcto de las enzimas.⁴⁻⁸

En el momento actual se disponen de métodos de PCR a tiempo final y a tiempo real (*Real Time PCR* o sintéticamente: RT-PCR). La RT-PCR, además de cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos amplificados y visualizarlos a tiempo real mientras ocurre la amplificación, se distingue por otros aspectos que marcan diferencias respecto de la PCR a tiempo final, tales como la disminución del tiempo requerido para la obtención de resultados (debido a que no hay necesidad de la etapa post-PCR, y por lo tanto, se anulan los riesgos de

contaminación post-PCR). Además, esta técnica permite la cuantificación directa (absoluta o relativa) de ADN/ARN; si se asocia con la transcripción reversa, es la ideal para la cuantificación de la expresión génica; presenta gran versatilidad, y tiene múltiples aplicaciones como el desarrollo de PCR múltiplex, entre otras.

Métodos de detección de OGM basados en la detección de la proteína transgénica expresada

El ensayo de inmunodetección ligado a enzimas (reconocido por sus siglas en inglés ELISA) se ha convertido en el método por excelencia utilizado para la determinación de la presencia de un OGM a partir de la proteína transgénica expresada. El método ELISA se basa en el uso de anticuerpos o antígenos específicos marcados con una enzima para la detección de la proteína de interés presente en la muestra de análisis, y se caracteriza por su alta sensibilidad, y por la posibilidad de discriminar entre cientos de proteínas presentes en la muestra; lo que lo convierte en un método extremadamente sensible y versátil.^{4,9-10}

Los anticuerpos son los reactivos claves en un ELISA, y son proteínas solubles expresadas por el sistema inmunitario en respuesta a una infección provocada por una sustancia extraña (que es denominada “antígeno”). En el caso particular de la detección de los OGMs, el antígeno es la nueva proteína expresada producto del nuevo gen introducido. En la actualidad solo se disponen comercialmente de pocos anticuerpos específicos, dirigidos fundamentalmente a proteínas provenientes de plantas transgénicas.^{4,9-10}

Se han descrito variantes de ELISA útiles para el trabajo de campo, donde se requiera la rápida identificación de un OGM. Una de ellas es la denominada “ELISA en tiras de flujo lateral”, y que consiste en

inmovilizar el anticuerpo que sirva para capturar el antígeno (en este caso, la proteína recombinante) a uno de los extremos de una tira de reacción, mientras que otro anticuerpo (que funciona como un detector) se encuentra en el extremo opuesto, pero no unido de manera directa a la superficie de la banda. Es en este último extremo donde se adiciona la muestra de interés, la cual fluye junto con el anticuerpo detector en la dirección contraria. Si la proteína transgénica, a la cual reconoce de manera específica el anticuerpo de captura, se encuentra presente, reaccionará con el anticuerpo detector para formar una banda colorida. De lo contrario, solamente se observará la banda correspondiente al anticuerpo de control positivo de la reacción. En este formato se reúnen todos los reactivos en un soporte sólido, y mediante el flujo por capilaridad de la muestra en solución, se logra determinar la presencia o ausencia de una determinada proteína, en lo que sería un análisis netamente cualitativo.^{4,9-10} La Figura 2 muestra un ejemplo de tal tipo de tecnología de detección de proteínas transgénicas de interés.

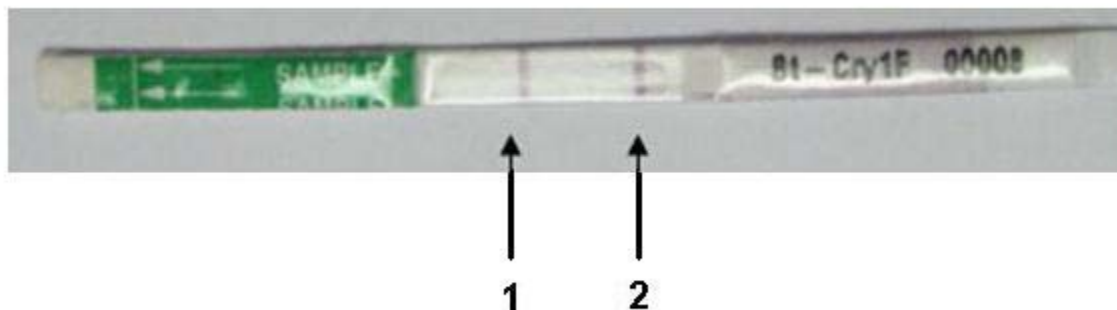
El método ELISA, al ser menos sensible que la PCR, hace que sea más difícil que aparezcan resultados falsos positivos, debido a los bajos niveles de contaminación. Sin embargo, no deben pasarse por alto las desventajas del ELISA: requiere de elevados costos iniciales para la obtención de los anticuerpos y los patrones de proteínas; y no puede discriminar entre diferentes modos y modelos de expresión de varios productos transgénicos que pueden resultar en proteínas similares. Es posible que algunas proteínas transgénicas se formen solo durante ciertas fases del desarrollo del organismo que las contiene, o en determinadas partes de la planta, por lo que resultaría poco probable (en este caso) que estos productos transgénicos sean

determinados por esta técnica, a menos que se conozca con exactitud el origen de la modificación, y el lugar y período de expresión de la proteína.^{4,9-10} Es necesario destacar que los métodos ELISA y PCR son considerados complementarios entre sí, y nunca excluyentes entre ellos, pues la aplicación conjunta de ambas técnicas amplía las posibilidades de detección de los OGM presentes en la muestra de ensayo.^{4,9-10}

exactitud de la técnica de detección, y mejora la precisión del resultado.^{4,9-10}

El “Western Blot” (o también *immunoblot*) es una técnica analítica usada para detectar las proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, tales como un extracto tisular. Mediante una electroforesis en gel, las proteínas se separan mediante la aplicación de corriente eléctrica a la mezcla de proteínas por un período de tiempo; hasta que las proteínas migren y se separen en

Figura 2. Fotografía de una tira ELISA de flujo lateral utilizada para la detección de la proteína transgénica Bt-Cry1F.



Leyenda: Banda 1: Proteína transgénica (Bt-Cry1F) detectada. Banda 2: Proteína pura (Bt-Cry1F) empleada como control positivo del ensayo de detección.

Existen otros métodos de detección de la proteína transgénica, los que se expondrán aquí sucintamente. El uso de partículas electromagnéticas recubiertas del anticuerpo de captura se ha popularizado como formato para inmunoensayos. Las partículas magnéticas, que actúan como superficie sólida de soporte cuando están suspendidas en la mezcla de reacción contenida en un tubo de ensayo, una vez que inmovilizan el antígeno de interés mediante el anticuerpo de captura, se separan del resto de la mezcla utilizando para ello un magneto. Este método presenta una cinética superior, pues las partículas quedan libres para moverse en la solución del ensayo, lo que incrementa la

base a su tamaño. Posteriormente son transferidas a una membrana adsorbente, típicamente de nitrocelulosa o de polivinilidfluoruro (PVDF). Las proteínas transferidas e inmovilizadas sobre el soporte se incuban con anticuerpos específicos marcados, que permiten su visualización. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto, y analizar su cantidad relativa respecto a otras moléculas similares.¹¹⁻¹³ El “Western Blot” es una técnica semicuantitativa, pero altamente específica, y capaz de determinar si la presencia del OGM se encuentra entre los niveles previamente establecidos para su identificación y etiquetado (~0.8 – 5%). Por

la laboriosidad de esta técnica y necesidad de personal debidamente entrenado, no es de las de mayor aplicación para la detección de transgénicos.¹¹⁻¹³

Métodos de detección de OGM basados en la determinación del fenotipo

Este método no se emplea para la identificación de OGM, debido a sus limitaciones en el proceso de generación, lo que significa que la información sobre el grado de variación del fenotipo entre animales o plantas con la misma modificación genética será algo limitada, lo cual dificultará la interpretación de las diferencias.¹¹⁻¹³ Por lo general, las plantas genéticamente modificadas que se encuentran actualmente en el campo presentan la característica de resistencia a herbicida y/o a insectos. La evaluación de la resistencia a insectos de una planta se realiza mediante ensayos biológicos complejos y de larga duración, y por eso, ésta no es una alternativa práctica para el análisis de granos. Sin embargo, la resistencia a herbicidas sí puede ser evaluada mediante ensayos sencillos en condiciones tanto de laboratorio como de campo, pudiendo observarse los resultados de la evaluación de la diferencia fenotípica entre una planta genéticamente modificada resistente a los herbicidas y la planta natural.¹¹⁻¹³

Empleo de nuevos métodos biotecnológicos para la detección de los OGM

Con el incremento de las nuevas tecnologías y su habilidad para realizar diferentes ensayos que pueden estar basados tanto en la presencia de ADN recombinante como de la proteína expresada, han aumentado las probabilidades de detección de los OGM. Asimismo, ha ocurrido una diversificación de tales métodos y ensayos de detección. Ejemplos de todo ello lo

constituyen las nuevas generaciones tecnológicas de micromatrices (que en inglés también se conocen como *microchips* o *microarrays*), que permiten la detección y cuantificación, en un solo ensayo, de la presencia de cientos e incluso miles de secuencias, o proteínas, diferentes.¹⁴⁻¹⁸ Esta técnica de micromatrices se basa en el análisis “ordenado” de fragmentos de ácidos nucleicos, proteínas, o pequeñas moléculas una vez que se inmovilizan sobre un soporte sólido construido según un patrón, orden o arreglo regular, de forma tal que sea posible el análisis en paralelo de estas muestras bioquímicas complejas.¹⁴⁻¹⁸ En el caso de secuencias de ADN, éstas tienen la capacidad de hibridarse con un ADN complementario, el cual, al estar marcado con un fluoróforo, emitirá una señal. La lectura se realiza punto por punto mediante equipos automáticos de barrido que identifican los puntos marcados, y con ello, las secuencias que están presentes en la muestra bajo análisis. En el caso de proteínas, la micromatriz contiene anticuerpos específicos de captura para visualizar diferentes formas de expresión/actividad de la proteína transgénica.

En el futuro esta técnica de micromatrices podrá ser usada para el diagnóstico de las enfermedades, y el seguimiento de la progresión de las mismas, y la respuesta a la terapia; la evaluación de las pérdidas y ganancias de genoma, la clasificación de tumores, la realización de juicios de riesgo y pronóstico, el estudio de las mutaciones del ADN (en particular los polimorfismos de una sola base), y el desarrollo de nuevas drogas y terapias, entre otras aplicaciones.¹⁴⁻¹⁸

Las principales ventajas de las micromatrices son la facilidad de uso y la generación de grandes cantidades de datos en poco tiempo; no requiere de secuenciación a gran escala, el uso de pequeños volúmenes y altas

concentraciones; y que, además, es ideal para el estudio de una gran cantidad de genes en un mismo ensayo, o cuando la muestra de análisis es pequeña.¹⁴⁻¹⁸

CONCLUSIONES

El uso de las tecnologías siempre ha sido considerado una importante contribución al desarrollo de la humanidad. Sin embargo, en el caso particular de los productos obtenidos por medios biotecnológicos, se hace necesario incrementar el rigor científico que garantice la inocuidad de los alimentos ADN modificados, de los fármacos obtenidos por recombinación genética, y los productos textiles provenientes de plantas genéticamente modificadas. En la actualidad, mediante el uso de diversas técnicas de la biología molecular que son capaces de detectar la mínima variación en el genoma de las especies transgénicas, ha sido posible desarrollar un sistema de normas y procedimientos que garantizan, no solo la seguridad de los seres humanos, sino también la seguridad del equilibrio natural, pues no se debe olvidar que la ruptura del eslabón más débil de la biodiversidad (animal o vegetal) podría causar efectos irreversibles que atentarian contra la existencia de la vida en el planeta. Es por este motivo que debe existir un crecimiento similar entre los métodos utilizados por el hombre para su desarrollo científico y las metodologías establecidas para garantizar la aplicación exitosa de los avances biotecnológicos.

SUMMARY

With the development of Biotechnology, and through the use of genetic engineering, the manipulation and transfer of genes between living organisms from different species have been accomplished. These whole processes are carried out by means of several techniques that have importantly contributed to the development

of mankind. However, in the peculiar case of biotechnological products, increasing the scientific rigor is required in order to guarantee the innocuousness and safety of these components used as foods, active principles of drugs, or bioproducts able to interact with the environment. The main technologies allowing the evaluation of the presence of genetically modified organisms (GMO) are based upon the assessment of recombinant DNA, or the detection of the newly expressed protein, which, in turn, is the product of modifications made in the hosting genome. These controls have been increasing at the same rate as research has developed. However, in many cases the exponential growth observed in these areas has not paralleled the growth of biotechnological progress. Some of the main techniques and analytical methods used for detection of a genetically modified specimen (either animal or vegetable) are presented in this work, along with their benefits, applications, and limitations.

Subject headings: Biotechnology / Genetically Modified Organisms / Transgenics / Detection.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bartlett JMS, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2003;226:3-6.
2. Mullis K. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American* 1990;262:56-61, 64-5.
3. Sambrook J, Russell DW. En: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Third Edition. Cold Spring Harbor. NY: 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-576-5.
4. Querci M, Van Den Eede G, Jermini M. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en alimentos. Ginebra: 2007. ISBN-978-92-79-04831-9. Número de catalogo: LB-X1-07-033-ES-C.
5. Ahmed FE. Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology* 2002;20:215-23.

6. Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. Bioquímica. Tercera Edición. Addison-Wesley. New York: 2003. ISBN 84-7892-053-2.
7. Hardegger, M. Brodmann, P. y Hermann, A. Quantitative detection of the 35s promoter and the *nos* terminator using quantitative competitive PCR. European Food Research Technology 1999;209:83-7.
8. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Molecular biology of the gene. Quinta Edición. Benjamin Cummings. San Francisco: 2004. ISBN 0-321-22368-3.
9. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975;98;503-17.
10. Holst-Jensen A, Rønning S, Løvseth A, Berdal KG. PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). Anal Bioanal Chem 2003;375:985-93.
11. Hongbao M, Kuan-Jiunn Sh. Western blotting method. J Am Science 2006;4: 23-7.
12. Corley RB. A guide to methods in the biomedical sciences. Springer-Verlag. Berlin: 2005. ISBN 978-0-387-22844-0.
13. Stave JW. Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO- future needs. Food Control 1999; 10:367-74.
14. Tozzini AC. Detección de OGM en la cadena alimentaria. Disponible en: <http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotech/parte9-cap4.pdf>. Fecha de última visita: 24 de Enero del 2011.
15. FAO Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Biotecnología agrícola para países en desarrollo. Resultados de un foro. Roma: 2009. ISBN 92-5-304702-X.
16. Schena M, Heller R, Theriault TP, Honrad K, Lachenmeier E, Davis RW. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. Trends in Biotechnology 1998;16:301-6.
17. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. Nat Genet 1999;21 (1 Suppl):10-4.
18. Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M. Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. Nature Reviews Genetics 2006;7;55-65.