

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A. C.

**Soya transgénica: detección en alimentos y efectos de su consumo
subcrónico**

en un modelo animal

Por

Javier Abednego Magaña Gómez

Tesis aprobada por:

Coordinación de Nutrición

Corno requisito parcial para obtener el grado de

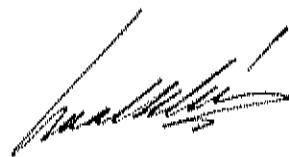
1-lennosillo, Sonora

Maestría en Ciencias

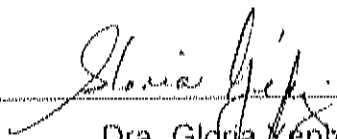
Septiembre de 2003

APROBACIÓN

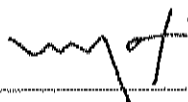
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Javier Abednego Magaña Gómez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. Ana María Calderón de la Barca
Directora de Tesis



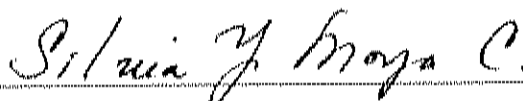
Dra. Gloria Repiz Plascencia
Asesora



Dra. María Islas Osuna
Asesora



Dr. Mauro E. Valencia Juillerat
Asesor

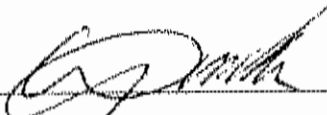


Dra. Silvia Y. Moya Camarena
Asesora

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar créditos al CIAD, previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, de la directora de tesis.



Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD)** por darme la oportunidad de continuar mi formación profesional, con todo lo que implica: profesores de excelencia, personal, laboratorios y tiempo.

A **CONACyT** por el apoyo económico para hacer posible esta etapa en mi formación.

A mi directora de tesis **Dra. Ana María Calderón de la Barca**, por compartir sus conocimientos y tiempo, por impulsarme y motivarme en este proceso. Dra., Ana María, más que gracias por introducirme al "*negocio de las papas fritas*".

A mi comité de Tesis, **Dra. Gloria Yepiz Plascencia, Dra. Mary A. Islas Osuna, Dra. Silvia Y. Moya y Dr. Mauro E. Valencia**, por su tiempo y paciencia, disponibilidad para resolver "problemitas técnicos", por hacer de la biología molecular y nutrición algo más que interesante.

A **Adriana Bolaños** por su apoyo constante "tan sutil" y **René Valenzuela**, quien hacía magia para conseguir las cosas necesarias y sacar tiempo para ayudar.

A las personas del laboratorio de Biología Molecular: **Alma, Karina, Carmen y Gracia**, por ablandar el terreno al compartir conocimientos y habilidades.

A mis amigos de generación de maestría, **Di, Poncho, Ana L. y Cony**, porque fueron un apoyo en momentos claves.

A **Nidia**, por acompañarme a lo largo de este camino.

A **Sara, Sarahí, Mary, Liliana, Gaby, Danny, Jenny y Samuel**.

A **Dios**, por darme la sabiduría y fortaleza para llegar al final de esta etapa.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mis padres, **Javier** y **Rosa** quienes me dieron la inercia para crecer en muchos aspectos y a mis hermanos **Rosa**, **Carolina** y **Néstor**, porque es un logro de todos.

A cada miembro de la **familia Gómez**.

A mi familia adoptiva, **Pastor José Orona** y **Ruth Nidez** y a mi gran familia de la **IBEM** y la **PIB**.

A mi asesora, **Ana María Calderón de la Barca**.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	xi

Capítulo 1: Detección por PCR de un transgen en productos de soya utilizados como ingrediente para formular alimentos

RESUMEN	2
ANTECEDENTES	3
OBJETIVOS DEL CAPÍTULO	6
General.....	6
Específicos	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Muestras analizadas.....	7
Preparación de ADN.....	7
Detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa	9
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
Calidad del ADNg	12
Detección de transgenes en muestras procesadas.....	13
CONCLUSIONES.....	18
BIBLIOGRAFÍA	19

Capítulo 2: Evaluación biológica de la ingestión subcrónica de soya transgénica en un modelo animal

INTRODUCCIÓN	22
ANTECEDENTES	23
Aceptación y Rechazo de los Alimentos Transgénicos	23
Evaluación de Riesgos	24
Estudios sobre Seguridad de Transgénicos	26
OBJETIVOS DEL CAPÍTULO	28
General	28
Específicos	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Bioensayo	29
Elaboración de Dietas	30
Indicadores de Calidad Proteica	31
Relación neta de proteína (NPR)	31
Relación de eficiencia proteica (PER)	31
Eficiencia alimentaria	31
Conversión proteica	31
Albumina y proteínas totales plasmáticas	32
Evaluación de Expresión Proteica y Genética de dos Tripsinógenos	32
Obtención de tejidos	32
Evaluación de la expresión proteica	32
Evaluación de la expresión genética del ARNm de dos tripsinógenos, por Transcripción Reversa-PCR	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Calidad Proteica de la Dieta	37
Eficiencia Alimentaria	38
Conversión Proteica	39
Albumina y Proteínas Plasmáticas	41
Expresión Proteica y Genética de Tripsinógenos	42
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50

LISTA DE CUADROS

CAPÍTULO 1

Cuadro	Página
1. Oligonucleótidos utilizados en la detección y posiciones en el gen.....	10

CAPÍTULO 2

Cuadro	Página
1. Composición de las dietas preparadas para el bioensayo.....	30
2. Oligonucleótidos utilizados en la detección y posiciones en el gen.....	34
3. Composición de la premezcla para la reacción de síntesis de ADNc, a partir de ARN total.....	35
4. Composición de la premezcla para la amplificación del ADNc por PCR.....	36
5. Valores de NPR (14 días) y PER (28 días), para los animales alimentados con las dietas al 10% de proteína.....	37
6. Valores de albúmina y proteínas totales en ratas de 90 días.....	41
7. Valores de actividad específica de tripsina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína).....	42

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura	Página
1. Electroforesis en gel de agarosa del ADNg de ingredientes proteicos de soya, extraído por tres métodos diferentes.....	12
2. Productos de la amplificación por PCR del gen de la β -conglucina subunidad α [A]) y del promotor 35S [B]) en extractos obtenidos por los tres métodos (A, B y C).....	14
3. Amplificación del gen de la subunidad α de la β -conglucina (A) y del promotor 35S (B) en fuentes proteicas de soya y productos alimenticios de soya.....	15
4. Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica de los amplicones (promotor 35S del CaMV) de las muestras de soya comparados con el genoma del virus CaMV (CaMVG2) por algoritmo Clustal W 1.8.....	16

CAPÍTULO 2

Figura	Página
1. Valores de eficiencia alimentaria en un periodo de 90 días, comparados por tipo de dieta.....	39
2. Valores de conversión proteica en un periodo de 90 días, comparados por tipo de dieta.....	40
3. Rango de concentraciones de ARN total para la detección del ARNm de dos tripsinógenos.....	43
4. Expresión de ARNm de tripsinógeno 1 (A) y ARNm de tripsinógeno catiónico (B) en páncreas de ratas alimentadas con DAS-GM (P1-P6) y DAS-CONV (P7-P12).....	44

5. Expresión de ARNm de insulina 2 a partir de 100 ng de ARN total pancreático de ratas alimentadas con DAS-GM (P1-P6) y DAS-CONV (P7-P12).....	45
6. Control de la expresión de insulina en páncreas, músculo e hígado.....	45

INTRODUCCIÓN GENERAL

La presencia de alimentos transgénicos en la mesa del consumidor es un hecho. Cada vez se oscurece más la oferta de este tipo de alimentos, cuyas posibles aplicaciones aumentan constantemente. Se han modificado genéticamente diversos cultivos con la finalidad de mejorar sus características agronómicas, o sus propiedades funcionales y nutricionales para incorporarlos en la cadena alimentaria. Su importancia es tal, que de unos 2 millones de Ha cultivadas con plantas transgénicas en 1996, las cifras aumentaron a casi 12 millones a finales del 2002. Los principales cultivos son 1) soya, maíz, algodón, cañola y papa. Sin embargo, su acogida entre los consumidores no ha estado libre de controversias. Por el contrario, el público desea la garantía de que lo que consume no tenga efectos nocivos en su organismo y medio ambiente. Por ello, las regulaciones acerca de este tipo de alimentos son tema de constante debate.

Entre las regulaciones discutidas se encuentra la evaluación de riesgos del alimento, el etiquetado del producto cuando la presencia del transgénico sobrepasa ciertos niveles, incluso, la rastreabilidad en casos necesarios. Por lo anterior, la detección de los transgénicos es un primer paso y se requieren métodos efectivos, sensibles y estandarizados.

Además del proceso de detección de transgénicos, la evaluación de sus posibles efectos en la salud del consumidor, es algo importante por definir. En la actualidad, existen lineamientos para el proceso de evaluación de riesgos, sin embargo, como se verá con el desarrollo de esta tesis, no siempre son los más adecuados. Es importante considerar la sensibilidad de nuevas técnicas, que permitan explorar a niveles más específicos, el estado de salud del organismo. A la luz de los nuevos resultados, será necesario replantear dicho proceso de evaluación, para proveer al consumidor, alimentos sin riesgos para su salud.

El planteamiento inicial de este trabajo de tesis, fue evaluar los efectos de la ingestión de una genéticamente modificada (GM) *Helicoverpa* *zearitha* Healy,

sobre el estado nutricional y la salud, usando un modelo animal. Por lo tanto, se requirió contar tanto con la fuente de soya genéticamente modificada, como con su línea isogénica. A pesar de que la normatividad vigente en México al inicio del estudio (ver, anexo 2) no incluía una prohibición al respecto, no se pudieron obtener de ninguna compañía, tales productos. Como igualmente se hubiera requerido la verificación de la modificación genética, en la materia prima, se inició desarrollando una técnica de biología molecular para detectar la presencia de la transformación genética en productos de soya. Para ello, se adquirieron varias fuentes comerciales de soya, especialmente algunas que se usaban como ingredientes para formular alimentos, y que tuvieron diferente grado de procesamiento industrial.

Entre los resultados obtenidos de esa primera parte del trabajo, que en el contenido de la tesis conforman el primer capítulo, se detectó un aislado de soya comercial (SUPHO 500E de Dupont), proveniente de un cultivar GM. Este es un ingrediente con 50% de proteína, que se utiliza principalmente en la elaboración de productos cárnicos. Debido a esa aplicación, el grupo que trabaja en CIAD productos cárnicos, había adquirido en 1995 un lote de aislado SUPHO 500E de Protein Technologies Inc. (posteriormente Dupont). Como era de esperar, debido a que en ese año todavía no se comercializaba la soya GM, el lote provenía de soya convencional, como se comprobó en este trabajo,

Así, se decidió evaluar la ingestión subcrónica, en un modelo animal, de ambos ingredientes proteicos, aislados de soya convencional y GM. En un segundo capítulo de esta tesis, se presenta la comparación de indicadores de estado nutricional, calidad proteica y efectos a nivel de expresión genética en diversos tejidos, de ambos tipos de proteína de soya. Al iniciar los bioensayos, junto con el año 2003, se iluminó el camino, debido a la publicación de dos trabajos recién publicados, sobre evaluación de la soya transgénica. Con esa orientación, se trabajó directamente sobre la expresión genética de los genes del páncreas de los animales en estudio.

Capítulo 1

**Detección por PCR de un transgen en productos de soya
utilizados como ingrediente para formular alimentos**

RESUMEN

Las regulaciones internacionales sobre comercialización de organismos transgénicos demandan su detección en los productos alimenticios. En este estudio se probaron 3 métodos de extracción de ADNg en fuentes de proteína de soya usadas como ingrediente en alimentos. Los métodos fueron: A) homogeneización en SDS 1%-guanidina-HCl con extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, B) homogeneización en SDS 1%-β-mercaptoetanol con precipitación salina y C) homogeneización en CTAB y extracción con cloroformo:alcohol isoamílico. Los tres métodos incluyeron digestión con proteasa de *Streptomyces griseus*. La pureza del ADN extraído se midió por la relación A260/280 nm. La calidad se evaluó según su capacidad para simplificar por PCR el gen constitutivo de la β-conglicinina y un fragmento del promotor 35S CaMV que identifica como transgénicos a diversos cultivares. Los mejores resultados se obtuvieron con el método CTAB, ya que permitió la extracción y amplificación del ADNg aun en ingredientes de proteína de soya con mayor procesamiento industrial. Además, éste probó ser útil en la detección del transgen en productos alimenticios finales. De las 12 muestras analizadas, 7 fueron positivas al promotor 35S CaMV, 4 negativas y en sólo una no fue posible la detección de ninguno de los dos genes.

ANTECEDENTES

La soya (*Glycine max*), presenta propiedades nutritivas y funcionales muy útiles para la alimentación humana. Debido a la calidad y bajo costo de su proteína, ésta es una de las fuentes más utilizadas como ingrediente en diversos productos alimenticios para el consumo general, así como en fórmulas de alimentación especial. Dada su importancia económica, el cultivo de soya se ha modificado genéticamente para mejorar algunas de sus características agronómicas, principalmente resistencia a herbicidas (Lin *et al.*, 2001), como es el caso de la soya GTS 40-3-2, creada por Monsanto Canada Inc.

La nueva variedad, tiene como rasgo añadido la tolerancia al glifosato, el ingrediente activo del herbicida Roundup®. Esta especie está destinada tanto al consumo animal, como harina y hojuelas tostadas y desgrasadas, como al consumo humano, principalmente como aceite, proteína y fibra dietaria. La variedad GTS 40-3-2, fue creada para permitir el uso del herbicida glifosato en la producción de soya como una alternativa en el control de maleza. Para ello se le introdujo el gen de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-e-fosfato sintasa (EPSPS), aislado de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CPA, en la variedad comercial "A5403" de Asgrow Seed Company (European Commission, 2000).

El glifosato actúa como inhibidor competitivo de la EPSPS, una enzima esencial en la ruta metabólica del shikimato, involucrada en la producción de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptofano. La inhibición de la enzima resulta en la supresión del crecimiento y la muerte de las plantas. Por ello, el gen insertado en la variedad modificada de soya que codifica una versión de la EPSPS bacteriana, permite que el cultivar pueda cubrir sus requerimientos de aminoácidos aromáticos, mientras las malezas a su alrededor no sobreviven (European Commission, 2000).

El gen EPSPS está ligado a un promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (P-CaMV E35S), que permite su regulación, y con el

terminador de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*. También tiene insertado en el extremo 5' una secuencia de ADN de origen vegetal, codificante de un péptido señal. Este último facilita el transporte de la nueva enzima al cloroplasto, donde se lleva a cabo la ruta del shikimato, así como la acción del glifosato. Al incorporarse la proteína recombinante al cloroplasto, el péptido señal es removido y degradado rápidamente por proteasas específicas (European Commission, 2000).

De acuerdo a estudios estructurales, la EPSPS no tiene antecedentes de alergenicidad, ni toxicidad, ya que es ubicua en la naturaleza y consumida como componente de muchos alimentos (European Commission, 2000). Sin embargo, a pesar de esta aparente inocuidad, al menos para este caso, las regulaciones sobre etiquetado y comercialización de alimentos transgénicos demandan su detección en diversos productos alimenticios. En los países europeos, Japón y Nueva Zelanda, el etiquetado de productos derivados de organismos genéticamente modificados (OGM), es obligatorio cuando contiene más de 1% de material modificado (Mitten *et al.*, 1999; Ahmed, 2002). Aunque en México y otros países no hay obligatoriedad de etiquetado de transgénicos, la comercialización internacional exige rastreabilidad de los productos que se importan o exportan. Así, en una u otra forma, se requieren métodos lo suficientemente sensibles para detectar la presencia de transgenes en ingredientes y productos alimenticios (Kok *et al.*, 2002).

Actualmente existe una variedad de métodos para detección de transgénicos (Lüthy, 1999). Algunos se basan en el estudio de las nuevas proteínas expresadas y pueden ser electroforéticos o inmunoquímicos; otros, van en búsqueda del ácido desoxirribonucleico (ADN) introducido para la modificación (Ahmed, 2002). Incluso hay juegos de reactivos comerciales para detección de materiales específicos (Trucksess, 2001). Sin embargo, una limitación de las pruebas basadas en proteínas es su desnaturalización debido

al tratamiento industrial aplicado al alimento o la especificidad para un solo tipo de alimento (Ahmed, 2002).

Uno de los métodos más sensibles, es la amplificación del ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Ahmed, 2002; Kuiper, 1999). Dicho método permite la amplificación *in vitro* de secuencias específicas de nucleótidos por medio de iniciadores oligonucleótidos. En el caso de las plantas transgénicas, se utilizan iniciadores que detecten las secuencias utilizadas para la inserción del transgen en el genoma de la planta. Tal es el caso del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (p35S CaMV), el terminador de la nopalina sintetasa (T-NOS), la octopina sintetasa (OCS) y los terminadores CaMV (Stram *et al.*, 2000). También se pueden detectar genes que dan resistencia a antibióticos, utilizados como marcadores de la inserción del transgen en el genoma hospedero. Un ejemplo, es el gen que confiere resistencia a la kanamicina (neomicina fosfotransferasa) (Kuiper, 1999).

Para una PCR exitosa, el ADN debe tener integridad (por lo menos parcial), pureza y concentración adecuadas. El procesamiento del ingrediente o alimento completo a analizar ya sea térmico, con solventes o de otro tipo, afecta la calidad del ADN (Kuiper, 1999; Terry *et al.*, 2002). En el caso de la soya, se ha aplicado PCR para detectar cultivares transgénicos principalmente en el grano crudo y sólo en un producto cárnico terminado (Lin *et al.*, 2001; Stram *et al.*, 2000; Shirai *et al.*, 1998). No hay estudios de detección en las fuentes de soya utilizadas como ingredientes en alimentos, como harinas, concentrados y aislados, o tratados en otras formas en la formulación de productos terminados.

En este estudio, se probaron tres métodos de extracción de ADN genómico (ADNg) y la posibilidad de detección del transgen en ingredientes y productos con soya. La integridad del ADNg en los tres tipos de extractos se evaluó por la capacidad de amplificar el gen constitutivo de la subunidad α de la β -conglucininina, como control interno. El fragmento del transgen detectado fue el promotor 35S CaMV del virus del mosaico de la coliflor.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

General

Desarrollar metodología basada en PCR para clasificar la naturaleza de la soya que contienen diversos productos alimenticios, en transgénica o convencional, según la presencia o ausencia del promotor 35S del virus de la coliflor.

Específicos

Extraer por diversos métodos el ADNg de cada muestra, con calidad para ser amplificado por PCR.

Determinar por PCR, la presencia o ausencia del evento transgénico en cada muestra estudiada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras Analizadas

Se analizaron distintas fuentes de soya con diferente tratamiento industrial, algunas utilizadas como ingrediente proteínico para formular productos alimenticios y otras, como productos finales. Las muestras de ingrediente proteínico fueron pasta de soya Gamesa, S.A. (PS); grano de soya crudo RAGASA® (GS) y molido; harina desgrasada de soya NUTRISOY® 7B, con tratamiento térmico ligero; harina desgrasada de soya Bakers NUTRISOY®, con tratamiento térmico moderado; y aislados de soya (AS) SUPRO 500E (de dos lotes, 1995 y 2002) y SUPRO X33, de Protein Technologies International (ahora Dupont). Las muestras de productos alimenticios fueron Protina® (Alimentos, S.A., Guatemala), PROTEMAS® (INCAP, Guatemala), galletas de soya Helios (Industrias Helios, Guatemala) y dos fórmulas enterales preparadas en el laboratorio, conteniendo SUPRO 500E de dos lotes (1995 y 2002), respectivamente. Estas formulaciones contenían 7.44 mg/mL de proteína de soya y los demás ingredientes en la proporción recomendada para un producto enteral líquido de uso clínico (WHO, 1999). Cada fórmula fue concentrada 4 veces por ultrafiltración (Amicon, modelo 8200), en membrana PM10.

Preparación de ADN

Se pesaron 70 mg de muestra pulverizada para probar cada método de extracción de ADN_g en los ingredientes proteínicos. El método (A), fue el descrito por Vařtilingom *et al.* (1999), con modificaciones. A cada muestra se le añadieron 890 μ L de buffer TNE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, EDTA

2 mM y SDS 1%), 100 μ L de guanidina HCl 5 M y 10 μ L (20 mg/mL) de proteasa de *Streptomyces griseus* (Sigma). La mezcla se incubó a 60°C durante 2 h, con agitación intermitente por inversión y se centrifugó a 12000 rpm (10500 x g) durante 15 min a temperatura ambiente. Se tomó el sobrenadante y se añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) neutro mezclando por inversión durante 10 min. Este paso se repitió dos veces. Se tomó el sobrenadante y se mezcló por inversión con 0.6 volúmenes de isopropanol. Las muestras fueron centrifugadas de nuevo a 10000 rpm (7267 x g), 10 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%.

El método (B), conocido como Dellaporta, fue el descrito por Tozzini *et al.* (2000), con modificaciones. A las muestras se le agregaron 700 μ L de buffer de extracción (Tris HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, SDS 1%) y se incubaron a 65°C durante 10 min. Posteriormente se les añadieron 10 μ L (20 mg/mL) de proteasa de *Streptomyces griseus* incubándose 30 min a 65°C. Terminado este tiempo se les añadieron 200 μ L de acetato de potasio 5 M, fueron colocadas en hielo durante 10 min y centrifugados a 12000 rpm (10500 x g) durante 10 min a 4°C, hasta obtener un sobrenadante cristalino. Para ello, fue necesario repetir este paso, tres veces. El ADN fue precipitado con 1 volumen de isopropanol y centrifugado a 2000 rpm (290 x g) durante 10 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%.

Al método (C), descrito por Khanuja *et al.* (1999), también se le hicieron modificaciones. La muestra se mezcló con 600 μ L de buffer de extracción precalentado a 60°C (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 0.5 M pH 8.0, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) al 2.5%, β -mercaptoetanol 0.2% (v/v) y polivinilpirrolidona 1%), estos dos últimos se añadieron inmediatamente antes de utilizar el buffer. Las muestras fueron incubadas a 65°C durante 120 min, en agitación y con mezclado regular por inversión. A los 90 min de iniciado el

periodo de incubación se agregaron 10 μL (20 mg/mL) de proteasa de *Streptomyces griseus*. Se centrifugó a 8000 rpm (4650 x g) durante 10 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le añadió 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12000 rpm (10500 x g) durante 10 min. Este paso se repitió dos veces. Al sobrenadante se le añadieron 0.5 volúmenes de NaCl 5 M y 0.6 volúmenes de isopropanol. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y se centrifugó a 10000 rpm (7267 x g) durante 10 min. Se decantó el sobrenadante y el precipitado fue lavado dos veces con etanol al 80%.

La extracción del ADNg de los productos alimenticios y muestras líquidas, se realizó únicamente con el método C. Para los primeros, se utilizaron 70 mg de muestra y se agregaron 600 μL de buffer de extracción y 10 μL (20 mg/mL) de proteasa de *Streptomyces griseus*. En el caso de las fórmulas se utilizó 1 mL de cada una y se agregaron 1.5 mL del buffer y 20 μL de proteasa.

Después de los lavados, el etanol fue evaporado al vacío (Speed Vac®, Savant). Las muestras se resuspendieron en 45 μL de buffer TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) a 37°C y se le añadieron 5 μL de RNAsa A (10 mg/mL), incubándose a 37°C por 30 min. Los extractos de muestras en polvo se resuspendieron en 100 μL de buffer TE y los de las muestras líquidas en 50 μL .

La concentración del ADNg se evaluó por espectrofotometría A_{260} nm y la pureza por la relación $A_{260/280}$ nm. Las lecturas se tomaron en un espectrofotómetro Beckman Du® 530.

Detección por Reacción en Cadena de la Polimerasa

Los oligonucleótidos iniciadores para PCR, fueron diseñados para detectar el gen de la β -conglucininina subunidad α y el promotor 35S CaMV (GenBank número de acceso AB051865 y X04879, respectivamente). Los del

promotor 35S CaMV fueron publicados por Quist y Chapela (2001). Las secuencias se listan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados en la detección y posiciones en el gen

Iniciador	Secuencia	Gen	Posición
35S CaMV (sentido)	5'-CACTACAAATGCCATCATTGCGATA-3'	Promotor 35S CaMV	56-2751
35S CaMV (antisentido)	5'-CTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCGA-3'		
Congli (sentido)	5'-GATTGAAAACCTTGAAGGTTTCGC-3'	β-conglicinina subunidad α	2643-2844††
Congli (antisentido)	5'-CCCTCAAATGAAGACAAAGG-3'		

† 35S CaMV Número de Acceso del GenBank X04879

†† β-conglicinina subunidad α, Número de Acceso del GenBank AB051865

Las reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems) en 25 µL de volumen final conteniendo buffer de PCR (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM pH 8.3, MgCl₂ 15 mM) 1X (Roche), 0.2 mM de cada dNTP, 0.5 µM de cada iniciador, 1 U de DNA polimerasa Taq (Sigma) y 5 µL (40 ng/µL) de ADNg. Los parámetros de PCR fueron: 95°C por 2 min y 40 ciclos con 95°C, 45 s; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min y extensión final a 72°C durante 5 min. En todos los casos se incluyeron controles negativos para confirmar la especificidad de la amplificación, es decir, PCR sin ADN templado y PCR sin oligonucleótidos.

Para la detección se usó electroforesis en gel de agarosa (Sambrook *et al.*, 1989) utilizando buffer TBE (Tris-borato 0.045 M, EDTA 0.001 M) 0.5X. Para analizar el ADNg se utilizó agarosa al 1% y se cargaron 15 µL del extracto con 3 µL de buffer de carga 6X. Como marcador de peso molecular se utilizó

Lambda DNA/*Hind* III (Promega). Para los productos de PCR, la agarosa utilizada fue al 2%, cargando 10 μ L del producto de reacción más 2 μ L de buffer de carga 6X (Sambrook *et al.*, 1989) y como marcador de peso molecular, PCR 100 pb Low Ladder (Sigma).

Los productos de PCR se removieron del gel de agarosa y purificaron utilizando columnas GFX (Pharmacia) y la secuencia nucleotídica se determinó con el método de terminación cadena en el Laboratorio de Evolución Molecular y Sistemática (Laboratory of Molecular and Systematic Evolution) de la Universidad de Arizona. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias depositadas en el banco de genes GenBank por el algoritmo BlastN (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) y comparadas con la secuencia del CaMV (número de acceso en GenBank V00141) usando el programa Clustal W 1.8 (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad del ADNg

El ADNg obtenido por cada uno de los métodos varió según el tipo de muestra probada. El método C que emplea el detergente CTAB, produjo un ADN genómico de mejor calidad, con valores de la relación de absorbancias 260/280 nm entre 1.59 y 1.969. En el gel de agarosa de la Figura 1, se observa el ADNg extraído de algunas de las muestras, con los tres métodos. El método C presentó la mejor opción para la mayoría de las muestras, excepto para la pasta de soya, la cual sólo se visualizó en el extracto obtenido por el método B. Sin embargo, los extractos de este último método contenían impurezas y alta concentración de sales. Esto interfirió en la migración del material genético ya que presentó movilidad retrasada (Figura 1). Tales impurezas podrían también interferir en el análisis por PCR. Por el contrario, el método C, mostró bandas mejor definidas, de alto peso molecular.

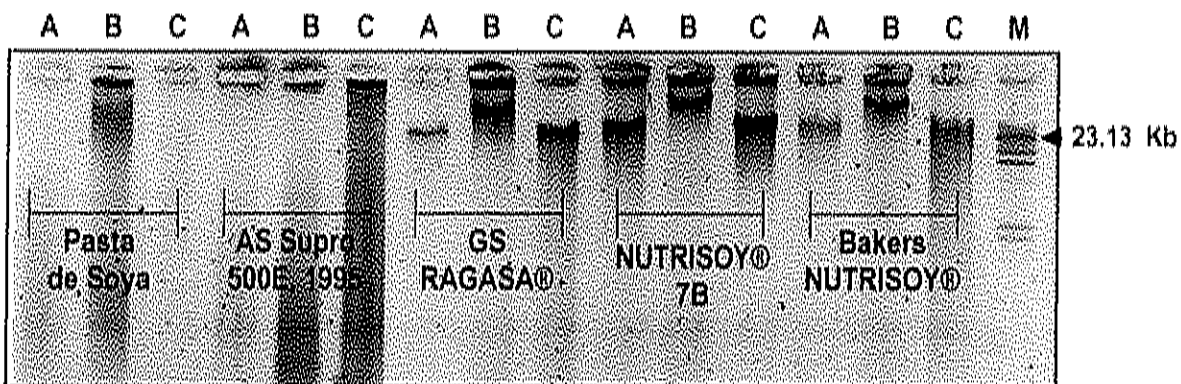


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa del ADNg de ingredientes proteicos de soya, extraído por tres métodos diferentes. A= guanidina HCl, fenol:clorormo:alcohol isoamílico (25:24:1), B= SDS + β -mercaptoetanol y C= CTAB. Marcador de peso molecular λ /Hind III (M).

Detección de transgenes en muestras procesadas

El proceso de extracción de ADNg afecta la integridad del material genético ocasionando rompimiento de las cadenas (Sambrook *et al.*, 1989). Este efecto es aun más intenso en muestras que han sido sometidas a diversos procesamientos. Para probar la calidad del ADNg, se amplificó por PCR un fragmento del gen constitutivo de la soya, la subunidad α de la β -conglucina. La Figura 2A presenta los productos de PCR, analizados por electroforesis, de los tres tipos de extractos, correspondientes a cinco de las muestras. Con el método C, además de obtener mejor calidad del ADNg, como ya se comentó, la amplificación del gen constitutivo fue muy buena para las muestras GS RAGASA®, NUTRISOY® 7B y Bakers NUTRISOY®. Como se observa, el ADNg extraído de esta última por los métodos A y B, no pudo ser amplificado, quizás debido al tratamiento térmico al que se somete durante su elaboración, el cual es más intenso que el de las otras dos muestras. Esto tal vez podría haber inducido interacciones de la proteína con el material genético, requiriendo la presencia de detergente en la extracción, para liberar el ADN.

Por el contrario, la amplificación del gen constitutivo de la pasta de soya sólo fue posible con el material extraído por los métodos A y B (Figura 2A). Para AS Supro 500E del lote de 1995, sólo con el material del método B se dio la amplificación. Sin embargo, al realizar la detección del gen del promotor 35S CaMV, indicativo de la transformación, en pasta de soya, éste resultó positivo con el ADNg extraído por cualquiera de los tres métodos (Figura 2B). Lo mismo sucedió al amplificar este promotor a partir del material extraído de GS RAGASA® y NUTRISOY® 7B, con cualquiera de los tres métodos. La única diferencia, fue que las bandas del amplicón del método B resultaron menos intensas respecto a las otras dos. Las muestras Bakers NUTRISOY® y AS Supro 500E (lote 1995), resultaron negativas para este promotor (Figura 2B).

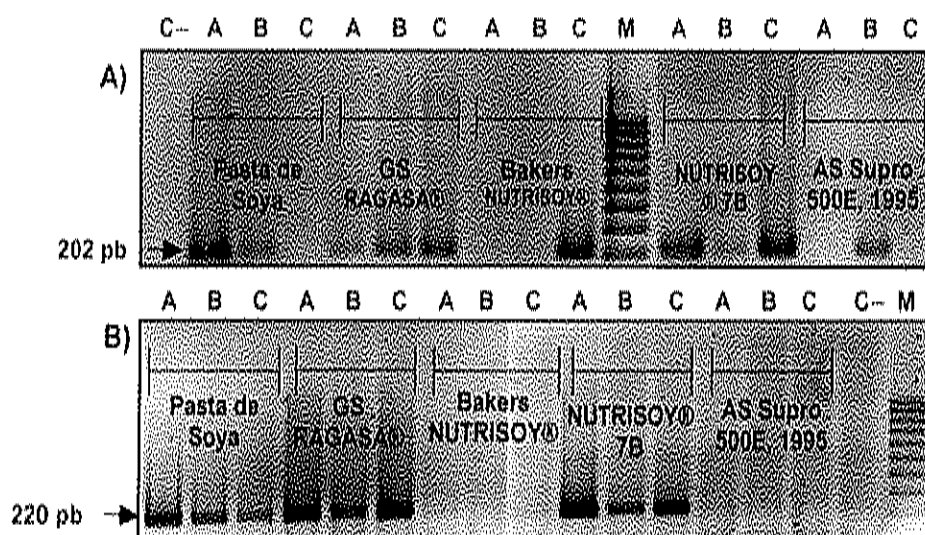


Figura 2. Productos de la amplificación por PCR del gen de la β -conglucina subunidad α [A] y del promotor 35S [B] en extractos obtenidos por los tres métodos (A, B y C). Control negativo (C-); Marcador de peso molecular PCR 100 pb Low Ladder (M).

Así, el método de extracción C que incluye CTAB, fue el más efectivo para la extracción de ADN. Con el material extraído por este método, fue posible la amplificación del gen constitutivo tanto en muestras sin gran proceso industrial como GS RAGASA®, así como en las de mayor proceso como Bakers NUTRISOY®. Por esto, se procedió a aplicarlo en los demás productos muestreados.

Dado que la amplificación del gen de la β -conglucina subunidad α se utilizó como control interno para verificar la calidad del ADN extraído, se esperaba que en todos los casos resultara positiva. La Figura 3 muestra que así fue, excepto para la galleta Helios®. Esto se debió probablemente a su bajo contenido de soya en el producto final, ya que sólo contiene 1.6% de la fuente proteica de soya.

En cuanto al promotor 35S CaMV, siete de las muestras analizadas fueron positivas (Figura 3), lo cual sugiere que se trata de productos transgénicos. Dichas muestras fueron el grano de soya RAGASA®, harina

desgrasada de soya NUTRISOY® 7B, pasta de soya de Gamesa, S.A., AS SUPRO 500 E del lote 2002, la fórmula entera preparada con aislado de soya de este mismo lote, PROTEMAS® y PROTINA®. En términos netos, la detección en las muestras líquidas se hizo a partir de 33 mg de aislado de soya, casi la mitad de la cantidad que contienen las muestras en polvo. El resto de las muestras, resultaron negativas al promotor 35S CaMV por lo que se trata de muestras no transgénicas.

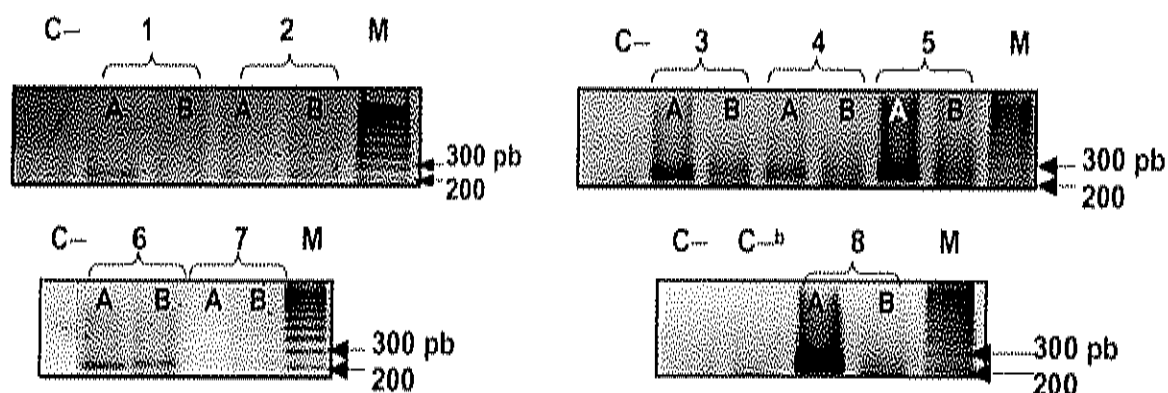


Figura 3. Amplificación del gen de la subunidad α de la β -conglucina (A) y del promotor 35S (B) en fuentes proteicas de soya y productos alimenticios de soya. 1: AS SUPRO 500E lote 1995; 2: PROTEMAS; 3: AS SUPRO 500E lote 2002; 4: AS SUPRO X33; 5: fórmula líquida con AS SUPRO 500E lote 2002; 6: PROTINA; 7: galleta HELIOS; 8: fórmula líquida con AS SUPRO 500E lote 1995. Control negativo sin ADN de p35S (C-); control negativo de subunidad α de β -conglucina sin ADNg (C-b); Marcador de peso molecular PCR 100 pb Low Ladder (M).

En todos los casos se incluyeron controles negativos en las reacciones de PCR conteniendo agua en lugar del ADNg y de forma independiente, omitiendo los oligonucleótidos en la reacción y repitiendo los análisis por lo menos 3 veces para cada muestra. La identidad de los productos amplificados por PCR con los oligonucleótidos iniciadores 35S CaMV fue corroborada por la determinación directa de la secuencia nucleotídica de ambas cadenas en 4 de las muestras. La secuencia fue prácticamente idéntica a la publicada para el CaMVG2 (número de acceso en GenBank V00141), desde la posición 7217 a 7386, una vez que se removieron las secuencias de los oligonucleótidos. El

fragmento fue de idéntica longitud y sólo en los casos de GS y PMS se encontró una base diferente, lo que confirma la presencia del transgen en los productos a base de soya (Figura 4).

GS	1	AAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGAT
CaMVG2	1	AAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGAT
NS7	1	AAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGAT
PS	1	AAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGAT
PMS	1	AAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGAT
consensus	1	AAGGAAAGGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGAT
GS	51	GGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAAACCAC
CaMVG2	51	GGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAAACCAC
NS7	51	GGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAAACCAC
PS	51	GGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAAACCAC
PMS	50	GGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAAACCAC
consensus	51	GGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAAACCAC
GS	101	GTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGGATG
CaMVG2	101	GTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGGATG
NS7	101	GTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGGATG
PS	101	GTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGGATG
PMS	100	GTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGGATG
consensus	101	GTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGGATG
GS	151	ACGCACAATCCCACATATCCT
CaMVG2	151	ACGCACAATCCCACATATCCT
NS7	151	ACGCACAATCCCACATATCCT
PS	151	ACGCACAATCCCACATATCCT
PMS	150	ACGCACAATCCCACATATCCT
consensus	151	ACGCACAATCCCACATATCCT

Figura 4. Alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica de los amplicones (promotor 35S del CaMV) de las muestras de soya comparados con el genoma del virus CaMV (CaMVG2) por algoritmo Clustal W 1.8. GS: grano de soya; NS7: Nutrisoy® 7B; PS: pasta de soya; PMS: prolema; consensus: secuencia consenso. <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>

En un ensayo preliminar, el método conocido como Dellaporta (Tozzini *et al.*, 2000) fue útil en maíz (datos no mostrados) pero con fuentes de soya no fue consistente. El problema principal fue la elevada concentración de proteína, que en el caso de los aislados es de más del 90%. Así que se probaron otros métodos, para muestras con gran cantidad de proteínas y otros metabolitos. Stram *et al.* (2000), detectaron ADN recombinante (ADNrec) en el empanizado de un producto cárnico. Para confirmar sus resultados realizaron la detección en harina de orígenes diferentes. Vařtilingom *et al.* (1999), también detectaron ADNrec por PCR en harinas de soya. En ambos estudios (Stram *et al.*, 2000; Vařtilingom *et al.*, 1999) se usó un juego comercial de reactivos para purificación de ADN previo a la detección y esto encarece el método.

El detergente CTAB, ha sido utilizado para aislar ADNg de muestras frescas y secas con grandes cantidades de carbohidratos, metabolitos secundarios y grasas (Khanuja *et al.* 1999), por eso se incluyó en el presente estudio. Al ensayarlo en fuentes de proteína de soya y productos que las contienen, produjo un ADNg con calidad para PCR. Otra de las ventajas sobre otros métodos, fue la ausencia de fenol en el proceso, que lo hace menos peligroso. Tampoco se utilizó un juego de reactivos comerciales para la purificación previa del ADN, por lo que es menos costoso. La adición de la proteasa de *S. griseus*, junto con el uso de PVP y β -mercaptoetanol favoreció la eliminación de metabolitos secundarios de la planta, que pueden inhibir la PCR.

Los pasos posteriores de detección por PCR también fueron útiles, ya que se logró la amplificación del transgen, aun en la muestra de mayor procesamiento industrial en la que el ADN está bastante degradado. Esto fue posible por el tamaño pequeño seleccionado del amplicón (202 pb para β -conglucina y 220 pb para p35S CaMV), que es menor al mínimo recomendado por Kuiper (1999) del ADNg (aproximadamente de 400 pb) para ser amplificado por PCR. Esto significa que en la muestra existió por lo menos una molécula que contenía fragmentos de ese tamaño en el ADNg preparado.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que la metodología desarrollada para la detección, incluyendo las PCR para verificar la integridad del ADN y la de detección del transgen, fue efectiva. Esta secuencia de pasos, es aplicable para detectar transgenes que contengan el promotor 35S CaMV en toda fuente de proteína de soya utilizada como ingrediente, así como en productos alimenticios terminados. Así mismo, es importante amplificar un gen constitutivo del material como control interno de la reacción. Además, es una ventaja extraer por medio del mismo tratamiento, material genético de muestras de diversa naturaleza, ya que así se podrían trabajar mayor cantidad de muestras al mismo tiempo.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed F E (2002)** Detection of genetically modified organisms in foods. Trends in Biotechnology 20:215-223.
- European Comission (2000)** Training course on the analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. User manual. Disponible en: <http://gmotraining.jrc.it/>. Última fecha de acceso: 04 de agosto de 2003.
- Khanuja S P S, A K Shasany, M P Darokar, S Kumar (1999)** Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter 17:1-7.
- Kok E J, H J M Aarts, A M A Van Hoef, H A Kuiper (2002)** DNA methods: critical review of innovative approaches. Journal of AOAC International 85:797-800.
- Kuiper H A (1999)** Summary report of the ILSI Europe workshop on detection methods for novel foods derived from genetically modified organism. Food Control 10:339-349.
- Lin H Y, J W Chiang, D Y C Shih (2001)** Detection of genetically modified soybeans by PCR method and immunoassay Kits. Journal of Food and Drug Analysis 9:160-166.
- Lüthy J (1999)** Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. Food Control 10:359-361.
- Mitten D, R MacDonald, D Klonus (1999)** Regulation of foods derived from genetically engineered crops. Current Opinion in Biotechnology 10:298-302.
- Quist D, I H Chapela (2001)** Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. Nature 414:541-543.

- Sambrook J, E F Fritsch, T Maniatis (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. 6.2-6.3 p.
- Shirai N, K Momma, S Ozawa, W Hashimoto, M Kito, S Utsumi, K Murata (1998)** Safety assessment of genetically engineered food: detection and monitoring of glyphosate-tolerant soybeans. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62:1461-1464.
- Stram Y, A Vilk, I Klinger (2000)** Detection of residues of genetically modified soybeans in breaded fried turkes cutlets. *Journal of Food Science* 65:604-606.
- Terry C F, N Harris, H C Parkes (2002)** Detection of genetically modified crops and their derivatives: critical steps in sample preparation and extraction. *Journal of AOAC International* 85:768-774.
- Tozzini A C, M C Martinez, M F Lucca (2000)** Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification. *Electronic Journal of Biotechnology* 3:1-5.
- Trucksess M W (2001)** Determination of Cry9C protein in corn-based foods by enzyme-linked immunosorbent assay: interlaboratory study. *Journal of AOAC International* 84:1891-1901.
- Vaithilingom M, H Pijnenburg, F Gendre, P Brignon (1999)** Real-Time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:5261-5266.
- WHO (1999)** Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers. World Health Organization. Geneva. 1-68 p.

Capítulo 2

**Evaluación biológica de la ingestión subcrónica de soya
transgénica en un modelo animal**

INTRODUCCIÓN

La aceptación plena de los alimentos transgénicos en la cadena alimentaria humana aun no es un hecho. Frecuentemente se tienen noticias del rechazo por parte de los consumidores debido a la incertidumbre por sus posibles efectos en la salud. Lo anterior puede ocurrir tanto por la falta de divulgación de la información existente, como por la falta misma de dicha información.

Para el primer caso se requieren mejores canales de comunicación de riesgos. Para combatir el segundo problema, se requieren estudios sobre los posibles efectos a la salud derivados del consumo de los alimentos transgénicos. En las guías de los organismos internacionales, se recomienda evaluar tanto los cambios en la composición nutrimental, como los ensayos de ingestión subcrónica del alimento, en un modelo animal.

En el presente capítulo, se describe la evaluación de los efectos de la ingestión subcrónica de una dieta cuya fuente proteica fue un aislado de soya transgénica, comparada con una dieta preparada con un aislado del mismo tipo, pero no transgénico.

ANTECEDENTES

Aceptación y Rechazo de los Alimentos Transgénicos

Los alimentos transgénicos, actualmente son un tema de debate entre diversos sectores de la población, sin llegar a su aceptación o rechazo absoluto. Haciendo un poco de historia, al introducir los alimentos transgénicos al mercado de Europa a inicios de la década de 1990, no hubo mayor rechazo porque en la etiqueta se especificaba su origen transgénico, permitiendo la libre elección en la compra. En 1998, se detectaron una serie de alimentos que en su composición tenían soya transgénica que no especificaban la modificación en sus etiquetas. Esto dio inicio a muestras de hostilidad en una población alertada por una mala experiencia en el manejo de productos alimenticios, con la enfermedad de las vacas locas. Para levantar mas temores, en el verano del mismo año, se divulgó por televisión un estudio de posibles efectos negativos en la salud, por la ingestión de una papa transgénica (Ewen y Pusztai, 1999)

Con esos antecedentes, el consumidor comenzó a cambiar de actitud hacia los alimentos genéticamente modificados. De acuerdo a los datos publicados por Gaskell *et al.* (2000), en Europa se incrementó de 39% a 53% la oposición hacia los alimentos transgénicos, entre 1996 y 1999. En Estados Unidos de América, también ocurrió un cambio en la percepción del público ya que en 1997, el 78% de la población apoyó la biotecnología, pero a mediados del 2000 la cifra se redujo al 59% (Priest, 2000).

Entre las causas que originan este rechazo está el desconocimiento que la población tiene acerca de los alimentos transgénicos. En diversas encuestas realizada en países emergentes, más de la mitad de la gente entrevistada no ha escuchado o no comprende los conceptos básicos sobre transgénicos (Sittenfeld y Espinoza, 2002).

Evaluación de Riesgos

En respuesta a la demanda de la población por información confiable, los órganos internacionales de salud y seguridad ambiental, procuran evaluar objetivamente los riesgos. Con esa finalidad se creó una guía para dirigir los distintos pasos de evaluación de riesgos (Jonas *et al.*, 1996). Esta guía fue elaborada por el Instituto Internacional de Ciencias para la Vida (ILSI, por sus siglas en inglés), a partir de información de distintas organizaciones como la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, por sus siglas en inglés), Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en inglés), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) y la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés).

Entre los alimentos nuevos a lo que se les aplica la guía mencionada, se encuentran los alimentos e ingredientes de alimentos conteniendo o consistiendo de organismos genéticamente modificados. Los pasos sugeridos por el ILSI para realizar dicha evaluación son contar con una historia del alimento, una evaluación de su seguridad por equivalencia y similitud con su contraparte, información nutrimental y por último, información toxicológica (Jonas *et al.*, 1996).

Un punto clave y muy discutido en este proceso de evaluación es la comparación que se hace del alimento nuevo con su contraparte con una historia segura de uso, lo que corresponde a la aplicación de la "equivalencia sustancial" (Aumaitre *et al.*, 2002). Este término fue desarrollado por la OECD en 1993 como una manera práctica de evaluación de alimentos nuevos (Jonas *et al.*, 1996). La FAO/WHO, estableció que la equivalencia sustancial no sustituye la evaluación de la seguridad sino que es una parte del proceso (Tomlinson, 2003). Básicamente la equivalencia sustancial clasifica al alimento nuevo en una de las tres siguientes categorías: 1) sustancialmente

equivalentes, 2) suficientemente similares, o 3) no equivalentes ni similares, a su contraparte tradicional.

La equivalencia para un alimento completo implica la similitud con su contraparte respecto a su composición, valor nutrimental, metabolismo, uso intencionado y nivel de sustancias indeseables dentro de los límites de la diversidad natural conocida (Jonas *et al.*, 1996; Kuiper *et al.*, 2001). Por ello, ha generado controversia y discusión argumentándose que la demostración de la similitud química de un alimento con su contraparte tradicional, no es suficiente evidencia para decir que es seguro para consumo humano (Millstone *et al.*, 1999). Esto de alguna forma resulta válido ya que si un alimento transgénico cae en la primera categoría, es suficiente para que se establezca su seguridad. Si cae en la categoría dos, es muy probable que sea por el nuevo rasgo insertado, entonces los estudios se enfocan a esa molécula o modificación estructural y sus efectos en las propiedades físicas del alimento. Si cae en la categoría tres se recomienda profundizar en los estudios, sin especificar cuales han de ser éstos (Jonas *et al.*, 1996).

Sin embargo, la aplicación del término equivalencia sustancial, con el tiempo caerá en desuso por la naturaleza misma de las modificaciones que se están realizando. Es decir, dichas modificaciones genéticas ya no sólo son para mejorar las características agronómicas del cultivo, sino también para modificar el alimento en sí mismo en cuanto a contenido de nutrimentos y otros compuestos (Goto *et al.*, 1999; Le Gall *et al.*, 2003; Lönnerdal, 2002; Mehta *et al.*, 2002; Rocheford *et al.*, 2002; Sevenier *et al.*, 2002; Ye *et al.*, 2000). Por lo anterior, los alimentos no serán comparables a su línea isogénica porque la misma modificación los hará diferentes. Una alternativa de evaluación en estos casos será la equivalencia nutrimental del alimento, más que su composición química (Aumaitre *et al.*, 2002). Por lo tanto, el proceso de evaluación de riesgos tendrá que profundizar a varios niveles e integrar los datos obtenidos.

Estudios sobre Seguridad de Transgénicos

Ya se han publicado estudios que investigaron acerca de la seguridad de los transgénicos. En dos de éstos (Brake y Vlachos, 1998; Hammond *et al.*, 1996), encontraron diferencias en algunos indicadores de comportamiento del crecimiento animal y aspecto de órganos. En el primero probaron la seguridad del maíz Bt evento 176, encontrando diferencias significativas en el indicador de conversión alimentaria, siendo mejor con el maíz transgénico. También hallaron diferencias en la producción del músculo *Pectoralis minor* y piel de estas aves. En el segundo trabajo estudiaron soya tolerante al glifosato (CP4 EPSPS) en ratas, pollos, peces y ganado vacuno. Los autores encontraron diferencias en el peso relativo del riñón y en el color del hígado, en ratas. Sin embargo los autores mencionan que como no causan efectos deletéreos, no hay problemas de seguridad. Barriere *et al.* (2001) y Sidhu *et al.* (2000), estudiaron maíz transgénico con distinta modificación genética, sin encontrar diferencias significativas ni en la composición del maíz comparado con su contraparte convencional, ni en el comportamiento nutricional de los animales.

Un estudio de evaluación de seguridad muy controversial fue el publicado por Ewen y Pusztai (1999), quienes estudiaron el efecto de papas transgénicas en el tracto gastrointestinal de ratas. Encontraron que este tipo de papa afectó negativamente el tracto gastrointestinal. Sin embargo, sus resultados fueron muy discutidos debido a la falta de ciertos controles y al número de animales utilizados. Nair *et al.* (2002), concluyeron que la soya transgénica Roundup Ready, de Monsanto Company, era tan segura como su línea isogénica. Sus evaluaciones fueron en cuanto a composición, toxicidad, nutrición y alergenicidad.

Existen estudios que, a diferencia de los anteriores, han analizado a un nivel más profundo los posibles efectos a la salud derivados del consumo de transgénicos. Tal es el caso de los dos trabajos publicados por Malatesta *et al.*

(2002a, 2002b), sobre los efectos de una soya transgénica conteniendo el gen bacteriano CP4 EPSPS administrada a ratones desde la etapa fetal. Los resultados del primer estudio permitieron concluir que la ingestión de soya transgénica alteró la morfología del núcleo de los hepatocitos. Con el segundo estudio concluyeron que la ingestión de la soya transgénica produjo reducción de la expresión y actividad de amilasa pancreática y en los gránulos del zimógeno de las células acinares del páncreas. La expresión de amilasa, la midieron con un ensayo inmunohistoquímico usando anticuerpos anti-amilasa comerciales.

En un trabajo publicado por Fares y El-Sayed (1998), estudiaron la estructura microscópica de enterocitos del ileon de ratones con diferentes dietas basadas en papas transgénicas conteniendo el gen CryI de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cepa HD1. Ellos encontraron cambios microscópicos significativos en diferentes compartimentos celulares como un aspecto degenerado de las mitocondrias y microvellosidades más cortas y de aspecto irregular.

Así, cuando los estudios sobre ingestión de transgénicos se hicieron a niveles macroscópicos, los autores concluyeron que la ingestión del alimento transgénico fue tan segura como la de su contraparte. Sin embargo, en los estudios a niveles microscópicos y moleculares, sí se observaron diferencias. Por eso, es importante seguir investigando a nivel mas fino. Hay que incluir también técnicas de biología molecular ya al alcance de muchos laboratorios, que permitan un estudio integral de los posibles efectos a la salud, por la ingestión de alimentos transgénicos a nivel de expresión de genes.

OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

General

Evaluar la calidad nutricia y los efectos sobre el organismo, de la proteína de soya transgénica, a través de indicadores de absorción y retención de nitrógeno, así como por cambios en la actividad y expresión, como ARNm, del tripsinógeno pancreático, en ratas alimentadas subcrónicamente.

Específicos

Diseñar y elaborar dos dietas (al 10%) para evaluar la calidad proteica con los indicadores NPR y PER, en ratas recién destetadas, basadas en proteína aislada de soya genéticamente modificada (GM) y la misma proteína, sin modificación genética (CONV).

Determinar la eficiencia alimentaria y conversión proteica en ratas alimentadas con dietas conteniendo 18% de proteína de soya GM o convencional, a los 29, 70 y 90 días de ingestión.

Medir los indicadores bioquímicos albúmina plasmática y proteínas totales en las ratas, a los 90 días de bioensayo.

Medir la actividad específica de tripsina pancreática, según la dieta recibida y cuantificar el ARNm para dos zimógenos de tripsina pancreática, comparando sus niveles, según la dieta recibida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un bioensayo para evaluar la calidad nutricia y los efectos en páncreas a nivel molecular, de la ingestión de soya transgénica. Los indicadores utilizados para evaluar la calidad proteica fueron relación neta de proteína (NPR) y relación de eficiencia proteica (PER). Los indicadores del comportamiento alimentario de las ratas fueron eficiencia alimentaria, conversión proteica y proteínas plasmáticas.

Bioensayo

Se usaron 30 ratas macho Wistar, recién destetadas y sometidas a dieta de adaptación (caseína al 10%) durante 2 días. Se dividieron aleatoriamente en 5 grupos de 6 ratas cada uno. Tres grupos se asignaron al azar en jaulas metabólicas (NALGENE) y fueron alimentadas con dietas cuya fuente de proteína formulada al 10% era a) proteína de soya convencional, b) proteína de soya genéticamente modificada y c) libre de nitrógeno. Los dos primeros grupos se alimentaron así durante 28 días y el tercero durante 14 días. Los otros 2 grupos se alojaron en jaulas de mantenimiento y alimentaron con dieta isoenergética al 18% de proteína con a) proteína de soya convencional o b) con proteína de soya genéticamente modificada, durante los primeros 30 días y al 12% los 60 días restantes del bioensayo. Las 30 ratas del estudio estuvieron en condiciones termoreguladas a 23°C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h y agua *ad libitum*. Al término de cada periodo de ensayo señalado, las ratas se anestesiaron con 10 a 15 mg/kg de peso de clorhidrato de tiletamina y clorhidrato de zolazepam (Zoletil 50®) para la extracción de tejidos y posteriormente se sacrificaron por dislocación cervical.

Elaboración de Dietas

Los códigos para las dietas de acuerdo a la fuente y proporción de proteína, se señalan a continuación y en la Tabla 2, se da la composición de cada una.

1. Dieta libre de nitrógeno (DLN)
2. Dieta con aislado de soya (AS) convencional, proteína al 10% (DAS-CONV-10)
3. Dieta con AS genéticamente modificada, proteína al 10% (DAS-GM-10)
4. Dieta con AS convencional, proteína al 18% (DAS-CONV-18)
5. Dieta con AS genéticamente modificada, proteína al 18% (DAS-GM-18)
6. Dieta con AS convencional, proteína al 12% (DAS-CONV-12)
7. Dieta con AS genéticamente modificada, proteína al 12% (DAS-GM-12)

Cuadro 1. Composición de las dietas preparadas para el bioensayo

Componente	DLN (g/kg)	DAS- CONV-10 (g/kg)	DAS- GM-10 (g/kg)	DAS- CONV-18 (g/kg)	DAS- GM-18 (g/kg)	DAS- CONV-12 (g/kg)	DAS- GM-12 (g/kg)
AS SUPRO 500E conv.	---	122	---	219.51	---	147.7	---
AS SUPRO 500E GM	---	---	122	---	219.51	---	146.27
Metionina	---	2.4	2.4	4.32	4.32	2.88	2.88
Minerales	50	49.6	49.6	49.2	49.2	50	50
Vitaminas	10	10	10	10	10	10	10
Celulosa	50	50	50	50	50	50	50
Aceite de maíz	50	49.4	49.4	49	49	49.3	49.3
Colina	2	2	2	2	2	2	2
Sacarosa	419	357.3	357.3	308	308	344	344
Almidón	419	357.3	357.3	308	308	344	344

Indicadores de Calidad Proteica

Relación neta de proteína (NPR)

Para este indicador, se registró el alimento consumido durante 14 días al igual que el peso ganado por cada animal en las dietas al 10% de proteína. El valor de NPR se calculó dividiendo la suma del peso ganado de los animales más el peso perdido por los animales con DLN entre los gramos de proteína consumidos (FAO/WHO, 1991).

Relación de eficiencia proteica (PER)

Se recolectaron los datos del consumo de alimento y ganancia de peso de los animales en las dietas al 10% de proteína, durante 28 días. El valor de PER se calculó dividiendo la ganancia de peso entre los gramos de proteína consumidos (FAO/WHO, 1991).

Eficiencia alimentaria

Se registraron los gramos de alimento consumido en tres periodos, a los 29, 71 y 90 días del bioensayo, así como la ganancia de peso de los animales en los grupos alimentados al 18% y 12% de proteína. La eficiencia se calculó dividiendo la ganancia de peso entre los gramos de alimento consumido (Hammond *et al.*, 1996).

Conversión proteica

Con los datos recabados sobre alimento consumido, se calcularon los gramos de proteína ingeridos en los tres mismos periodos, 29, 71 y 90 días. Los gramos de peso ganado se dividieron entre los gramos de proteína consumida (Hammond *et al.*, 1996).

Albumina y proteínas totales plasmáticas

En los grupos de ratas alimentados por 90 días con dietas primero al 18% y después al 12% de proteína, se colectó sangre por punción cardíaca al sacrificio, en tubos con anticoagulante. El plasma fue separado por centrifugación a 3000 rpm (655 x g), 15 min y almacenado a 4°C hasta su análisis. La albúmina y proteínas totales fueron cuantificadas usando un juego de reactivos comerciales de Randox Laboratories LTD (Cat No. 2018).

Evaluación de Expresión Proteica y Genética de dos Tripsinógenos

Obtención de tejidos

Los tejidos disecados fueron sangre, páncreas, hígado y músculo. Éstos se obtuvieron durante el estado anestesiado del animal, al momento de su sacrificio. Al momento de la extracción, el tejido destinado para análisis genético fue lavado con agua libre de ribonucleasas por tratamiento con dietilpírocarbonato (DEPC) al 0.1% e inmediatamente homogeneizado en 1 mL de TRIzol® Reagent, congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -70°C hasta su análisis. Las porciones de páncreas destinadas al análisis de expresión proteica fueron colocadas en 200 µL de H₂SO₄ 0.125 M y mantenidas en hielo hasta su procesamiento.

Evaluación de la expresión proteica

Las muestras recolectadas en H₂SO₄ 0.125 M fueron homogeneizadas con un homogeneizador Tissue Tearor™ modelo 985370 (Biospec Products, Inc.), en hielo y mezcladas durante 18 h en refrigeración. Terminado este tiempo se centrifugaron a 3000 rpm (655 x g), durante 10 min a 4°C, se separó el sobrenadante y fue dializado contra NaCl 0.1 M toda la noche. Las muestras fueron centrifugadas de nuevo a 5000 rpm (1817 x g) durante 10 min a 4°C y

congeladas hasta su uso. La actividad de tripsina se midió en microplaca. Un volumen de 50 μ L del extracto de la muestra se mezcló con un volumen de 50 μ L de Tris-HCl 50 mM, pH 8.2, CaCl₂ 100.2 mM y a partir de esta mezcla se hicieron 6 diluciones dobles seriadas de 50 μ L en el mismo buffer. Se agregaron 50 μ L de tripsina 20 μ g/mL (Sigma) exógena y se incubaron en agitación durante 1 h. Terminado este tiempo se añadieron 50 μ L de α -N-benzoyl-D-L-Arginina-p-Nitroanilida (BAPNA) (1 mg/mL) diluido en 1/10 con dimetil sulfóxido y aforado con Tris-CaCl₂. Después de 5 min se leyó a 405 nm (modificación del método publicado por Oppert *et al.*, 1997).

Evaluación de la expresión genética del ARNm de dos tripsinógenos, por Transcripción Reversa-PCR

Preparación del ARN total. Para la extracción del ARN total las muestras previamente homogeneizadas en 1 mL de TRIzol®, fueron descongeladas y centrifugadas a 12000 rpm (10500 x g) por 10 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y dejó a temperatura ambiente por 5 min, luego se añadieron 200 μ L de cloroformo. Las muestras fueron agitadas durante 15 seg e incubadas 3 min a temperatura ambiente. Después se centrifugaron a 12000 rpm (10500 x g), 15 min a 4°C y se tomó la fase acuosa (parte superior) conteniendo el ARN.

Para precipitar el ARN, se emplearon 500 μ L de alcohol isopropílico. Se mezclaron por inversión e incubaron a temperatura ambiente por 10 min y fueron centrifugados a 12000 rpm (10500 x g), 10 min a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado se lavó con 1 mL de alcohol etílico 75% mezclando en vortex y centrifugando a 7500 rpm (4090 x g), 5 min a 4°C.

Se eliminó el sobrenadante y el etanol restante fue evaporado al vacío (Speed Vac®, Savant) durante 15 min con calentamiento ligero. El ARN precipitado fue resuspendido en 50 μ L de H₂O DEPC 0.1% favoreciendo la disolución al calentar las muestras durante 5 min a 62°C. Posteriormente fueron

almacenadas a -20°C hasta su uso. La concentración del ARN extraído se estimó por espectrofotometría A_{260} y su calidad de acuerdo a la relación $A_{260}/280$ nm (Sambrook *et al*, 1989) y a su capacidad para amplificar el gen de la insulina.

Detección por RT-PCR. Los oligonucleótidos iniciadores de la transcripción reversa unida a PCR (RT-PCR por sus siglas en inglés) fueron diseñados para detectar los genes del tripsinógeno 1, tripsinógeno catiónico y de la insulina como control interno de la extracción del ARN (número de acceso del GenBank V01273, XM_216132 y NM_019130, respectivamente). Las secuencias se listan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados en la detección y posiciones en el gen

Iniciador	Secuencia	Gen	Posición
rTRY1/Fw (sentido)	5'-GAGCAATTTATCAATGCTGCC-3'	Tripsinógeno 1	265-666 [†]
rTRY1/Rv (antisentido)	5'-ATAGCCCCAGGAGACAATACC-3'		
rCTR/Fw (sentido)	5'-TGCTTCAGTGTCTTGATGCC-3'	Tripsinógeno catiónico	473-886 ^{††}
rCTR/Rv (antisentido)	5'-CTCATTGGCAGCAATTTCC-3'		
rIns/Fw (sentido)	5'-AGCGTGGATTCTTCTACACACC-3'	Insulina 2	134-310 ^{†††}
rIns/Rv (antisentido)	5'-GGTAGAGAGAGCAGATGCTGG-3'		

[†] Tripsinógeno 1, Número de Acceso del GenBank V01273

^{††} Tripsinógeno catiónico, Número de Acceso del GenBank XM_216132

^{†††} Insulina 2, Número de Acceso del GenBank NM_019130

El ARN total extraído fue diluido en agua a 0.05, 0.1 y 0.15 ng/ μ L. Para sintetizar el ADN complementario (ADNc) y detectar los genes de los tripsinógenos, se utilizaron 300 y 200 ng del ARN extraído del páncreas de ratas alimentadas con soya transgénica y soya convencional, respectivamente. Para la detección del gen de insulina se utilizaron 100 ng del ARN total en todos los casos. La síntesis del ADNc se llevó a cabo con la composición de la premezcla de PCR presentada en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Composición de la premezcla para la reacción de síntesis de ADNc, a partir de ARN total

Reactivo	Cantidad (μ L)	Concentración final
H ₂ O Milli-Q	10.48	
MgCl ₂ 25 mM	4	5 mM
Buffer 10X*	2	1X
dATP 100 mM	0.2	1 mM
dCTP 100 mM	0.2	1 mM
dGTP 100 mM	0.2	1 mM
dTTP 100 mM	0.2	1 mM
Oligo dT (0.5 mg/mL)	0.25	6.25 μ g/mL
rRNasin (40 U/ μ L)	0.18	7.5 U

* Buffer 10X: Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM pH 8.3, MgCl₂ 15 mM

Los microtubos para la reacción fueron colocados en hielo y se les añadieron 2 μ L de la dilución correspondiente de ARN. A la premezcla de la RT se le agregaron 0.28 μ L de transcriptasa reversa M-MLV 200 U/ μ L (Sigma) por cada reacción y se mezcló por agitación. De esta premezcla se agregaron 18 μ L a cada microtubo de reacción. Las muestras fueron incubadas a 42°C, 30 min; 95°C, 5 min y enfriadas a 4°C.

Para cada reacción de amplificación, se preparó la premezcla de PCR de acuerdo al Cuadro 4. Esta premezcla fue calentada a 85°C por 3-5 min, se añadieron los oligonucleótidos iniciadores y la enzima Taq DNA polimerasa

(Sigma) y se agregaron 30 μL de esta mezcla a los tubos con el ADNc previamente sintetizado. Para cada gen amplificado se incluyeron controles negativos (H_2O Milli-Q en lugar de ARN) para probar la especificidad de la reacción. El programa de PCR fue el siguiente: 85°C, 30 seg; 94°C, 3 min; 30 ciclos de 94°C, 30 seg; 55°C, 30 seg; 68°C, 30 seg y una extensión final a 68°C, 5 min y enfriadas a 4°C.

Cuadro 4. Composición de la premezcla para la amplificación del ADNc por PCR

Reactivo	Cantidad (μL)	Concentración final (en la premezcla de PCR)
H_2O Milli-Q	21.15	
MgCl_2 25 mM*	4	
Buffer 10X*	3	1X
dATP 100 mM*	0.1	0.33 mM
dCTP 100 mM*	0.1	0.33 mM
dGTP 100 mM*	0.1	0.33 mM
dTTP 100 mM*	0.1	0.33 mM
Iniciador sentido (10 pmol/ μL) *	0.6	6 pmol
Iniciador antisentido (10 pmol/ μL) *	0.6	6 pmol
DNA polimerasa Taq (5 U/ μL) *	0.25	1.25 U por reacción

* La concentración final en la reacción varía debido al buffer de PCR, MgCl_2 y dNTP's residuales de la reacción anterior.

* Añadidos inmediatamente antes de utilizar la premezcla

La detección de los amplicones obtenidos se hizo por medio de electroforesis en gel de agarosa NuSieve (BioWhittaker Molecular Applications) 3:1 al 2% en TBE 0.5X, preteñida con bromuro de etidio (0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La electroforesis se realizó a 90 V durante 45 min. La imagen fue tomada con una cámara digital Olympus® Camedia® C-4040 zoom.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad Proteica de la Dieta

La calidad proteica de la dieta se evaluó con los indicadores NPR y PER. Con el primero, la dieta DAS-GM-10 tuvo una calidad significativamente ($p < 0.05$) mejor respecto a la dieta DAS-CONV-10 (Cuadro 5). Sin embargo, con el indicador PER, que es a 28 días, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre dietas. Dichas diferencias pueden deberse a que el indicador NPR considera la proteína para mantenimiento (Pellet y Young, 1980). Por el contrario, el indicador PER sólo establece la eficiencia con la que la proteína es utilizada para el desarrollo animal. Por lo tanto, en condiciones limitadas de proteína durante el desarrollo, la fuente de éstas influyó en la capacidad del organismo para utilizarlas. Además, como PER se obtiene a partir de un periodo mayor que para NPR, pudiera ser que en un periodo más largo, si había algún efecto negativo menor, el organismo animal se adaptó y lo superó.

Cuadro 5. Valores de NPR (14 días) y PER (28 días), para los animales alimentados con las dietas al 10% de proteína

Fuente proteica en la dieta	NPR	PER
	14 días	28 días
SUPRO 500E Convencional	2.928 ± 0.105 ^a	2.664 ± 0.135 ^a
SUPRO 500E Transgénico	3.127 ± 0.124 ^b	2.784 ± 0.176 ^a

Superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según el tipo de soya

En los distintos estudios en los que se ha evaluado la seguridad de los alimentos transgénicos, no se utilizan estos indicadores, sino otros como eficiencia alimentaria y conversión proteica. Esto porque la ingestión subcrónica considera al menos 3 meses de ingestión y los indicadores de calidad proteica se miden a corto plazo (FAO/WHO, 1991). Sin embargo, es importante considerarlos ya que muestran que la calidad de la proteína de soya transgénica, es tan buena o mejor que la de su contraparte convencional, cuando se evalúa a corto plazo.

Eficiencia Alimentaria

En cuanto a este indicador, según la Figura 1, en el periodo de 29 días, la dieta con AS CONV tuvo un valor significativamente ($p < 0.05$) superior respecto a la dieta con AS transgénico, pero que desapareció en el segundo y tercer periodos. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por Brake y Vlachos (1998), quienes evaluaron el maíz "Bt" Evento 176. Ellos encontraron diferencias significativas en la relación de conversión alimentaria a los 28 y 38 días, siendo ligeramente mejor el maíz convencional que el transgénico. Sin embargo, su estudio duró solo 38 días y no se tienen más datos como para comparar si las diferencias desaparecieron con el tiempo.

Por su parte, Nair *et al.* (2002), evaluaron soya transgénica comparándola con la convencional y no encontraron diferencias en eficiencia alimentaria, después de un periodo de 15 semanas, considerado de consumo subcrónico en ratas. En dicho estudio no se indican los niveles de proteína utilizados para crecimiento y mantenimiento y puede ser algo importante a considerar, como reflejan los resultados para conversión proteica que se describen más adelante. Otros investigadores (Barriere *et al.*, 2001), tampoco encontraron diferencias significativas para el indicador de conversión alimentaria, al evaluar maíz transgénico comparándolo con su línea isogénica.

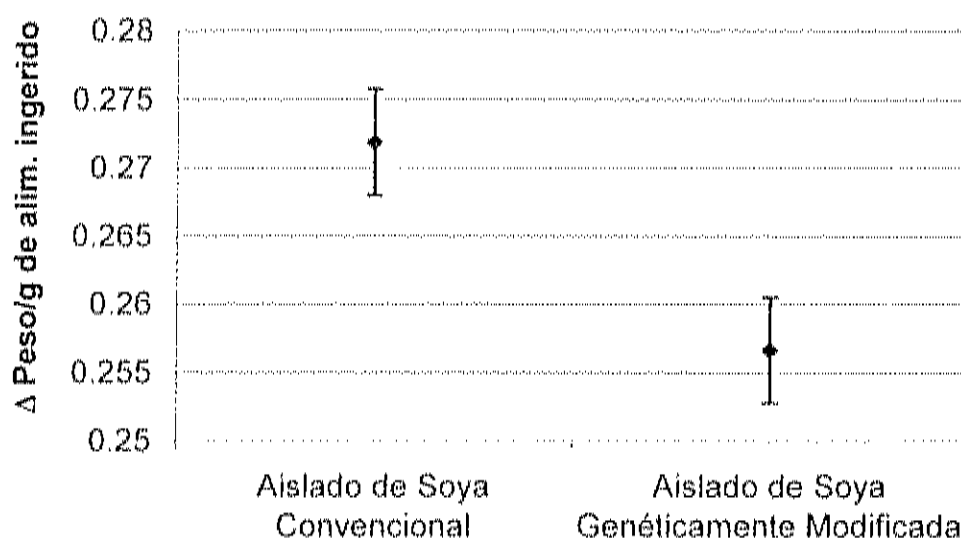


Figura 1. Valores de eficiencia alimentaria en un periodo de 90 días, comparados por tipo de dieta. Los puntos representan el valor de la media \pm error estándar, ajustados por periodo (29, 70 y 90 días) y peso inicial a los 29 días.

Conversión Proteica

Para estos resultados los datos se analizaron mediante un análisis de covarianza, ajustando por periodo (29, 70 y 90 días) y peso inicial a los 90 días. Los resultados de este indicador muestran diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las dietas de soja transgénica y soja convencional, durante el periodo de 90 días de estudio (Figura 2). La proteína de soja convencional resultó mejor que la de soja genéticamente modificada en todos los casos. Estos resultados son diferentes a los obtenidos con el indicador PER, en un primer periodo de evaluación. Esto puede deberse a las condiciones distintas con las que se obtuvieron los resultados. En condiciones limitadas de proteína, el organismo fue igual de eficiente en utilizar la disponible. Sin embargo, en condiciones de exceso, la conversión fue mejor con la proteína de soja convencional, manteniéndose las diferencias significativas ($p < 0.05$) a través del tiempo. La diferencia puede deberse también a que exista un factor antifisiológico de

naturaleza proteica en la soya transgénica, dependiente de la concentración, que afectara en mayor medida a estos animales alimentados con una concentración de proteína total más alta.

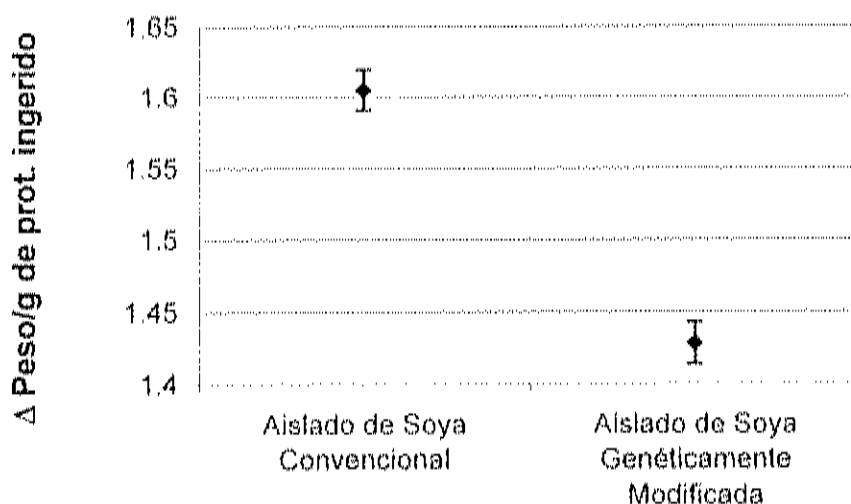


Figura 2. Valores de conversión proteica en un periodo de 90 días, comparados por tipo de dieta. Los puntos representan el valor de la media \pm error estándar, ajustados por periodo (29, 70 y 90 días) y peso inicial a los 29 días.

En un estudio desarrollado por Malatesta *et al.* (2002b), se compararon grupos de ratones expuestos desde la etapa fetal, a través de la alimentación de las madres, a soya transgénica y convencional. Los autores encontraron diferencias significativas desde el primer mes después de la ablactación de las crías en el área total y porcentaje de gránulos de zimógeno en células acinares del páncreas. A partir del segundo mes, hubieron diferencias significativas en la actividad de α -amilasa del mismo origen. La diferencia fue a favor de la soya convencional. No se verificó en tal estudio, si la expresión y actividad de las proteasas pancreáticas se afectó, ya que también estas últimas se producen como zimógenos en células acinares. Lo que sí midieron fue la actividad de los inhibidores de tripsina, que son factores antifisiológicos importantes en la soya y tienen efecto negativo similar al descrito en células acinares. Aunque publicaron que no había diferencia entre los dos tipos de soya en cuanto a concentración

de inhibidores de tripsina, no se investigó si otros compuestos pudiesen contribuir al efecto negativo encontrado. Al igual que en su estudio, en el nuestro los niveles de inhibidores de tripsina de ambos ingredientes proteicos (GM y CONV), fueron no solo similares, sino que el nivel en la soya GM fue un 43% del encontrado en la convencional. Por ello el efecto no se puede atribuir a inhibidores de tripsina.

Como en el estudio presente se usó de la soya sólo la proteína, y los resultados de la ingestión subcrónica se vieron afectados para la transgénica, se podría pensar que el compuesto que afectó la conversión proteica a largo plazo fuera de naturaleza proteica. Además, de que el efecto negativo aparenta ser dependiente de la dosis.

Albumina y Proteínas Plasmáticas

Para estos indicadores, no hubo diferencias entre los grupos, de acuerdo al tipo de dieta consumida (Cuadro 6). Lo anterior significa que aun cuando existieron diferencias en algunos indicadores de alimentación, éstas no afectaron negativamente el estado nutricional de las ratas. Los valores se encuentran en los niveles normales y sin diferencias entre grupos.

Cuadro 6. Valores de albúmina y proteínas totales en ratas de 90 días

Dieta	Albumina (g/dL)	Proteínas Tot. (g/dL)
CONV	1.89 ± 0.04 ^a	5.27 ± 0.43 ^a
GM	1.95 ± 0.15 ^a	5.47 ± 0.33 ^a

Superíndices diferentes entre filas indican diferencias significativas ($p < 0.05$), según el tipo de dieta.

Expresión Proteica y Genética de Tripsinógenos

Los resultados de la actividad específica de tripsina por mg de proteína se presentan en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Valores de actividad específica de tripsina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)

Extracto	Actividad específica de tripsina ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína)
1 GM	44.79
2 GM	4.34
3 GM	157.72
4 GM	59.00
5 GM	118.02
6 GM	57.11
7 CONV	55.31
8 CONV	56.33
9 CONV	54.43
10 CONV	53.17
11 CONV	61.85
12 CONV	54.87

Los valores obtenidos fueron analizados por una prueba T para varianzas no equivalentes Aspin-Welch. Ello por la variabilidad en los datos del primer grupo (GM), cuyo promedio fue de $73.5 \mu\text{g}$ de tripsina/mg de proteína con una desviación estándar (d.e.) de $55.06 \mu\text{g}$ de tripsina/mg de proteína. Esto no fue así con los datos del segundo grupo (CONV), cuya promedio fue de $55.99 \mu\text{g}$ de tripsina/mg de proteína con una d.e. de $3.05 \mu\text{g}$ de tripsina/mg. De acuerdo a esta prueba no hubieron diferencias significativas ($p = 0.472$) entre

tratamientos. Es decir, a nivel de actividad específica de tripsina, aun cuando no existen diferencias significativas, sí hubo un efecto en su comportamiento en el grupo alimentado con DAS-GM respecto al alimentado con DAS-CONV.

A nivel de expresión del ARNm los resultados fueron semejantes en comportamiento a los de actividad específica de tripsina. En ensayos previos de detección del ARNm de tripsinógenos en el páncreas de las ratas alimentadas con DAS-GM, no se obtuvieron amplificaciones con la concentración de ARN total utilizada (100 ng). Por ello, se probaron diferentes concentraciones de ARN total para obtener el valor óptimo. De acuerdo a la Figura 3, al utilizar 300 ng para la detección de ambos tripsinógenos, se obtuvieron bandas más definidas por lo que se utilizó esta concentración para la detección.

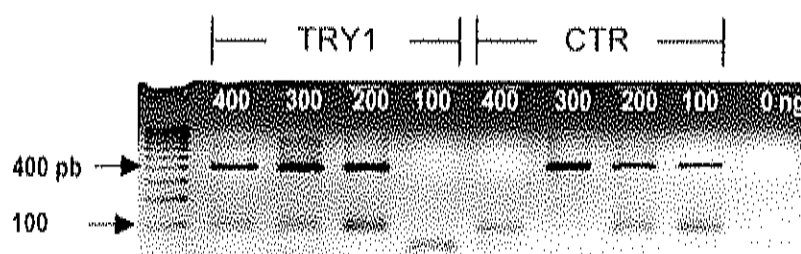


Figura 3. Rango de concentraciones de ARN total para la detección del ARNm de dos tripsinógenos. TRY1: tripsinógeno 1; CTR: tripsinógeno catiónico.

De acuerdo a la Figura 4, los patrones de expresión entre dietas fueron diferentes entre sí. La detección de los tripsinógenos en las muestras con DAS-GM, fue casi nula en todas las muestras excepto en P3 y P4, para tripsinógeno 1 en la que se observan bandas discretas y en P6 con la que se obtuvo una banda semejante a las del tratamiento con DAS-CONV para ambos tripsinógenos. Sin embargo, la banda de P6, al igual que las otras del mismo tratamiento (P1-P6), se obtuvo a partir de 300 ng de ARN total a diferencia de las del tratamiento con soya convencional, que fue a partir de 200 ng. En las muestras de DAS-CONV se observa una mayor constancia en la intensidad de las bandas, para los dos tripsinógenos.

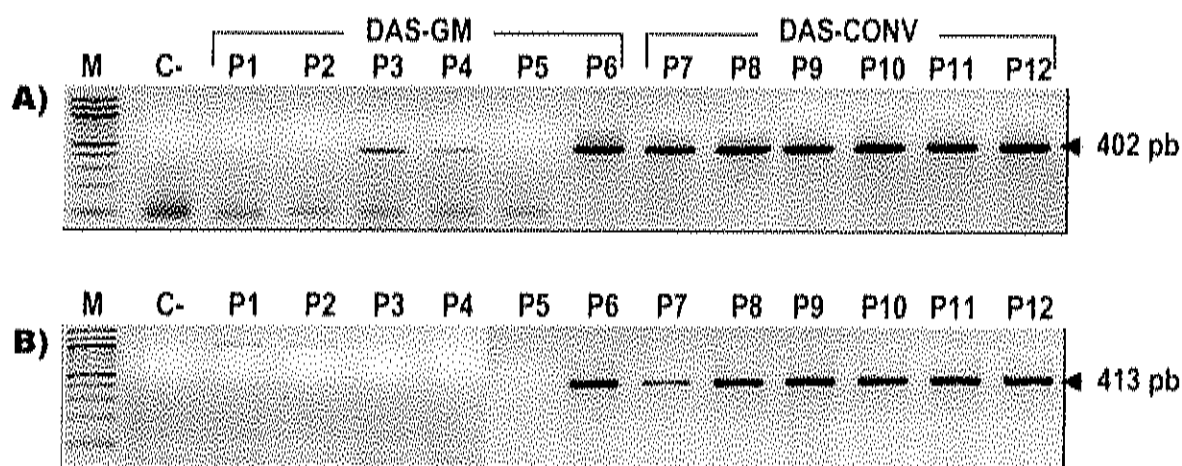


Figura 4. Expresión de ARNm de tripsinógeno 1 (A) y ARNm de tripsinógeno catiónico (B) en páncreas de ratas alimentadas con DAS-GM (P1-P6) y DAS-CONV (P7-P12). Las amplificaciones por RT-PCR se realizaron usando 300 ng de ARN total para las muestras P1-P6 y 200 ng de ARN total para P7-P12. C-: control negativo; M: marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (Biolabs)

Para confirmar si estas diferencias fueron por el tratamiento y no por indisponibilidad del ARN, se amplificó el gen de insulina 2 a partir de una misma cantidad de ARN total de páncreas y de músculo e hígado para probar la especificidad del tejido. En la Figura 5 se observa que todas las muestras de páncreas resultaron positivas a este ARNm, lo que indica la disponibilidad del material genético para ser utilizado en PCR. Además, la intensidad de bandas fue semejante entre sí, excepto para las muestras P1 y P2, que se ven más tenues por lo que existe homogeneidad en la concentración. En estas mismas muestras se observan bandas por arriba de 600 pb, debidas probablemente a contaminación con ADNg. En la Figura 6 se muestra la amplificación del mismo gen en distintos tejidos, siendo positiva únicamente en páncreas y también hígado, aunque con bandas menos intensas respecto a la de páncreas. Estos resultados confirmaron la especificidad del tejido que se extrajo. En el caso de la amplificación positiva para este ARNm en hígado, puede deberse al origen común en su formación, lo que convierte al hígado en un órgano con el potencial para producir insulina (Polonsky y Bell, 2003).

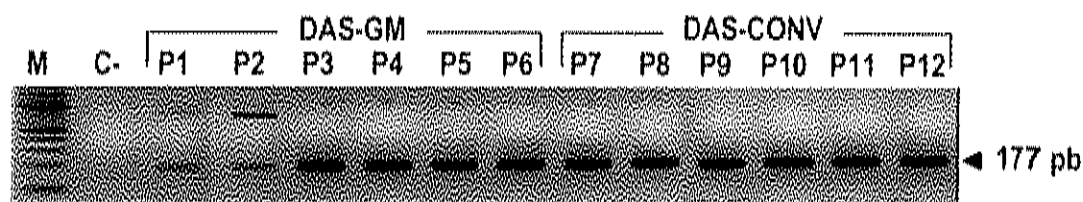


Figura 5. Expresión de ARNm de insulina 2 a partir de 100 ng de ARN total pancreático de ratas alimentadas con DAS-GM (P1-P6) y DAS-CONV (P7-P12). C-: control negativo; M: marcador 100 pb DNA ladder (Biolabs).

De lo anterior se puede inferir que la variabilidad en la actividad específica de tripsina y en la expresión genética de los dos tripsinógenos en páncreas puede atribuirse al tratamiento dietario recibido. Es decir, la naturaleza transgénica de la fuente proteica de la dieta, afectó los niveles de actividad y expresión de los tripsinógenos.

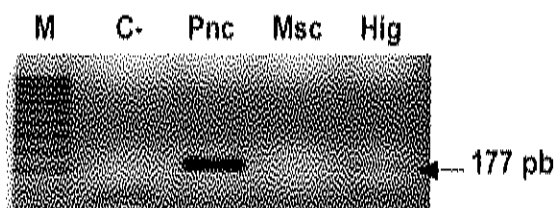


Figura 6. Control de la expresión de insulina en páncreas, músculo e hígado. M: marcador de peso molecular PCR 100 pb Low Ladder (Sigma), C-: control negativo, Pnc: páncreas, Msc: músculo e Hig: hígado de rata.

Nuestros resultados son acordes a los obtenidos por Malatesta *et al.* (2002b). Ellos encontraron disminuidos los niveles de α -amilasa pancreática a partir del segundo mes de estudio pero sin diferencias en los niveles séricos de esta misma enzima, en ratones cuya fuente proteica fue grano de soya de naturaleza transgénica. También encontraron menor el área total y granular de zimógenos, sin medir específicamente alguno de ellos.

Hasta donde sabemos, no se han publicado estudios que busquen diferencias a niveles moleculares y genéticos, por ello no podemos comparar estos resultados con otros. Sólo podemos hipotetizar la razón de estos hallazgos.

La función exócrina del páncreas está regulada en parte por los sustratos de la dieta, cambiando proporcionalmente a la cantidad de éstos en la dieta (Brannon, 1990; Dubick *et al.*, 1988; Hara *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 2000). Dichas adaptaciones también ocurren en otras especies 0 como camarones (Muhlía-Almazan *et al.*, 2003) y mosquitos (Noriega y Wells, 1999). La adaptación se da en periodos tan cortos como 2 h (Dagorn y Lahaie, 1981). Incluso, factores antifisiológicos como los inhibidores de tripsina ejercen un efecto estimulante en la producción de tripsina (Fushiki y Iwai, 1989; Grant *et al.*, 2000; Temler *et al.*, 1984). Por ello, las diferencias encontradas son difícilmente explicables sólo por factores dietéticos únicamente ya que las dietas tenían igual contenido de proteínas, y con 3 meses al menos bajo el mismo régimen dietético.

Dado que en el estudio de Malatesta *et al.* (2002b) utilizaron la soya completa como fuente proteica y en el nuestro, fue un aislado de soya con aproximadamente el 90% de proteína, suponemos que existe algún componente de naturaleza proteica que pueda estar afectando la actividad y expresión de estas proteínas estudiadas.

Como se mencionó anteriormente, en este estudio no hubo diferencias significativas en la actividad específica de tripsina en páncreas, pero sí a nivel de expresión del ARNm. Por ello, teorizamos que el factor que puede explicar los cambios encontrados, actúa a nivel transcripcional, alterando la producción del ARNm para los tripsinógenos. Este nivel de regulación es clave en la adaptación del páncreas exócrino como lo muestran los resultados de Iovana *et al.* (1991a). Dichos autores concluyeron que la colecistoquinina-pancreozimina regula la expresión génica del páncreas a nivel de la transcripción. Esto fue inicialmente sugerido por Dagorn y Lahaie (1981) y reforzado por Carreira *et al.*

(1997) años más tarde. También se ha observado este nivel de control en otras especies como camarón (Muhlía-Almazan *et al.*, 2003).

Otra posibilidad para explicar estos resultados es la existencia de algún tipo de daño celular. El patrón obtenido (baja expresión del ARNm y mayor nivel de actividad específica enzimática) es semejante a la fase aguda de una pancreatitis, en la que existe insuficiencia endócrina y exócrina de acuerdo a los resultados del estudio de Iovanna *et al.* (1991b). Se ha visto que en la pancreatitis disminuyen más del 50% los niveles de amilasa, tripsinógeno 1, quimotripsinógeno B, elastasa 1, y procarboxipetidasa A. Los mismos autores (Iovanna *et al.*, 1991b) observaron una recuperación rápida de la síntesis proteica, pero no así en el nivel del ARNm pancreático hasta el día 10 posterior a la inducción de la pancreatitis. Sin embargo, no realizamos ninguna evaluación adicional para confirmar la presencia de esta patología en las ratas de nuestro estudio.

Las hipótesis anteriores se ven reforzadas por la existencia de factores de transcripción que afectan el desarrollo morfológico del páncreas (Kim y Hebrok, 2001). La ausencia de alguno de ellos puede causar enfermedades severas, incluso la muerte prematura. Tal es el caso de la proteína básica hélice-lazo-hélice (bHLH) p48, una subunidad del factor de transcripción PTF1 que dirige la expresión de genes del páncreas exócrino. Krapp *et al.* (1998), crearon ratones con una mutación nula en el gen codificante de la proteína bHLH. Esto les causó la desaparición completa del tejido pancreático exócrino y por lo tanto, la muerte prematura. Sin embargo, existen otros factores cuya alteración sólo causa una pérdida parcial de la función exócrina del páncreas, sin llevar a la muerte. Este es el caso del factor de transcripción bHLH Mist1 (Pin *et al.*, 2001; Rukstalis *et al.*, 2003) el cual actúa únicamente en células secretoras del organismo (Pin *et al.*, 2000).

Pin *et al.* (2001) concluyeron que el factor Mist1, fue necesario para mantener la organización celular del páncreas. Ellos trabajaron con ratones que

no expresaban esta proteína y con el paso del tiempo, mostraron un deterioro gradual del tejido pancreático. Entre sus hallazgos sobresale el hecho de que este factor alteró sólo la expresión exócrina del páncreas, sin afectar su componente endócrino, ni el peso del órgano.

Los hallazgos anteriores son muy importantes, ya que en nuestro estudio observamos un comportamiento semejante a un daño celular. Dicho daño parece estar limitado a la función exócrina del páncreas, sin alteraciones de la endócrina. Es decir, pareciera que existe algún componente en la soya de naturaleza transgénica que afectara un factor de transcripción como es el bHLH Mist1, o algún otro de la misma naturaleza. Lo anterior queda como una pregunta que tendrá que responderse en estudios posteriores.

CONCLUSIONES

Respecto a la calidad proteica de la dieta se puede concluir que las dietas son comparables en calidad de proteina para crecimiento y mantenimiento, con proteina restringida. Además, con exceso de proteina hay una ligera ventaja de la soya convencional en eficiencia alimentaria y conversión proteica. Si las pruebas de evaluación de riesgos se hubieran quedado a este nivel, probablemente el aislado de soya genéticamente modificada se hubiera clasificado como seguro para su consumo.

Sin embargo, la naturaleza transgénica de nuestra muestra afectó el nivel de expresión del ARNm de dos isoenzimas del páncreas de ratas. Así mismo, aunque no hubo diferencias en los promedios de actividad específica de tripsina en páncreas entre tratamientos, si hubo una mayor variabilidad en las ratas alimentadas con DAS-GM.

Los cambios, no son muy evidentes a nivel macroscópico, pero si a nivel molecular. Por ello, es necesario reconsiderar los lineamientos sugeridos para la evaluación de riesgos de alimentos transgénicos, e ir más allá del concepto de "equivalencia sustancial". Lo anterior, debido a que con las pruebas sugeridas en la actualidad es probable que no se observen cambios adversos. Ya antes hemos mencionado que los estudios existentes de evaluación de riesgos han utilizado variables macroscópicas, y no han encontrado diferencias significativas. Sin embargo, ocurren cambios a niveles celulares, que tal vez no se manifiesten de inmediato, pero a largo plazo, podrían alterar el estado de salud del organismo.

Además, también es necesario considerar como una prueba necesaria la evaluación de la ingestión subcrónica del alimento. Se requiere llegar a un consenso en cuanto a las pruebas sugeridas para la evaluación de riesgos. Para ello, es necesario considerar la existencia de técnicas más refinadas, que aportan información específica.

BIBLIOGRAFIA

- Aumaitre A, K Aulrich, A Chesson, G Flachowsky, G Piva (2002)** New feeds from genetically modified plants: substantial equivalence, nutritional equivalence, digestibility, and safety for animals and the food chain. *Livestock Production Science* 74:223-238.
- Barriere Y, R Verite, P Brunshwig, F Surault, J C Emile (2001)** Feeding value of corn silage estimated with sheep and dairy cows is not altered by genetic incorporation of Bt1376 resistance to *Ostrinia nubilalis*. *Journal of Dairy Science* 84:1863-1871.
- Brake J, D Vlachos (1998)** Evaluation of transgenic event 176 "Bt" corn in broiler chickens. *Poultry Science* 77:648-653.
- Brannon P M (1990)** Adaptation of the exocrine pancreas to diet. *Annual Review of Nutrition* 10:85-105.
- Carreira S, C Fueri, J C Chaix, A Puigserver (1997)** Stability of the mRNA encoding some pancreatic hydrolases is modulated by dietary protein intake in the rat. *The British Journal of Nutrition*. 78:833-843.
- Dagorn J C, R G Lahaie (1981)** Dietary regulation of pancreatic protein synthesis. I. Rapid and specific modulation of enzyme synthesis by changes in dietary composition. *Biochimica et Biophysica Acta* 654:111-118.
- Dubick M A, A P Majumdar, G A Kaysen, E J Burbige, M C Geokas (1988)** Secretagogue-induced enzyme release from the exocrine pancreas of rats following adaptation to a high protein diet. *The Journal of Nutrition* 118:305-310.
- Ewen S W, A Pusztai (1999)** Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *Lancet* 354:1353-1354.

- FAO/WHO. (1991).** Protein Quality Evaluation, Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation. Rome: FAO Food and Nutrition Paper No 51, 1991.
- Fares N H, A K El-Sayed (1998)** Fine structural changes in the ileum of mice fed on delta-endotoxin-treated potatoes and transgenic potatoes. *Natural Toxins* 6:219-233.
- Fushiki T, K Iwai (1989)** Two hypotheses on the feedback regulation of pancreatic enzyme secretion. *The FASEB Journal* 3:121-126.
- Gaskell G, N Allum, M Bauer, J Durant, A Allansdottir, H Bonfadelli, D Boy, S de Cheveigne, B Fjaestad, J M Gutteling, J Hampel, E Jelsoe, J C Jesuino, M Kohring, N Kronberger, C Midden, T H Nielsen, A Przystalski, T Rusanen, G Sakellaris, H Torgersen, T Twardowski, W Wagner (2000)** Biotechnology and the European public. *Nature Biotechnology* 18:935-938.
- Goto F, T Yoshihara, N Shigemoto, S Toki, F Takaiwa (1999)** Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* 17:282-286.
- Grant G, R Alonso, J E Edwards, S Murray (2000)** Dietary soya beans and kidney beans stimulate secretion of cholecystokinin and pancreatic digestive enzymes in 400-day-old hooded-lister rats but only soya beans induce growth of the pancreas. *Pancreas* 20:305-312.
- Hammond B G, J L Vicini, G F Hartnell, M W Naylor, C D Knight, E H Robinson, R L Fuchs, S R Padgett (1996)** The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. *The Journal of Nutrition* 126:717-727.

- Hara H, H Narakino, S Kiriya, T Kasai (1995)** Induction of pancreatic growth and proteases by feeding a high amino acid diet does not depend on cholecystokinin in rats. *The Journal of Nutrition* 125:1143-1149.
- Hara H, S Ohya, T Hira (2000)** Luminal dietary protein, not amino acids, induces pancreatic protease via CCK in pancreaticobiliary-diverted rats. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 278:G937-945.
- Iovanna J L, E L Calvo, J-C Dagorn (1991a)** Transcriptional regulation by cholecystokinin-pancreozymin in rat pancreas. *Regulatory Peptides* 33:165-173.
- Iovanna J L, V Keim, R Michel, J C Dagorn (1991b)** Pancreatic gene expression is altered during acute experimental pancreatitis in the rat. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 261:G485-489.
- Jonas D A, E Antignac, J M Antoine, H G Classen, A Huggett, I Knudsen, J Mahler, T Ockhuizen, M Smith, M Teuber, R Walker, P De Vogel (1996)** The safety assessment of novel foods. Guidelines prepared by ILSI Europe Novel Food Task Force. *Food and Chemical Toxicology* 34:931-940.
- Kim S K, M Hebrok (2001)** Intercellular signals regulating pancreas development and function. *Genes & Development*. 15:111-127.
- Krapp A, M Knofler, B Ledermann, K Burki, C Berney, N Zoerkler, O Hagenbuchle, P K Wellauer (1998)** The bHLH protein PTF1-p48 is essential for the formation of the exocrine and the correct spatial organization of the endocrine pancreas. *Genes & Development*. 12:3752-3763.

- Kuiper H A, G A Kleter, H P Noteborn, E J Kok (2001)** Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *The Plant Journal* 27:503-528.
- Le Gall G, M S DuPont, F A Mellon, A L Davis, G J Collins, M E Verhoeyen, I J Colquhoun (2003)** Characterization and content of flavonoid glycosides in genetically modified tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51:2438-2446
- Lönnerdal B (2002)** Expression of human milk proteins in plants. *Journal of the American College of Nutrition* 21:218S-221S.
- Malatesta M, C Caporaloni, L Rossi, S Battistelli, M B Rocchi, F Tonucci, G Gazzanelli (2002b)** Ultrastructural analysis of pancreatic acinar cells from mice fed on genetically modified soybean. *Journal of Anatomy* 201:409-415.
- Malatesta M, C Caporaloni, S Gavaudan, M B Rocchi, S Serafini, C Tiberi, G Gazzanelli (2002a)** Ultrastructural morphometrical and immunocytochemical analyses of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soybean. *Cell Structure and Function* 27:173-180.
- Mehta R A, T Cassol, N Li, N Ali, A K Handa, A K Mattoo (2002)** Engineered polyamine accumulation in tomato enhances phytonutrient content, juice quality, and vine life. *Nature Biotechnology* 20:613-618.
- Millstone E, E Brunner, S Mayer (1999)** Beyond 'substantial equivalence'. *Nature* 401:525-526.
- Muhlia-Almazan A, F L Garcia-Carreno, J A Sanchez-Paz, G Yepiz-Plascencia, A B Peregrino-Uriarte (2003)** Effects of dietary protein on the activity and mRNA level of trypsin in the midgut gland of the white shrimp *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135:373B-383B.

- Nair R S, R L Fuchs, S A Schuette (2002)** Current methods for assessing safety of genetically modified crops as exemplified by data on Roundup Ready soybeans. *Toxicologic Pathology* 30:117-125.
- Noriega F G, M A Wells (1999)** A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 45:613-620.
- Oppert B, K J Kramer, W H McGaughey (1997)** Rapid microplate assay for substrates and inhibitors of proteinase mixtures. *Biotechniques* 23:70-72.
- Pellet P L, Young V R (2000)** Techniques for protein quality evaluation: Background and discussion. In: *Nutritional evaluation of protein foods*. The United Nations University. Pp 41-55.
- Pin C L, A C Bonvissuto, S F Konieczny (2000)** Mist1 expression is a common link among serous exocrine cells exhibiting regulated exocytosis. *Anatomical Record* 259:157-167.
- Pin C L, J M Rukstalis, C Johnson, S F Konieczny (2001)** The bHLH transcription factor Mist1 is required to maintain exocrine pancreas cell organization and acinar cell identity. *The Journal of Cell Biology* 155:519-530.
- Polonsky K S, G I Bell (2003)** Organ alchemy: producing insulin in the liver. *Nature Medicine* 9:504-505.
- Priest S H (2000)** US public opinion divided over biotechnology? *Nature Biotechnology* 18:939-942.
- Rocheford T R, J C Wong, C O Egesel, R J Lambert (2002)** Enhancement of Vitamin E Levels in Corn. *Journal of the American College of Nutrition* 21:191S-198.
- Rukstalis J M, A Kowalik, L Zhu, D Lidington, C L Pin, S F Konieczny (2003)** Exocrine specific expression of Connexin32 is dependent on the basic helix-loop-helix transcription factor Mist1. *Journal of Cell Science* 116:3315-3325.

- Sambrook J, E F Fritsch, T Maniatis (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. p. E.5
- Sevenier R, I M van der Meer, R Bino, A J Koops (2002)** Increased Production of Nutriment by Genetically Engineered Crops. Journal of the American College of Nutrition 21:199S-204.
- Sidhu R S, B G Hammond, R L Fuchs, J N Mutz, L R Holden, B George, T Olson (2000)** Glyphosate-tolerant corn: the composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant corn is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 48:2305-2312.
- Sittenfeld A, A M Espinoza (2002)** Costa Rica: revealing data on public perception of GM crops. Trends in Plant Science 7:468-470.
- Temler R S, C A Dormond, E Simon, B Morel, C Mettraux (1984)** Response of rat pancreatic proteases to dietary proteins, their hydrolysates and soybean trypsin inhibitor. The Journal of Nutrition 114:270-278.
- Tomlinson N (2003)** The concept of substantial equivalence, its historical development and current use. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Geneva, Switzerland. 29 may-2 june, 2000 .
- WHO (1999)** Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 1-68 p.
- Ye X, S Al-Babili, A Klöti, J Zhang, P Lucca, P Beyer, I Potrykus (2000)** Engineering the Provitamin A (β -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. Science 287:303-305.

- Sambrook J, E F Fritsch, T Maniatis (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. p. E.5
- Sevenier R, I M van der Meer, R Bino, A J Koops (2002)** Increased Production of Nutriment by Genetically Engineered Crops. Journal of the American College of Nutrition 21:199S-204.
- Sidhu R S, B G Hammond, R L Fuchs, J N Mutz, L R Holden, B George, T Olson (2000)** Glyphosate-tolerant corn: the composition and feeding value of grain from glyphosate-tolerant corn is equivalent to that of conventional corn (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 48:2305-2312.
- Sittenfeld A, A M Espinoza (2002)** Costa Rica: revealing data on public perception of GM crops. Trends in Plant Science 7:468-470.
- Temier R S, C A Dormond, E Simon, B Morel, C Mettraux (1984)** Response of rat pancreatic proteases to dietary proteins, their hydrolysates and soybean trypsin inhibitor. The Journal of Nutrition 114:270-278.
- Tomlinson N (2003)** The concept of substantial equivalence, its historical development and current use. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Geneva, Switzerland. 29 may-2 june, 2000 .
- WHO (1999)** Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers. World Health Organization. Geneva, Switzerland. 1-68 p.
- Ye X, S Al-Babili, A Klöpper, J Zhang, P Lucca, P Beyer, I Potrykus (2000)** Engineering the Provitamin A (β -Carotene) Biosynthetic Pathway into (Carotenoid-Free) Rice Endosperm. Science 287:303-305.