



Organización de las Naciones Unidas para
la Agricultura y la Alimentación



Organización Mundial de la Salud

**Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Inocuidad
de los Alimentos Obtenidos de Animales de ADN Recombinante**

**Sede de la Organización Mundial de la Salud
Ginebra (Suiza), 26 de febrero – 2 de marzo de 2007**

INFORME

El presente documento no es una publicación oficial de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Aunque las Organizaciones se reservan todos los derechos, el documento se podrá reseñar, resumir, reproducir o traducir libremente, en parte o en su totalidad, pero no para la venta u otro uso relacionado con fines comerciales. Las opiniones expresadas en el presente informe son las de los participantes en la Consulta y no implican la expresión de ninguna opinión por parte de la OMS y la FAO.

© FAO y OMS 2007

Índice

	Página
Resumen	iii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	1
3. Ámbito	2
4. Genes marcadores e indicadores	3
4.1 Introducción	3
4.2 Debate central	4
5. Aplicaciones no heredables	8
5.1 Introducción	8
5.2 Antecedentes	9
5.3 Debate central	10
6. Conclusiones	23
6.1 Conclusiones sobre los genes marcadores e indicadores	23
6.2 Conclusiones sobre las aplicaciones no heredables	23
7. Recomendaciones	25
7.1 Recomendaciones sobre los genes marcadores e indicadores	25
7.2 Recomendaciones sobre las aplicaciones no heredables	25
8. Referencias	27
9. Glosario	30
ANEXO 1: Lista de participantes	32
ANEXO 2: Lista de documentos	35

Resumen

Del 26 de febrero al 2 de marzo de 2007 se celebró en la Sede de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en Ginebra, una Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Obtenidos de Animales de ADN Recombinante. La finalidad era ofrecer asesoramiento científico a la FAO/OMS y sus Estados Miembros sobre dos series de cuestiones, relativas a: i) los genes marcadores e indicadores; y ii) las aplicaciones no heredables. El Grupo de Acción Intergubernamental Especial del Codex sobre Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos había pedido expresamente asesoramiento sobre estas cuestiones. La Consulta se basó en las conclusiones y recomendaciones de la Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Derivados de Animales Modificados Genéticamente, Incluidos los Peces (FAO/OMS, 2004).

En plantas y en animales de laboratorio se utilizan diversos genes indicadores y marcadores seleccionables, y ahora se están usando en animales destinados al consumo humano. En la actualidad se utiliza un pequeño número de genes marcadores e indicadores ajenos a los de la resistencia a los antibióticos para la producción de animales de ADN recombinante destinados al consumo humano, pero no hay ningún estudio sobre su inocuidad como alimento. Sería conveniente conseguir nuevos genes marcadores seleccionables que no confieran resistencia a los antibióticos.

Hay técnicas eficaces para la supresión de secuencias específicas de ADN, los denominados sistemas de escisión del ADN, que se utilizan primordialmente en animales de laboratorio y se están comenzando a aplicar en animales destinados al consumo humano. Se alienta firmemente la validación constante y la preparación de técnicas para la escisión del ADN. Los animales de ADN recombinante destinados a su uso como alimento humano deben estar libres de los genes de escisión del ADN introducidos, a fin de reducir al mínimo la posibilidad de efectos involuntarios. Son necesarias nuevas investigaciones sobre la inocuidad de los genes marcadores ajenos a los de la resistencia a los antibióticos y los sistemas de escisión del ADN en los alimentos.

Los constructos de ADN recombinante introducidos en animales pueden ser heredables o no heredables. Los constructos no heredables también se pueden utilizar para mejorar la producción y la sanidad animal o para proteger de enfermedades mediante la administración de vacunas de ADN recombinante. Los constructos no heredables se pueden integrar en el genoma de las células somáticas.

Las diferencias entre los constructos de ADN recombinante con respecto a la inocuidad de los alimentos están en función de si el constructo se ha integrado en el genoma o se ha mantenido en los episomas y no de si es heredable o no. La principal diferencia cualitativa entre los riesgos para el consumo de alimentos debidos a los animales de ADN recombinante que contienen constructos heredables y no heredables está en si en dichos animales sigue habiendo o no excipientes presentes que facilitan la incorporación de constructos no heredables.

Las diferencias cualitativas en los riesgos para la sanidad animal y el consumo de alimentos se refieren al aumento del potencial de los constructos mantenidos en los episomas para participar en la transferencia horizontal de genes y posiblemente recombinarse para formar partículas víricas funcionales. Las novedades más recientes sobre los vectores episomales no víricos proporcionan un medio para superar muchas de las preocupaciones asociadas con los sistemas de vectores que tienen una base vírica.

Se alienta la realización de nuevas investigaciones para comprender si la inocuidad de los alimentos se ve afectada por el uso de secuencias víricas en los constructos y por los efectos potenciales de la transferencia horizontal de genes. Se deberían elaborar directrices para abordar las cuestiones

identificadas en relación con la sanidad animal, incluida la utilización inocua de vectores derivados de virus. Un lugar idóneo para la elaboración de esas directrices sería la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

Existe una relación recíproca entre la sanidad animal y la inocuidad de los alimentos o los piensos para los animales de ADN recombinante. Una cuestión de particular importancia es la necesidad urgente de abordar plenamente las cuestiones relativas a la sanidad animal y la inocuidad de los alimentos planteadas por las posibles aplicaciones de las vacunas de ADN recombinante, que son un tipo de constructos no heredables. Por consiguiente, es importante que los órganos pertinentes, como la FAO, la OMS y la OIE, colaboren para abordar debidamente las interacciones entre estas cuestiones.

1. Introducción

Del 26 de febrero al 2 de marzo de 2007 se celebró en la Sede de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en Ginebra, una Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Obtenidos de Animales de ADN Recombinante. Participaron en la Consulta en total 18 expertos. La lista completa de los participantes figura en el Anexo 1.

La Sra. Susanne Weber-Mosdorf, Subdirectora General, Grupo de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente Saludable de la OMS, inauguró la consulta en nombre de los Directores Generales de la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

En sus observaciones introductorias, recordó que la OMS y la FAO proporcionaban asesoramiento científico y orientaciones técnicas a los Estados Miembros, así como a la Comisión de Codex Alimentarius, con objeto de mejorar la inocuidad global de los alimentos y proteger la salud humana, además de aumentar la confianza de los consumidores en la inocuidad del suministro de alimentos.

Manifestó que, si bien reconocía que la biotecnología moderna podía contribuir de manera directa e indirecta al mejoramiento de la salud y el desarrollo humanos, la utilización de la nueva tecnología también podía introducir riesgos potenciales para la salud humana y/o el medio ambiente. Por consiguiente, era necesario un sistema común basado en pruebas para facilitar una evaluación coherente de la inocuidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos.

La Consulta eligió a la Profesora Anne R. Kapuscinski como Presidenta y a la Dra. Lisa Kelly como Relatora. La Consulta también decidió establecer dos grupos de trabajo durante la reunión: el Grupo de Trabajo A se concentraría en las cuestiones relativas a los genes indicadores y marcadores y el Grupo de Trabajo B abordaría las cuestiones relacionadas con las aplicaciones no heredables.

Para el Grupo de Trabajo A, la Consulta nombró al Profesor Heiner Niemann como Moderador y al Profesor Kaare M. Nielsen como Relator. Para el Grupo de Trabajo B, la Consulta nombró a la Dra. Larisa Rudenko como Moderadora y al Profesor Martin O. Makinde como Relator.

Todos los participantes cumplieron una Declaración de intereses con arreglo a la definición de la FAO y la OMS.

2. Antecedentes

La Comisión del Codex Alimentarius, en su 27º período de sesiones, restableció el Grupo de Acción Intergubernamental Especial del Codex sobre Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos (Grupo de Acción del Codex) y le encomendó la elaboración de normas, directrices u otros principios, según procediera, para los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos.

El Grupo de Acción del Codex, en su sexta reunión, celebrada del 27 de noviembre al 1º de diciembre de 2006, examinó el "Anteproyecto de Directrices para la Realización de la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Obtenidos de Animales de ADN Recombinante" y acordó pedir a la FAO y la OMS asesoramiento científico sobre dos series de preguntas¹:

¹ ALINORM 07/30/34.

- **Genes marcadores e indicadores**
 - *¿Qué avances se han producido en la elaboración y uso de genes indicadores y marcadores seleccionables?*
 - *¿Existen genes marcadores o indicadores ajenos a los de la resistencia a los antibióticos cuya inocuidad para los seres humanos en los productos alimenticios haya sido demostrada, y en su caso, cuáles son?*
 - *Cuando se desea suprimir secuencias específicas de ADN, ¿se dispone de técnicas fiables y seguras para hacerlo con carácter habitual?*
- **Aplicaciones no heredables²**
 - *¿Existen diferencias relevantes desde la perspectiva de la inocuidad de los alimentos entre animales con rasgos heredables y no heredables, y de ser así, cuáles son?*
 - *¿Existen cuestiones específicas sobre inocuidad de los alimentos (por ejemplo referentes a los tipos de vectores) que se deberían considerar en relación con la evaluación de la inocuidad de los alimentos derivados de animales que posean rasgos heredables/no heredables?*

La FAO y la OMS, aun reconociendo la utilidad de los resultados de la Consulta Mixta FAO/OMS de Expertos sobre la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Derivados de Animales Modificados Genéticamente, Incluidos los Peces (FAO/OMS, 2004), decidió convocar la presente Consulta para abordar más a fondo las cuestiones que están directamente relacionadas con el trabajo que ha realizado el Grupo de Acción del Codex y responder a las preguntas específicas mencionadas.

En el mandato de la Consulta estaba comprendida la respuesta a esas preguntas, además de abordar desde una perspectiva científica cuestiones relativas a la evaluación de la inocuidad de los alimentos de origen animal obtenidos por medios biotecnológicos modernos.

3. **Ámbito**

La labor de la Consulta se concentró en las preguntas antes mencionadas planteadas por el Grupo de Acción del Codex. Para ello, la Consulta examinó las aplicaciones conocidas de los genes marcadores e indicadores y la diferencia entre las aplicaciones heredables y no heredables en los animales de ADN recombinante que podrían entrar en el suministro de alimentos destinados al consumo humano. En los debates se tuvo en cuenta la información científica relativa al uso de estas técnicas en los animales terrestres, por ejemplo los pollos y los bovinos, y en los animales acuáticos de cría, como los peces. Con respecto a las aplicaciones no heredables, la Consulta se ocupó de la presentación de un enfoque para la evaluación de la inocuidad de distintas aplicaciones, como etapa inicial de la evaluación de los riesgos. La Consulta no realizó una evaluación completa de los riesgos de ninguna aplicación específica.

Esta Consulta tomó nota de los resultados de la anterior Consulta de Expertos sobre los animales modificados genéticamente (FAO/OMS, 2004) y se basó en sus conclusiones y recomendaciones. Así pues, el enfoque global para la evaluación de la inocuidad de los alimentos procedentes de animales de ADN recombinante supone una evaluación comparativa de la inocuidad del animal de ADN recombinante con el elemento de comparación apropiado, incluida una

² El término "aplicaciones no heredables" abarca la introducción directa de ácidos nucleicos en tejidos de la línea no germinal de animales destinados al consumo como alimentos.

evaluación de la ingesta de alimentos y una valoración nutricional y toxicológica integrada, seguida de una caracterización completa del riesgo.

La Consulta observó que ciertas aplicaciones de los genes marcadores e indicadores y los constructos genéticos no heredables podrían plantear cuestiones acerca de los efectos en la salud y el bienestar del animal de ADN recombinante o en la inocuidad para la sanidad animal de los piensos obtenidos a partir de animales de ADN recombinante (por ejemplo, harina de pescado hecha con peces de ADN recombinante). Teniendo en cuenta que estas cuestiones van más allá del ámbito de la presente Consulta, las deberían abordar los organismos pertinentes, como la OIE y la FAO. La Consulta también tomó nota de la inocuidad de los alimentos obtenidos a partir de animales alimentados con piensos procedentes de animales de ADN recombinante, pero no se ocupó de ella.

En el Glosario aparecen las definiciones de términos técnicos importantes a efectos de la presente Consulta.

4. Genes marcadores e indicadores

4.1 Introducción

Los primeros animales de granja de ADN recombinante se obtuvieron hace más de 20 años mediante microinyección de ADN foráneo en pronúcleos de cigotos. A pesar de los considerables inconvenientes, como la escasa eficacia, la integración aleatoria y la variabilidad de las pautas de expresión, se han preparado modelos prometedores para su aplicación en la agricultura y la biomedicina (Niemann *et al.*, 2005). Entre las diversas metodologías alternativas que se han elaborado para superar las limitaciones de la tecnología de la microinyección, la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) tiene el mayor potencial como instrumento para conseguir una mejora cuantitativa y cualitativa significativa en la generación de animales de granja de ADN recombinante. En concreto, esto guarda relación con la detección previa de las células transfectadas antes de su utilización en la TNCS y la posibilidad de conseguir una modificación genética selectiva mediante recombinación homóloga. Hasta ahora, la TNCS ha tenido éxito en 11 especies de animales (Niemann y Kues, 2001; Niemann *et al.*, 2005). La tecnología ha mejorado constantemente durante el último decenio y ahora se utiliza para la generación de bovinos, cerdos, cabras y ovejas de ADN recombinante. Sin embargo, la eficacia global sigue siendo poco satisfactoria y una parte de los clones, en particular en los bovinos y las ovejas, sufre patologías (por ejemplo, el síndrome de la descendencia grande) que se considera que son debidas al fracaso de la reprogramación epigenética del núcleo somático transferido. Estas patologías no se observan en la descendencia de los animales clonados.

Ya existen varias tecnologías para introducir o eliminar genes con una función conocida, y pronto habrá productos de animales de granja de ADN recombinante listos para su entrada en la cadena alimentaria. Con la llegada de la TNCS, se ha podido comenzar a utilizar instrumentos moleculares que permiten introducir modificaciones precisas en el genoma. Entre estas tecnologías está la integración cromosómica selectiva mediante recombinasas de ADN específicas de un lugar, e incluso métodos que son compatibles con una expresión transgénica controlada en el tiempo y en el espacio en los animales de granja utilizados para la producción de alimentos. Estos instrumentos moleculares están bien caracterizados mediante amplios estudios en ratones y otros sistemas biológicos (Niemann y Kues, 2003). Ya se dispone del primer proyecto de secuencia de los genomas de algunos animales de granja (por ejemplo de perro, bovino, pollo, caballo) y se espera tener otros en breve.

El éxito en la generación de animales de ADN recombinante utilizando técnicas como la TNCS depende fundamentalmente de la selección de células transfectadas basada en el uso de genes marcadores y/o indicadores apropiados. La anterior Consulta de Expertos sobre animales modificados genéticamente (FAO/OMS, 2004) recomendó "que se evitara el uso de secuencias de ADN innecesarias en el constructo genético, incluidos genes marcadores".

La finalidad de la presente Consulta era ampliar esta evaluación, y en concreto abordar las siguientes cuestiones relativas a la producción de alimentos a partir animales de ADN recombinante:

- *Novedades recientes y utilización de genes indicadores y marcadores seleccionables en la producción de alimentos a partir de animales de ADN recombinante*
- *Disponibilidad de genes marcadores e indicadores ajenos a los de la resistencia a los antibióticos y su inocuidad para las personas en los productos alimenticios*
- *Fiabilidad e inocuidad de las técnicas utilizadas para la eliminación de secuencias específicas de ADN.*

4.2 Debate central

4.2.1 Novedades recientes y utilización de genes indicadores y marcadores seleccionables en animales de ADN recombinante

Para generar animales de ADN recombinante se utilizan distintos métodos, en función de la especie. Son los siguientes: 1) inyección directa de ADN en los pronúcleos o el citoplasma del embrión; 2) transferencia de ADN utilizando transposones o vectores lentivíricos; 3) transferencia de ADN mediante esperma incubado con ADN; 4) transferencia de ADN a células pluripotentes para generar animales transgénicos quiméricos; y 5) transferencia de ADN a células somáticas utilizadas para generar animales clonados transgénicos. En los métodos de transferencia de ADN puede haber tanto adición aleatoria y selectiva de genes como sustitución por una recombinación homóloga. En los métodos 1, 2 y 3, la eficacia de la integración puede ser suficiente para que no se necesite utilizar genes marcadores seleccionables. Sin embargo, éstos son esenciales para la adición o la sustitución selectivas de genes o cuando son abundantes las células a las cuales se transfiere ADN foráneo (métodos 4 y 5).

La transferencia selectiva de genes es un fenómeno raro, que a menudo requiere una selección celular tanto positiva como negativa. La selección positiva consiste en la eliminación de las células en las que no se ha integrado el gen que interesa, y se suele conseguir mediante el uso de genes marcadores resistentes a los antibióticos. La selección negativa supone la eliminación de las células en las que el gen que interesa no se ha integrado específicamente en el lugar previsto, y se ve facilitada por los genes que expresan sustancias citotóxicas.

A efectos de la presente Consulta, se han utilizado las siguientes definiciones:

- a) Se utiliza un **gen marcador** para determinar si un fragmento de ADN se ha introducido con éxito en la célula animal. Los genes marcadores se usan tanto en la selección como en la detección.

b) Un **marcador seleccionable** es un gen introducido en células animales que confiere un rasgo idóneo para la selección artificial. Protege las células del efecto de un agente selectivo que normalmente las mataría o impediría su crecimiento. Entre los agentes selectivos positivos, los más utilizados en células animales son los antibióticos. Como ejemplos comunes cabe mencionar la puromicina, la higromicina y la fleomicina. Para la selección negativa se utilizan sustancias citotóxicas como los derivados del ganciclovir generados por la timidina quinasa del herpes simple o la subunidad A de la toxina del cólera.

En los animales de ADN recombinante también puede haber genes marcadores que confieren resistencia a antibióticos como la ampicilina y el cloranfenicol, debido a su frecuente utilización en la construcción de vectores bacterianos.

c) Un gen marcador utilizado para la detección o como **indicador** codifica un producto que se puede identificar fácilmente de manera cualitativa y/o cuantitativa. Entre los más destacados están las proteínas fluorescentes como la proteína fluorescente verde (PFV), la beta-galactosidasa, la fosfatasa alcalina segregada, las luciferasas y la cloranfenicol acetil transferasa (CAT)³.

Otro tipo de genes **marcadores** está relacionado con los genes que cambian el color del individuo cuando se utilizan en el sistema transgénico. La pigmentación visible en los vertebrados se debe a la síntesis y distribución de melanina en la piel y los ojos. La tirosinasa es una enzima de la vía de producción de melanina en los melanocitos. La mutación del gen de la tirosinasa es una causa común de un fenotipo semejante en todos los vertebrados, conocido como albinismo, debido a la falta del pigmento melanina. Por consiguiente, el fenotipo albino se ha corregido con éxito por medio del transgén de la tirosinasa, que puede expresar la tirosinasa activa en ratones y conejos transgénicos (Beermann *et al.*, 1990; Aigner y Brem, 1993).

Otro sistema para identificar y/o seleccionar células animales con ADN o una proteína recombinante introducidos es el uso de secuencias únicas de ADN o proteínas identificables (secuencias identificadoras de epítomos o de polihistidina).

Cada vez utilizan más genes marcadores en animales de ADN recombinante destinados al consumo humano. Son recientes las aplicaciones siguientes:

-Bovinos de ADN recombinante producidos con una composición alterada de beta y kappa caseína en su leche, después de seleccionar las células donantes de ADN recombinante apropiadas (Brophy *et al.*, 2003). Se aplicó una estrategia análoga a la producción de cerdos de ADN recombinante con alteraciones en su composición de ácidos grasos, con un desplazamiento significativo hacia más ácidos grasos poliinsaturados (Lai *et al.*, 2006). Además, se han producido vacas con el gen de los priones desactivado.

- Se transfectaron constructos de genes que albergaban un gen seleccionable, de resistencia a la neomicina o bien a la puromicina, y un gen marcador (el gen de la PFV) en células germinales primordiales de pollo. Las células seleccionadas se inyectaron en embriones iniciales de pollo, dando lugar a animales fluorescentes (van de Lavoit *et al.*, 2006). Este primer éxito en el sistema de producción de pollos de ADN recombinante abre la posibilidad de aplicaciones agropecuarias en la avicultura.

³ El gen de la CAT confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol en las bacterias, pero solamente se utiliza como indicador en las células animales.

- El gen de la hormona concentradora de melanina del salmón se utilizó como gen indicador para la generación de medaka de ADN recombinante, que tiene el cuerpo de color blanco por la expresión potenciada de dicha hormona (Kinoshita *et al.*, 2001). La hormona concentradora de melanina es un heptadecapéptido que se produce en la hipófisis, concentra gránulos de melanina en los melanóforos y aclara el color del cuerpo del pez. Asimismo, se ha utilizado con éxito el gen marcador de la tirosinasa en la producción de peces de ADN recombinante (Hyodo-Taguchi *et al.*, 1997; Inagaki *et al.*, 1998).

4.2.2 Disponibilidad de genes marcadores o indicadores ajenos a los de la resistencia a los antibióticos y su inocuidad para las personas en los productos alimenticios

4.2.2.1 Disponibilidad

La Consulta de Expertos de 2004 sobre los animales modificados genéticamente recomendó que se evitara el uso de cualquier secuencia no necesaria de ADN, incluidos los genes marcadores, en el constructo génico (FAO/OMS, 2004). Sin embargo, debido a la utilidad demostrada y los resultados constantes de los genes de resistencia a los antibióticos, han sido limitados los esfuerzos que se han hecho para obtener genes marcadores alternativos que permitan la identificación y la selección positiva de células transfectadas. En la actualidad hay una serie de genes marcadores detectables (genes indicadores) que permiten la identificación, pero no la selección positiva de células animales con ADN introducido.

Entre los más destacados están las proteínas fluorescentes como la proteína fluorescente verde (PFV), la beta-galactosidasa, la fosfatasa alcalina segregada, las luciferasas y la cloranfenicol acetil transferasa (CAT). El gen de la PFV codifica una proteína que muestra fluorescencia bajo la luz de determinadas longitudes de onda *in vivo* o *in vitro* sin ocasionar daños a la célula. Las luciferasas se utilizan habitualmente y requieren sustratos. Se pueden aplicar tanto a extractos celulares como a células intactas, o incluso a tejidos. En cambio, la detección de la actividad de la beta-galactosidasa suele requerir la fijación y la disgregación del tejido para su análisis.

4.2.2.2 Aspectos relativos a la inocuidad

Uno de los aspectos importantes en la evaluación de la inocuidad de los alimentos obtenidos de animales de ADN recombinante es la inocuidad de las proteínas que se expresan por primera vez, incluidas las expresadas por los genes marcadores que quedan en el organismo. Para los genes marcadores ajenos a los de la resistencia a los antibióticos, la evaluación se concentraría en general en la inocuidad de la proteína expresada, que se debe determinar caso por caso. En función del conocimiento de la proteína expresada, esta evaluación puede ir desde una valoración limitada de los datos disponibles sobre la función bioquímica de la proteína y su expresión en el animal de ADN recombinante hasta la realización de pruebas amplias de toxicidad, incluso con estudios en animales, en el caso de proteínas no tan bien documentadas (FAO/OMS, 2004). Esta información se utiliza luego como parte de la evaluación global de la inocuidad comparativa para llegar a una conclusión acerca de la inocuidad del alimento obtenido del animal de ADN recombinante.

Una evaluación normal de la inocuidad de los alimentos para una proteína recombinante que se expresa por primera vez incluye lo siguiente:

- composición bioquímica y función de la proteína;
- expresión de la proteína en el animal de ADN recombinante (lugar de expresión, niveles de expresión, integridad de la proteína expresada);
- termoestabilidad de la proteína, elaboración y digestión;

- evaluación toxicológica; y
- alergenidad.

En función del resultado de la evaluación, pueden ser necesarios nuevos estudios (por ejemplo inmunológicos).

En el caso de la familia de la PFV de los genes indicadores, existen algunos estudios, incluidos los relativos a plantas de ADN recombinante, de los cuales se puede extrapolar alguna información con respecto a la inocuidad de los alimentos. Son limitados los datos que se han publicado sobre la toxicidad de la PFV. Algunos experimentos con células animales transfectadas (plásmidos que expresan el gen de la PFV) parecen indicar que la PFV tiene cierta citotoxicidad (Liv *et al.*, 1999). En la mayoría de las especies de animales en las que es posible la transgénesis se han obtenido estirpes de animales que expresan el gen de la PFV. Todos sobrevivieron sin efectos adversos observados. La citotoxicidad de la PFV observada *in situ* no significa necesariamente que esta proteína sea tóxica cuando se administra por vía oral. Las ratas alimentadas durante 26 días con PFV pura o con canola que expresaron el gen de la PFV no mostraron ninguna diferencia significativa con respecto a los animales testigo en cuanto al crecimiento y varios otros parámetros. La PFV se degradó con rapidez en presencia de pepsina y las ratas la digirieron casi completamente. En la secuencia de la PFV no se encontró ninguna semejanza significativa de la secuencia de aminoácidos con alérgenos conocidos, aunque la Consulta observó que la comparación se había realizado solamente con alrededor de la mitad de los alérgenos que se conocen. La conclusión de este estudio fue que el gen de la PFV era un sustitutivo importante de los genes seleccionables resistentes a los antibióticos (Richards *et al.*, 2003). Sin embargo, la Consulta convino en que serían necesarios nuevos estudios sobre la función bioquímica y la expresión de la PFV en tejidos animales para extraer conclusiones firmes con respecto a su inocuidad en los animales de ADN recombinante destinados al consumo humano.

La Consulta tampoco pudo extraer ninguna conclusión firme en relación con la inocuidad de la beta-galactosidasa, la fosfatasa alcalina, la CAT y la luciferasa en los alimentos expresadas en animales de ADN recombinante destinados al consumo humano, debido a la falta de estudios disponibles. Es evidente la necesidad de datos sobre la inocuidad de tales proteínas si se quiere utilizar estos genes marcadores en la obtención de animales de ADN recombinante destinados al consumo humano.

En el caso de las secuencias de péptidos que se incorporan a constructos génicos para actuar como identificadoras únicas de la proteína recombinante, la Consulta señaló que era necesario realizar estudios sobre la inocuidad de dichas secuencias en toda la proteína de fusión, y no sólo en la secuencia de péptidos aislada.

4.2.3 Fiabilidad e inocuidad de las técnicas utilizadas para la eliminación de secuencias específicas de ADN

Hay sistemas específicos bien conocidos de recombinación de diversos sistemas bacterianos y fúngicos en los que diversas enzimas, como la Cre, la flipasa o la R, actúan sobre secuencias destinatarias específicas, como lox, FRT o RS, respectivamente. Estos sistemas se han adaptado a otros sistemas biológicos, desempeñan ya una función importante en la producción de plantas de ADN recombinante y se están comenzando a utilizar ahora en células animales con el fin de generar animales de ADN recombinante para la producción de alimentos. Estos sistemas de recombinación suelen constar de tres elementos principales: dos pares de secuencias cortas de ADN (las secuencias de recombinación específicas de un lugar) y una enzima específica, es decir, la recombinasa específica de un lugar. Las reordenaciones del ADN mediadas por recombinasa comprenden la

escisión específica de un lugar, la integración, la inversión y la recombinación intercromosómica, permitiendo así una amplia variedad de aplicaciones. Así pues, existen sistemas funcionales para la eliminación de secuencias innecesarias de ADN y es posible aplicarlos en células animales.

Se ha publicado información sobre la función del sistema de recombinasa Cre-lox. Los datos sobre la función de otras recombinasas específicas de un lugar son demasiado limitados para poder evaluar la eficacia y la inocuidad. Se ha expresado preocupación con respecto al uso de tales sistemas por sus efectos en organismos no destinatarios, debido a que los niveles elevados de expresión de la recombinasa pueden dar lugar a reordenaciones del genoma en lugares destinatarios crípticos. El efecto más importante en organismos no destinatarios asociado con el uso del sistema Cre-lox es la tendencia de la recombinasa a inducir recombinación entre lugares lox crípticos en los genomas de mamíferos. Se han asociado niveles elevados de actividad de la recombinasa con aberraciones cromosómicas (Loonstra *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2000). Además, la escisión imperfecta de fragmentos muy grandes de ADN puede estar asociada con otra serie de efectos secundarios no deseados. Estos efectos no deseados también pueden estar relacionados con otros sistemas de recombinación específicos de un lugar.

La combinación de elementos estimulantes específicos de tejidos con la recombinasa de ADN Cre permite restringir la desactivación de los genes a ciertos tipos de células o tejidos, por lo que debe desempeñar una función en la producción futura de alimentos específicos. En efecto, las investigaciones recientes demuestran que la escisión de genes se puede controlar con mayor precisión utilizando estimulantes inducibles (por ejemplo, el sistema inducible por tetraciclina) para el gen de la recombinasa Cre y usando formas activas inducibles de la recombinasa Cre (por ejemplo, inducibles por 4-hidroxitamoxifeno).

En el siguiente ejemplo se pone de manifiesto la capacidad del sistema Cre-lox para eliminar genes marcadores seleccionables en animales de ADN recombinante. Los dos alelos de los genes PRNP y de la inmunoglobulina se desactivaron en células somáticas que se utilizaron luego en la transferencia nuclear para generar vacas de ADN recombinante que carecían de la expresión de los genes destinatarios. Se utilizaron dos genes marcadores selectivos positivos flanqueados por secuencias lox y un gen de selección negativa para obtener las células destinadas a la transferencia nuclear de células somáticas. Mediante pruebas de reacción en cadena de la polimerasa se confirmó que el sistema de recombinación específico de un lugar había eliminado eficazmente los genes marcadores (Kuroiwa *et al.*, 2004). En las vacas examinadas posteriormente no se encontró ningún efecto atribuible al sistema de recombinación que pudiera poner en peligro la salud (Richt *et al.*, 2007).

5. Aplicaciones no heredables

5.1 Introducción

En los últimos años se han registrado novedades importantes en la producción de animales de ADN recombinante destinados al consumo humano utilizando constructos heredables y no heredables.

Los animales de ADN recombinante con constructos heredables se producen mediante la introducción de constructos de ADN recombinante en embriones iniciales, gametos y células somáticas que se utilizan para la transferencia nuclear de células somáticas (clonación). En cambio, los animales de ADN recombinante no heredables destinados al consumo humano se producen mediante la introducción directa de ácidos nucleicos en las células somáticas de los animales. Debido a que estos dos tipos de constructos utilizan componentes y tecnologías diferentes, pueden plantear distintos tipos de peligros, por lo que pueden ser necesarias diversas estrategias de evaluación de la inocuidad de los alimentos.

Como se ha mencionado al hablar del ámbito del presente informe, la Consulta examinó si los animales destinados al consumo humano con constructos heredables y no heredables planteaban riesgos distintos para la inocuidad de los alimentos, y en caso afirmativo cuáles podrían ser esos cambios.

Tomando como base una evaluación de las pruebas científicas disponibles sobre los métodos actuales utilizados para generar animales de ADN recombinante destinados al consumo humano con constructos heredables y no heredables, así como un análisis de los métodos presentados en el Anteproyecto de Directrices para la Realización de la Evaluación de la Inocuidad de los Alimentos Obtenidos de Animales de ADN Recombinante que está elaborando el Grupo de Acción del Codex, la Consulta trató de determinar si se requerirían distintas evaluaciones de la inocuidad de los alimentos para los animales de ADN recombinante producidos mediante constructos heredables y no heredables.

5.2 Antecedentes

Aunque en las aplicaciones genéticas heredables y no heredables se pueden utilizar instrumentos moleculares y elementos genéticos semejantes, hay algunas diferencias importantes.

En general, los animales de ADN recombinante con constructos heredables se producen utilizando uno de tres métodos caracterizados en sentido amplio: microinyección en embriones iniciales, transferencia nuclear de células somáticas con células donantes transgénicas o introducción de ADN recombinante en los gametos (normalmente el esperma) (Smith, 2002; Lavitrano, et al. 2003; Sorrell *et al.*, 2005; Wheeler, 2007). A menudo se producen animales con constructos heredables para mejorar características de la producción como el crecimiento, modificar los requisitos nutricionales, mejorar la composición de la canal o la producción de leche y de lana, aumentar la eficacia de la conversión de los piensos, la curación de las heridas, la terapia y la creación de resistencia a las enfermedades de los animales, incluidas las que pueden inducir enfermedades de transmisión alimentaria en las personas (reseñado por Kopp *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006; Kochhar y Evans, 2007; Wheeler, 2007).

Los animales de ADN recombinante con constructos no heredables se pueden producir utilizando medios físicos y químicos (por ejemplo, microinyección, electroporación, métodos de bombardeo de genes (biobalística), liposomas). La mayoría de estos métodos requieren la presencia de excipientes (materiales que actúan como vehículos) asociados con la aplicación. Por ejemplo, en los medios químicos como la tranfección mediada por liposomas, por definición se requiere la presencia de liposomas; el bombardeo de genes deposita constructos de ADN recombinante en bolitas, que a menudo son de oro. Estas aplicaciones de los animales de ADN recombinante con constructos no heredables son semejantes a las de los que tienen constructos heredables e incluyen las características de producción, la terapia y la creación de resistencia a las enfermedades de los animales (Draghia-Akli *et al.*, 1997; Southwood *et al.*, 2004; Thacker *et al.*, 2006; Richt *et al.*, 2007)

Entre los métodos biológicos cabe mencionar el uso de secuencias víricas asociadas con el empaquetamiento, la entrada en las células y las funciones selectivas nucleares. Casi siempre se derivan de retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados o herpesvirus (véase el Cuadro 1). Además, hay datos recientes de vectores no víricos para la introducción de ADN recombinante en animales destinados al consumo humano (Manzini *et al.*, 2006).

Se puede considerar que las vacunas de ADN recombinante constituyen un tipo de constructos no heredables. El material genético de dichas vacunas puede estar formado por plásmidos, vectores basados en virus o fragmentos de ADN que codifican péptidos antigénicos derivados del patógeno en cuestión (Pachuk *et al.*, 2000). La finalidad general de la vacuna es

inducir en el animal una respuesta inmunitaria celular o humoral específica de un antígeno (Jechlinger, 2006). Aunque la utilización efectiva de vacunas de ADN recombinante está todavía en fase de desarrollo, hay métodos prometedores como la utilización de aerosoles transcutáneos, la electroporación y los liposomas. Por ejemplo, se ha demostrado que la inyección intramuscular es un método relativamente ineficaz de administración de las vacunas de ADN recombinante a los bovinos (Hurk *et al.*, 1998), mientras que la administración intradérmica por chorro de alta presión parece ser más eficaz (Carter y Kerr, 2003). Jecklinger *et al.* (2006) han demostrado que las vacunas de ADN recombinante pueden persistir durante algún tiempo en los episomas de los tejidos de los animales tratados.

5.3 Debate central

Aunque las preguntas se refieren a los "rasgos" heredables y no heredables, para el presente debate es más apropiado referirse a los "constructos" que son heredables o no heredables. El motivo es que el término "rasgos", tal como lo define la FAO, se refiere al fenotipo o una de las muchas características que definen un organismo, mientras que el presente análisis se basa en el examen de los propios genes de ADN recombinante como tales. Los constructos heredables son los que están integrados de manera estable en el genoma y se transmiten de generación en generación, mientras que los constructos no heredables pueden estar integrados en el genoma de las células somáticas, pero se supone que no hay una transmisión vertical.

Cuando se introducen constructos de ADN recombinante en animales, pueden producirse efectos múltiples. Éstos se caracterizan con frecuencia como "deseados" y "no deseados" o "directos" e "indirectos". Los efectos deseados y no deseados corresponden a resultados basados en el objetivo de la modificación. Los efectos deseados comprenden cambios en el animal de ADN recombinante conseguidos deliberadamente mediante la introducción del constructo de ADN recombinante y su producto o productos génicos previstos (por ejemplo, aumento de la tasa de crecimiento, resistencia a las infecciones). Pueden tener o no efectos directos o indirectos en la inocuidad de los alimentos. Los efectos no deseados pueden darse como consecuencia de cambios múltiples en el animal de ADN recombinante debidos a la interacción del constructo de ADN recombinante o sus productos génicos con la fisiología del animal. También éstos pueden tener o no efectos directos o indirectos en la inocuidad de los alimentos.

Se puede considerar que los efectos directos que despiertan preocupación en relación con la inocuidad de los alimentos son resultados adversos debidos al consumo humano de productos comestibles procedentes de animales de ADN recombinante que contienen el constructo de ADN recombinante o sus productos génicos. Los efectos adversos indirectos se pueden derivar del consumo humano de productos comestibles del animal de ADN recombinante que contienen peligros debidos al constructo o al producto génico que perturba la fisiología del animal destinado al consumo humano. Como ejemplos cabe mencionar los que afectan a la síntesis de un nutriente previsto, o bien la alteración de la concentración de una proteína fijadora de metales que puede no plantear ningún riesgo para el animal de ADN recombinante, pero sí para el consumo humano del alimento. Por otra parte, estos efectos indirectos pueden influir negativamente en el animal de ADN recombinante, pero sin crear ningún riesgo para el consumo humano del alimento (por ejemplo, estimulando la irritación local en un tejido no comestible que, debido a la falta de exposición humana por medio del consumo de alimentos, no crea ningún riesgo para las personas).

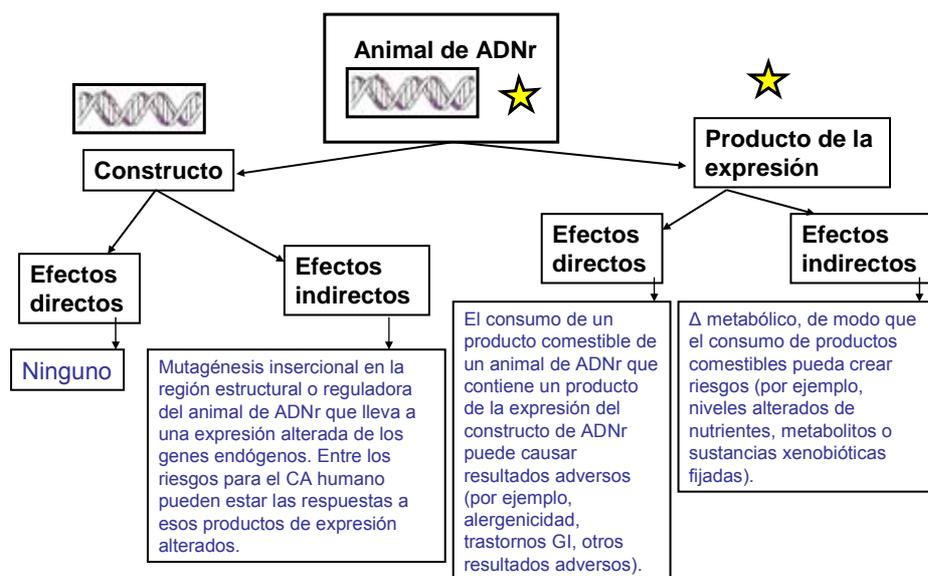


Figura 1. Síntesis teórica de los aspectos relativos a la evaluación de la inocuidad de los alimentos para los animales de ADN recombinante (ADNr) con constructos heredables (*CA*, *GI* y Δ indican consumo de alimentos, gastrointestinales y cambios, respectivamente).

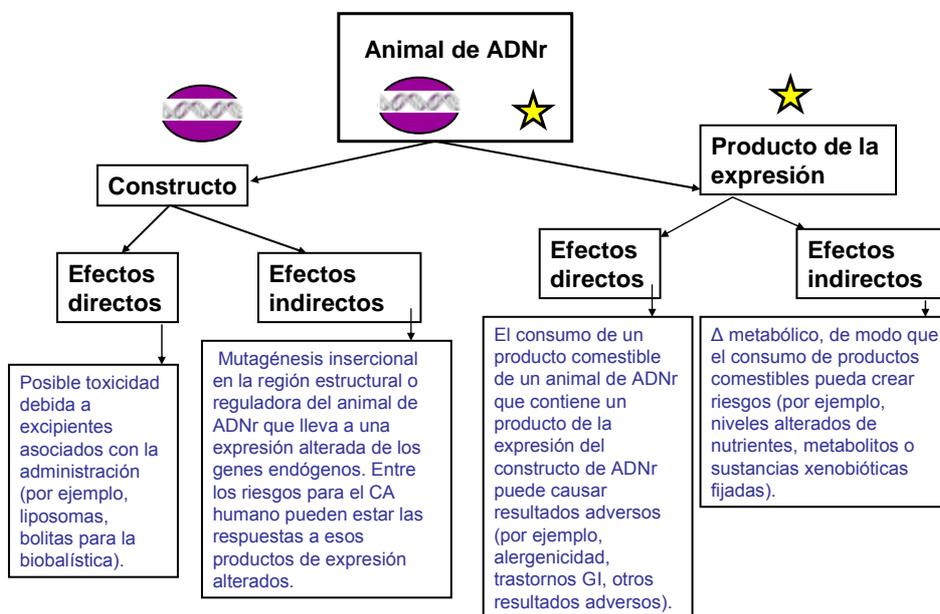


Figura 2. Síntesis teórica de los aspectos relativos a la evaluación de la inocuidad de los alimentos para los animales de ADN recombinante (ADNr) con constructos no heredables (*CA*, *GI* y Δ indican consumo de alimentos, gastrointestinales y cambios, respectivamente).

En las Figuras 1 y 2 se resumen los procesos de reflexión utilizados en la elaboración de la metodología para la identificación de los peligros y riesgos que puede acarrear el consumo de alimentos procedentes de animales de ADN recombinante con constructos heredables y no heredables, respectivamente. No se incluye una identificación completa del peligro o una evaluación amplia de los riesgos. En su presentación se han separado los efectos que se derivan del propio constructo de ADN recombinante y de los productos de su expresión y se los identifica como efectos directos o indirectos.

Con el fin de determinar si los constructos heredables y no heredables plantean riesgos diferentes para el consumo humano de alimentos, es importante caracterizar los tipos de constructos que se utilizan, su destino y su persistencia en el animal de ADN recombinante que se obtiene, sus perfiles de expresión y los posibles peligros que pueden crear para los propios animales de ADN recombinante. Hasta que no se consumen realmente los alimentos procedentes de estos animales de ADN recombinante no surgen riesgos para la salud humana. En el Cuadro 1 se resumen los principales tipos de constructos heredables y no heredables utilizados en la actualidad en dichas aplicaciones. Sin embargo, hay que señalar que este análisis de los constructos no heredables se basa en gran parte en la experiencia derivada de la terapia génica humana y, aunque se extrapole directamente a los animales destinados al consumo humano, se requiere una demostración empírica. En relación con la identificación de los posibles peligros para las personas a través del consumo de alimentos, en el Cuadro 1 se tienen en cuenta los métodos indicados en las Figuras 1 y 2.

Uno de los riesgos del consumo de alimentos asociado con el consumo de animales de ADN recombinante con constructos no heredables es el relativo a los "efectos de los excipientes". Éstos se refieren a la toxicidad directa e indirecta que puede producirse como consecuencia del consumo de tejidos con estos materiales. El grado de exposición puede ir desde cero hasta el total administrado al animal de ADN recombinante, dependiendo del tejido consumido y de la distribución y el destino del constructo de ADN recombinante y sus excipientes en el animal de ADN recombinante.

Como se observa en el Cuadro 1, es importante señalar que muchos constructos no heredables están integrados en los cromosomas de las células somáticas. Son ejemplos los derivados de retrovirus o transposones (reseñado por Kay *et al.*, 2001). Entre los constructos no heredables que permanecen en los episomas están los derivados de adenovirus o herpesvirus (reseñado por Thomas *et al.*, 2003). Se suele considerar que los virus adenoasociados derivados de constructos de ADN recombinante son episomales, aunque hay algunas pruebas de integración (Recchia *et al.*, 1999).

Aunque la mayor parte de esta información procede de la terapia génica humana, es importante señalar que el perfeccionamiento de esta tecnología hay ido acompañado de un esfuerzo internacional concertado para garantizar que estos vectores de origen vírico sean "lo más inocuos posible", como indican de manera resumida la Sociedad Americana de Terapia Génica (<http://www.asgt.org/>) y la Sociedad Europea de Terapia Génica y Celular (<http://www.esgt.org/>). Esto incluye los esfuerzos para limitar el grado en que puede producirse recombinación homóloga con virus endógenos, que podría dar lugar a: 1) inserción en regiones del genoma que podría afectar al crecimiento y el desarrollo; 2) recombinación, que conduciría a la reconstitución de partículas víricas activas e infecciosas; o 3) inestabilidad del constructo integrado. Otra preocupación que ha sido objeto de una actividad considerable de investigación y desarrollo ha sido la eliminación de la expresión de proteínas víricas que podrían provocar respuestas inflamatorias. Se prevé que se realizarán esfuerzos análogos para los vectores utilizados en los animales de ADN recombinante destinados al consumo humano (véase la Sección 7: Recomendaciones).

Se observó una complicación con la definición de animal de ADN recombinante tal como aparecía en la anterior Consulta de Expertos (FAO/OMS, 2004), de la que se desprendía que el término de animales de ADN recombinante se refería solamente a los animales que contenían constructos heredables. Se están produciendo animales para consumo humano y con otros fines utilizando constructos no heredables. Hay diferencias entre el carácter y el alcance de los riesgos del consumo de alimentos en relación con los animales de ADN recombinante producidos utilizando constructos heredables y no heredables, sobre todo cuando se utilizan excipientes para introducir constructos no heredables en animales receptores y cuando se pretende que los constructos de ADN recombinante sigan siendo episomales. Hay pruebas científicas recientes que indican que las vacunas de ADN recombinante se pueden mantener durante algún tiempo en los episomas de los tejidos de los animales tratados (Jecklinger *et al.*, 2006).

En el Cuadro 2 se presenta una síntesis de las diferencias entre los animales de ADN recombinante con constructos heredables y no heredables en relación con la evaluación de la inocuidad de los alimentos. La finalidad de este cuadro es determinar las características básicas de los constructos que presentan diferencias entre estos animales y que tienen repercusiones en las diferencias en cuanto a la manera en que se deberían realizar las evaluaciones de la inocuidad de los alimentos. Es importante subrayar que la finalidad de este cuadro no es identificar los posibles riesgos del consumo de alimentos que puedan derivarse de los animales de ADN recombinante, sino más bien determinar si se requeriría una evaluación distinta de la inocuidad del consumo de alimentos para los animales de ADN recombinante con estas dos clases de constructos.

Tomando como base estas diferencias identificadas entre los animales de ADN recombinante con constructos heredables y no heredables, en las Secciones 6 y 7 se presentan las conclusiones y recomendaciones, respectivamente, sobre las aplicaciones no heredables.

Cuadro 1: Características de los métodos para generar animales de ADN recombinante (ADNr) y sus posibles peligros para el consumo de alimentos (adaptado de Thomas *et al.*, 2003)

Tipo de constructo	Integrado/episomal	Liberación primaria	Transmisibilidad**	Destino/persistencia		Peligro para el animal	Peligros para el consumo de alimentos
				Constructo	Producto		
Derivado de retro/lentivirus* (Kay <i>et al.</i> , 2001, Park <i>et al.</i> , 2000; Naldini <i>et al.</i> , 1996)	Integrado	Los retrovirus requieren división celular, los lentivirus no	No prevista más allá de las células destinatarias	Estable en las células destinatarias, pero éstas se pueden eliminar	Puede disminuir con el tiempo debido al silenciamiento	Mutagénesis insercional del constructo en las células destinatarias; toxicidad local o sistémica por interacción con productos de la expresión	Ninguno del vector. Peligros directos e indirectos debidos al producto de la expresión o la perturbación de la fisiología del animal.
Derivado de transposones*	Integrado	Sólo introducción química o física; células en división o quiescentes	No prevista más allá de las células destinatarias	Estable en las células destinatarias, pero éstas se pueden eliminar	A menudo estable si no está silenciado. Las células se pueden eliminar	Mutagénesis insercional del constructo en las células destinatarias; toxicidad local o sistémica por interacción con productos de la expresión	Ninguno del constructo; puede tener excipientes persistentes. Peligros directos e indirectos debidos al producto de la expresión o la perturbación de la fisiología del animal.
ADN desnudo***	Integrado	Sólo introducción química o física; células en división o quiescentes	No prevista más allá de las células destinatarias	Estable en las células destinatarias, pero éstas se pueden eliminar	A menudo estable si no está silenciado. Las células se pueden eliminar	Mutagénesis insercional del constructo en las células destinatarias; toxicidad local o sistémica por interacción con productos de la expresión	Ninguno del constructo; puede tener excipientes persistentes. Peligros directos e indirectos debidos al producto de la expresión o la perturbación de la fisiología del animal.
Derivado de adenovirus* (Kafri <i>et al.</i> , 1998)	Episomal	Mediada por receptores. Células en división o no	No prevista más allá de las células destinatarias	Sin estabilidad prolongada documentada;	Vinculado a la persistencia del constructo si no está	Sin mutagénesis insercional. Toxicidad local o sistémica por interacción con	Inmunogenicidad transitoria (por exposición oral) si se consumen productos comestibles con

Cuadro 1: Características de los métodos para generar animales de ADN recombinante (ADNr) y sus posibles peligros para el consumo de alimentos
(adaptado de Thomas *et al.*, 2003)

Tipo de constructo	Integrado/episomal	Liberación primaria	Transmisibilidad**	Destino/persistencia		Peligro para el animal	Peligros para el consumo de alimentos
				Constructo	Producto		
				eliminación de la célula, se pueden eliminar células	silenciado	productos de la expresión. Puede haber potencialmente una respuesta inmunitaria a las proteínas víricas	un vector de liberación de origen vírico (efecto de los excipientes). Peligros directos e indirectos debidos al constructo de ADNr, el producto de la expresión o la perturbación de la fisiología del animal.
Derivado de virus adenoasociados* Nakai <i>et al.</i> , 2001	90% episomal/ 10% integrado ‡	Mediada por receptores. Células en división o no	No prevista más allá de las células destinatarias	Sin estabilidad prolongada documentada; eliminación de la célula, se pueden eliminar células	Vinculado a la persistencia del constructo si no está silenciado	Sin mutagénesis insercional. Toxicidad local o sistémica por interacción con productos de la expresión. Menos inflamatorio que los vectores de empaquetamiento derivados de adenovirus	Inmunogenicidad transitoria (por exposición oral) si se consumen productos comestibles con un vector de liberación de origen vírico (efecto de los excipientes). Peligros directos e indirectos debidos al constructo de ADNr, el producto de la expresión o la perturbación de la fisiología del animal.
Derivado de herpesvirus*	Episomal	Muy neurotrópica	No	Persistente	Vinculado a la persistencia del constructo si no está silenciado	Sin mutagénesis insercional. Toxicidad local o sistémica por interacción con productos de la expresión. Puede ser inflamatorio debido a la presencia de proteínas	Limitado al consumo de tejidos de origen neuronal. Peligros directos e indirectos debidos al constructo de ADNr, el producto de la expresión o la perturbación de la fisiología del animal en

Cuadro 1: Características de los métodos para generar animales de ADN recombinante (ADNr) y sus posibles peligros para el consumo de alimentos
(adaptado de Thomas *et al.*, 2003)

Tipo de constructo	Integrado/episomal	Liberación primaria	Transmisibilidad**	Destino/persistencia		Peligro para el animal	Peligros para el consumo de alimentos
				Constructo	Producto		
						víricas persistentes	esos tejidos.
Cromosomas artificiales	NA	Normalmente en células utilizadas como donantes para la transferencia nuclear	No a las células circundantes, puede ser heredable	Persistente	Vinculado a la persistencia del constructo si no está silenciado	Sin mutagénesis insercional. Toxicidad local o sistémica por interacción con productos de la expresión	Ninguno del vector. Peligros directos e indirectos debidos al producto de la expresión o la perturbación de la fisiología del animal.
Constructo heredable		Requiere la generación de un nuevo animal	NA	Estable, si no se pierde	Estable si no está silenciado	Mutagénesis insercional del constructo en las células destinatarias; toxicidad local o sistémica por interacción con productos de la expresión	Peligros directos e indirectos debidos al producto de la expresión o la perturbación de la fisiología del animal.

* Se supone que durante la construcción del vector desaparece la competición del virus por la replicación.

** De las células/tejidos destinatarios a los circundantes.

*** Se supone que el ADN se libera por medios químicos o físicos (liposomas, transfección, técnicas de biobalística, etc.) y no contiene las estructuras necesarias para la replicación (véase Cromosomas artificiales).

‡ Muchas de las características descritas aquí se basan en observaciones en personas (Thomas *et al.*, 2003). Las distintas referencias indican citas particulares que describen una característica concreta correspondiente a ese tipo de vector.

NA= No aplicable.

Cuadro 2: Síntesis de las diferencias entre los animales de ADNr con constructos heredables y no heredables: Repercusiones para la evaluación de la inocuidad de los alimentos			
Características del constructo de ADNr	Constructos heredables	Constructos no heredables	Repercusiones de las diferencias para la evaluación de la inocuidad de los alimentos
Naturaleza del constructo	Normalmente ADN lineal con regiones reguladoras y el gen de interés. También puede contener secuencias de la estructura central del vector propagador, p.e., el origen de la replicación, los marcadores seleccionables y otras secuencias procarióticas o eucarióticas.	Puede ser ADN lineal, una unidad de replicación autónoma u otra cosa (véase el Cuadro 1). También puede contener secuencias de la estructura central del vector propagador, p.e., el origen de la replicación, los marcadores seleccionables y otras secuencias procarióticas, víricas o eucarióticas.	Ninguna diferencia.
Método de introducción del constructo	Transferencia directa por liposomas y otros vectores no biológicos o por microinyección.	Se pueden usar vectores de origen biológico, aunque también se puede utilizar la transferencia directa por liposomas y otros vectores no biológicos.	Los excipientes en los animales de ADNr con constructos no heredables pueden plantear riesgos directos e indirectos para la inocuidad de los alimentos.
Células iniciales en las que se introduce el constructo	Célula germinal, embrión o célula donante para la transferencia nuclear.	Cualquier célula somática.	Ninguna diferencia. Con independencia de que el constructo sea heredable o no heredable, puede haber resultados adversos indirectos cuando se introducen en el genoma, debido a la interrupción de las secuencias reguladoras o codificadoras. No cabría esperar tales efectos para los constructos no heredables mantenidos en los episomas.

Cuadro 2 (continuación): Síntesis de las diferencias entre los animales de ADNr con constructos heredables y no heredables: Repercusiones para la evaluación de la inocuidad de los alimentos			
Características del constructo de ADNr	Constructos heredables	Constructos no heredables	Repercusiones de las diferencias para la evaluación de la inocuidad de los alimentos
Lugar, estabilidad y prevalencia del constructo en el animal de ADNr	Todas las células; una vez estabilizados deben ser constantes (salvo que haya pequeños focos de pérdida o reordenación).	NO todas las células (de focal a disperso; afectado por la vía y el método de introducción).	Aunque puede haber diferencias en el lugar y la cantidad de constructo de ADNr en los animales con constructos no heredables, ya que no hay riesgos directos en el consumo de alimentos vinculados al propio constructo, no hay diferencias en el riesgo del consumo de alimentos.
Expresión del constructo: tipo de células, cantidad y duración	Todas las células son posibles, pero puede ser específico de una célula, un tejido o una fase de desarrollo. Cantidad probablemente constante en los animales de ADNr de la misma estirpe. Duración probablemente estable.	Sólo un subconjunto de células; puede haber expresión ectópica si se utilizan estimulantes inespecíficos. La cantidad puede variar entre células/tejidos y entre animales.	Aunque en los animales de ADNr se puede estimar la dosis del producto de la expresión con los constructos tanto heredables como no heredables, la variación puede ser mayor en los segundos, afectando a los requisitos de muestreo. Algunas células, tejidos u órganos no tienen ningún constructo (no heredable) o ninguna expresión del constructo (constructos heredables o no heredables específicos de un tejido).

Cuadro 2 (continuación): Síntesis de las diferencias entre los animales de ADN_r con constructos heredables y no heredables: Repercusiones para la evaluación de la inocuidad de los alimentos

Características del constructo de ADN _r	Constructos heredables	Constructos no heredables	Repercusiones de las diferencias para la evaluación de la inocuidad de los alimentos
Generación de más animales de ADN _r	Reproducción o transferencia nuclear.	Introducción de constructos no heredables (véase el Cuadro 1).	<p><u>Animales de ADN_r con constructos heredables</u>: Una vez establecido el genoma, las predicciones de nuevos animales de ADN_r del mismo "genoma" deben seguir las previsiones mendelianas y la evaluación de la inocuidad de los alimentos se puede hacer sobre un animal de ADN_r "prototípico".</p> <p><u>Animales de ADN_r con constructos no heredables</u>: Cada animal se puede considerar único, y si no se controlan de cerca los protocolos y se formulan hipótesis del peor de los casos para todos los animales obtenidos mediante un protocolo habrá que evaluar individualmente la inocuidad de los alimentos.</p>

En el Cuadro 3 se resumen las principales conclusiones de la Consulta en respuesta a las dos preguntas formuladas acerca de los animales de ADN recombinante con constructos heredables frente a los no heredables. En la mayoría de los aspectos se llegó a la conclusión de que no hay diferencias importantes con respecto a las preocupaciones sobre la inocuidad de los alimentos en función de que los constructos de ADN recombinante estén integrados o no en las células germinales, sino que más bien las preocupaciones dependen del constructo de ADN recombinante, su estado de integración y su producto correspondiente. Así pues, las diferencias con respecto a la inocuidad de los alimentos aparecen entre los constructos de ADN recombinante integrados y no integrados (es decir, episomales). Por consiguiente, la principal diferencia entre los animales de ADN recombinante con constructos heredables y no heredables con respecto a la inocuidad de los alimentos no se debe al transgén, sino más bien a la posible presencia de los excipientes utilizados para transferir el constructo de ADN recombinante en la aplicación no heredable, ya que el animal primario sería el que entra en la cadena alimentaria, por lo que puede haber exposición de las personas que consumen el alimento. Tomando como base la metodología expuesta en las Figuras 1 y 2 y en los Cuadros 1 y 2, en el Cuadro 3 se resumen las posibles cuestiones sobre la inocuidad de los alimentos en relación con los peligros para el animal, los peligros del consumo de alimentos y los riesgos del consumo de alimentos.

En cuanto a los peligros para el animal que pueden tener repercusiones en la inocuidad de los alimentos, las principales diferencias entre los animales de ADN recombinante con constructos heredables y no heredables son las siguientes: 1) los constructos mantenidos en los episomas no producen mutaciones insercionales; y 2) los problemas debidos a la presencia de excipientes. Una cuestión conexas es que tanto los fenómenos de transferencia horizontal de genes como de recombinación son vías teóricas para la propagación de nuevos peligros en los animales. Los constructos de ADN recombinante mantenidos como episomas pueden ser más accesibles para los fenómenos de transferencia horizontal de genes, pero no se excluye la posibilidad de dicha transferencia con la intervención de un constructo integrado. También hay que señalar que la posibilidad de recombinación puede estar relacionada con la presencia de secuencias víricas, bacterianas o de otra procedencia en el constructo de ADN recombinante.

En relación con los peligros del consumo de alimentos, también en este caso las diferencias entre los alimentos obtenidos de animales de ADN recombinante con constructos heredables y no heredables están en función de: 1) la integración del constructo; y 2) los efectos de los excipientes en los animales de ADN recombinante con constructos no heredables. Aunque el nivel del producto de la expresión del ADN recombinante puede variar entre los constructos no heredables y los heredables, las repercusiones en la inocuidad de los alimentos no están en función de si el constructo de ADN recombinante es heredable o no. Los excipientes en los animales de ADN recombinante con constructos no heredables pueden crear peligros directos e indirectos para el consumo de alimentos, debido a que con ellos hay más oportunidades de exposición a los excipientes que con los animales de ADN recombinante con constructos heredables, ya que los excipientes se perderían con el paso de las generaciones. Una cuestión conexas es que tanto los fenómenos de transferencia horizontal de genes como de recombinación son vías teóricas para la propagación de nuevos peligros en los animales. Los constructos de ADN recombinante mantenidos como episomas pueden ser más accesibles para los fenómenos de transferencia horizontal de genes, pero no se excluye la posibilidad de dicha transferencia con la intervención de un constructo integrado.

Con respecto a los riesgos del consumo de alimentos, la única diferencia cualitativa es la mayor oportunidad de exposición a los excipientes en los alimentos procedentes de animales con constructos no heredables que con los animales de ADN recombinante que tienen constructos heredables. Solamente se producen riesgos relacionados con los excipientes cuando las células o los tejidos que se consumen los contienen y, como se ha señalado más arriba, los excipientes no están presentes en los animales con constructos heredables. Pueden surgir diferencias cuantitativas en los riesgos del consumo de alimentos basadas en la modalidad de la expresión y en la cantidad de constructo, pero no en su heredabilidad.

Cuadro 3. Resumen de los peligros y los riesgos en los animales de ADN recombinante (ADNr) con constructos heredables y no heredables		
	Los mismos	Diferentes
Peligros para los animales	<p>Mutagénesis insercional para los constructos integrados de ADNr.</p> <p>Peligros de los productos de la expresión.</p> <p>Efectos locales, incluida la recombinación y sus secuelas, si se utilizan vectores víricos semejantes para introducir constructos no heredables y heredables.</p> <p>Los factores básicos que influyen en la probabilidad de un resultado adverso de la transferencia horizontal de genes y la recombinación son el origen de las secuencias en el constructo (por ejemplo, secuencias bacterianas, víricas u otras eucarióticas), pero no de su heredabilidad.</p>	<p>Mutagénesis no insercional para los constructos no heredables mantenidos en los episomas.</p> <p>Efectos de los excipientes.</p>
Peligros del consumo de alimentos	<p>Pueden derivarse de la mutagénesis insercional en el animal de ADNr.</p> <p>El nivel del producto de la expresión puede diferir entre los constructos no heredables y heredables, pero cualitativamente sigue siendo el mismo.</p> <p>Los factores básicos que influyen en la probabilidad de un resultado adverso de la transferencia horizontal de genes y la recombinación son el origen de las secuencias en el constructo (por ejemplo, secuencias bacterianas, víricas u otras eucarióticas), pero no de su heredabilidad.</p>	<p>No hay mutagénesis insercional para los constructos no heredables mantenidos en los episomas.</p> <p>Los excipientes en los animales de ADNr con constructos no heredables pueden plantear peligros directos e indirectos para el consumo de alimentos. Con los constructos no heredables hay más oportunidad de exposición a los vectores que con los animales de ADNr con constructos heredables, debido a los "efectos de dilución".</p>
Riesgos del consumo de alimentos	<p>Dependen de la modalidad de la expresión y la cantidad de constructo, no de la heredabilidad del constructo de ADNr.</p>	<p>Los riesgos relacionados con los excipientes están en función de la exposición potencial (que las células o los tejidos que se consumen contengan o no los excipientes).</p> <p>Con los constructos no heredables hay más oportunidades de exposición a los vectores que con los animales de ADNr con constructos heredables, debido a los "efectos de dilución".</p>

6. Conclusiones

6.1 Conclusiones sobre los genes marcadores e indicadores

- ***¿Qué avances se han producido en la elaboración y uso de genes indicadores y marcadores seleccionables?***

- Para detectar y/o seleccionar la introducción con éxito de ADN foráneo en células animales se utilizan por lo menos tres tipos importantes de genes marcadores.

- La mayor parte de los representantes de estas tres clases de marcadores se consiguieron como instrumentos básicos de investigación. Por el momento es insuficiente la información sobre la inocuidad de los alimentos procedentes de animales de ADN recombinante con estos genes marcadores. No obstante, se puede utilizar información de otras especies como punto de partida para realizar nuevas investigaciones sobre los aspectos de los genes marcadores relativos a la inocuidad.

- Los genes marcadores para la selección tanto positiva como negativa serán cada vez más importantes, en coordinación con la transferencia nuclear desde células somáticas o pluripotentes, para la generación de animales de ADN recombinante destinados al consumo humano.

- ***¿Existen genes marcadores o indicadores ajenos a los de la resistencia a los antibióticos cuya inocuidad para los seres humanos en los productos alimenticios haya sido demostrada, y en su caso, cuáles son?***

- Aunque existen muchos genes marcadores o indicadores ajenos a los de la resistencia a los antibióticos, en la actualidad se utilizan pocos para producir animales de ADN recombinante destinados al consumo humano.

- Se tiene experiencia sobre la utilidad, la estabilidad y el rendimiento de estos genes marcadores, procedente de estudios de modelos animales en el laboratorio. Sin embargo, los resultados del limitado número de estudios que se han realizado sobre la inocuidad de los genes marcadores ajenos a los antibióticos en animales de ADN recombinante destinados al consumo humano no son concluyentes.

- ***Cuando se desea suprimir secuencias específicas de ADN, ¿se dispone de técnicas fiables y seguras para hacerlo con carácter habitual?***

- Los sistemas de recombinación específica de un lugar pueden constituir un medio funcional para la eliminación de genes marcadores, siempre que se adopten medidas para reducir al mínimo los efectos en organismos no destinatarios.

- La información científica de interés para los aspectos de los sistemas de escisión específica de un lugar que están relacionados con la inocuidad de los alimentos es limitada.

6.2 Conclusiones sobre las aplicaciones no heredables

- ***¿Existen diferencias relevantes desde la perspectiva de la inocuidad de los alimentos entre animales con rasgos heredables y no heredables, y de ser así, cuáles son?***

- Las diferencias en los peligros para el consumo de alimentos que plantean los animales de ADN recombinante están en función de: a) el estado de integración (y el origen y la composición de las

secuencias) del constructo, y no de su heredabilidad, y b) los efectos de los excipientes, que hay que evaluar en los animales de ADN recombinante con constructos no heredables.

- No hay ninguna diferencia cualitativa entre los constructos heredables o no heredables con respecto al carácter de los peligros y los riesgos cuando los constructos están integrados en el cromosoma.

- Pueden surgir diferencias cuantitativas en la inocuidad de los alimentos obtenidos de animales de ADN recombinante que contienen constructos de ADN recombinante heredables o no heredables a partir de la pauta de expresión y de la cantidad de constructo, no de su heredabilidad.

- La posibilidad de que se produzca transferencia horizontal de genes está en función de que el constructo de ADN recombinante esté integrado o no en el genoma de las células receptoras o se mantenga en los episomas, y no de la heredabilidad del constructo. El ADN recombinante episomal (heredable y no heredable) se puede transferir o incorporar con mayor facilidad que el ADN recombinante integrado por las bacterias o las células somáticas de animales o de personas que consumen productos alimenticios obtenidos de animales de ADN recombinante. Esto puede crear riesgos para la sanidad animal, pero no está claro en qué medida la transferencia potencial de genes horizontales puede representar un riesgo para la salud humana por el consumo de alimentos.

• ***¿Existen cuestiones específicas sobre inocuidad de los alimentos (por ejemplo referentes a los tipos de vectores) que se deberían considerar en relación con la evaluación de la inocuidad de los alimentos derivados de animales que posean rasgos heredables/no heredables?***

- Pueden surgir diferencias cuantitativas en la inocuidad de los alimentos obtenidos de animales de ADN recombinante con constructos de ADN recombinante heredables o no heredables en la medida en que los vectores puedan contener secuencias víricas. En este caso, la recombinación con secuencias víricas endógenas podría dar lugar a riesgos para la sanidad de los animales de ADN recombinante. El grado en el que estos riesgos para la sanidad animal representan un riesgo para el consumo humano de alimentos está en función, entre otras cosas, de la gama de huéspedes de los virus recombinados resultantes.

7. Recomendaciones

7.1 Recomendaciones sobre los genes marcadores e indicadores

- Se recomienda firmemente la validación y el perfeccionamiento constantes de sistemas de escisión de genes para permitir la eliminación controlada de secuencias específicas de ADN en los animales de ADN recombinante. Esto está en consonancia con los resultados de la Consulta FAO/OMS de Expertos de 2004, que recomendó que se evitara el uso de secuencias innecesarias de ADN en el constructo génico, incluidos los genes marcadores (FAO/OMS, 2004).
- Se necesitan nuevas investigaciones que se concentren en estudios relativos a los alimentos obtenidos de animales de ADN recombinante, a fin de evaluar la inocuidad de los genes marcadores ajenos a los de la resistencia a los antibióticos y los sistemas de escisión de genes.
- Es conveniente obtener marcadores novedosos ajenos a los de la resistencia a los antibióticos que faciliten la selección eficaz positiva y negativa de células transgénicas.
- Para reducir al mínimo la posibilidad de efectos en organismos no destinatarios, los animales de ADN recombinante destinados al consumo humano deben estar libres del sistema de escisión de genes introducidos.

7.2 Recomendaciones sobre las aplicaciones no heredables

- Se identificaron algunos posibles peligros para la sanidad animal asociados con el uso de secuencias víricas, incluida la posibilidad de recombinación y de expresión posterior, de patogenicidad alterada y de transcripción inversa de secuencias víricas de ARN. Estas cuestiones deberían constituir la base de unas directrices sobre la utilización inocua de vectores de origen vírico para aplicaciones no heredables en la sanidad y la producción animales. Las últimas novedades sobre los vectores episomales no víricos permiten superar muchas de las preocupaciones asociadas con los sistemas de vectores basados en virus. En estas directrices se deberían tener en cuenta los principios de las directrices elaboradas para la terapia génica humana. Un lugar apropiado para la elaboración de dichas directrices sería la OIE.
- Con el fin de reducir al mínimo la probabilidad de una manifestación adversa que representaría un riesgo para la sanidad de los animales de ADN recombinante por medio de la transferencia horizontal de genes a organismos procarióticos, la región o regiones codificadoras de los genes de los constructos de ADN recombinante que están integradas en el genoma del animal de ADN recombinante deberían contener intrones. (Las bacterias no contienen el mecanismo celular para el desprendimiento de los intrones, por lo que no podrían formar un producto funcional en el caso de que tuviera lugar una transferencia horizontal de genes.)
- También hay que tener cuidado para que la salud del animal de ADN recombinante no se vea en peligro en el proceso de obtención de un producto alimenticio inocuo. Las cuestiones relativas a la sanidad animal deben constituir la base de unas directrices sobre la sanidad de los animales de ADN recombinante semejantes a las que está preparando la OIE para los clones de animales. Un lugar apropiado para la elaboración de dichas directrices sería la OIE.

- Hay que fomentar la realización de nuevas investigaciones directas que contribuyan a aclarar si los peligros para la inocuidad de los alimentos se ven afectados por:
 - a) la posible transferencia horizontal de genes a células procarióticas o eucarióticas;
 - b) el ADN recombinante con secuencias víricas que forman parte de los constructos no heredables (por ejemplo, la recombinación vírica).
- Debido a que los animales de ADN recombinante que contienen constructos no heredables pueden presentar una variación mayor entre animales en los productos de expresión de los constructos de ADN recombinante, es necesario establecer unas directrices sobre las estrategias de muestreo apropiadas desde el punto de vista estadístico para evaluar la exposición y los riesgos potenciales derivados del consumo de alimentos obtenidos de animales de ADN recombinante con constructos no heredables. Los lugares apropiados para la elaboración de dichas directrices serían los organismos internacionales de normalización que se ocupan de la sanidad animal y la inocuidad de los alimentos (por ejemplo, la FAO, la OMS, la OIE).
- Las organizaciones intergubernamentales internacionales apropiadas, como la FAO/OMS, deberían establecer y mantener una base de datos amplia a disposición del público sobre todos los resultados notificados derivados del consumo de alimentos obtenidos de organismos de ADN recombinante, incluidos los resultados de cualquier investigación posterior a esos informes.
- Las organizaciones internacionales pertinentes, como la OIE, deberían establecer y mantener una base de datos amplia a disposición del público sobre los métodos de introducción de constructos de ADN recombinante heredables y no heredables en animales, acompañados por una bibliografía completa.
- No sería inapropiado utilizar los principios y métodos expuestos en el Proyecto de Directrices⁴ que se aplican a la evaluación de la inocuidad de los alimentos de animales de ADN recombinante, con las salvedades añadidas relativas a los excipientes y los episomas, para la evaluación de la sanidad animal y la inocuidad de los alimentos obtenidos de animales portadores de constructos no heredables para la producción o con otros fines, a fin de evaluar la inocuidad de los alimentos procedentes de animales tratados con vacunas de ADN recombinante.
- Debido a la complejidad y la importancia de las cuestiones relativas a la sanidad animal y la inocuidad de los alimentos que se plantean en relación con las vacunas de ADN recombinante, debería examinar estas cuestiones un grupo mixto de expertos FAO/OMS/OIE.

⁴ Se está elaborando en los Trámites 3 y 4 del Proceso del Codex un Anteproyecto de Directrices para la Realización de Evaluaciones de la Inocuidad de los Alimentos Obtenidos de Animales con ADN Recombinante (véase ALINORM 07/30/34).

8. Referencias

8.1 Genes marcadores e indicadores

- Aigner, B. & Brem, G. 1993. Tyrosinase as a marker gene and model for screening transgenes in mice and rabbits. *Theriogenology* 39: 177.
- Beermann, F., Ruppert, S., Hummler, E., Bosch, FX., Muller, G., Ruther, U. & Schuetz, G. 1990. Rescue of the albino phenotype by introduction of a functional tyrosinase gene into mice. *EMBO J* 9: 2819-2826.
- Brophy, B., Smolenski, G., Wheeler, T., Wells, D., L'Huillier, P.L. & Laible, G. 2003. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta casein and kappa casein. *Nature Biotechnology* 21 157-162.
- Hyodo-Taguchi, Y., Winkler, C., Kurihara, Y., Scharl, A. & Scharl, M. 1997. Phenotypic rescue of the albino mutation in the medakafish (*Oryzias latipes*) by a mouse tyrosinase transgene. *Mechanisms of Development* 68: 27-35.
- Inagaki, H., Koga, A., Bessho, Y. & Hori, H. 1998. The tyrosinase gene from medakafish: transgenic expression rescues albino mutation. *Pigment Cell Research* 11: 283-290.
- Kinoshita, M., Morita, T., Toyohara, H., Hirata, T., Sakaguchi, M., Ono, M., Inoue, K., Wakamatsu, Y. & Ozato, K. 2001. Transgenic medaka overexpressing a melanin-concentrating hormone exhibit lightened body color but no remarkable abnormality. *Marine Biotechnology* 3: 536-43.
- Lai, L., Kang, J.X., Li, R., Wang, J., Witt, W.T., Yang, H.Y., Hao, Y., Wax, D.M., Murphy, C.M., Rieke, A., Sammel, M., Linville, M.L., Korte, S.N., Evans, R.W., Starzi, T.E., Prather, R.S. & Dai, Y. 2006. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nature Biotechnology* 24: 435-436.
- Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H. & Ke, N.J. 1999. Is green fluorescent protein toxic to living cells? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 260: 712-717.
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., van Drunen, E., Kanaar, R., Berns, A. & Jonkers, J. 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* 98: 9209-9214.
- Niemann, H., Kues, W.A. & Carnwath, J.W. 2005. Presente y futuro del ganado transgénico. *Revista científica y técnica de la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal)*. 24: 285-298.
- Niemann, H. & Kues, W.A. 2003. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Animal Reproduction Science* 79: 291-317.
- Niemann, H. & Kues, W.A. 2000. Transgenic livestock premises and promises. *Animal Reproduction Science* 60-61: 277-291.
- Richards, H.A., Han, C.T., Hopkins, R.G., Failla, M.L., Ward, W.W. & Stewart, C.N. Jr. 2003. Safety assessment of recombinant green fluorescent protein orally administered to rats. *Journal of Nutrition*, 133: 1909-1912.
- Richt, J.A., Kasinathan, P., Hamir, A., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., Kato, S., Ishida, I., Soto, C., Robl, J.M. & Kuroiwa, Y. 2007. Production of cattle lacking prion protein. *Nature Biotechnology* 25: 132-138.
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S. & Capecci, M.R. 2000. Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proceedings of the National Academy of Science U S A* 97: 13702-13707.

Van de Lavoie, M.C., Diamond, J.H., Leighton, P., Mather-Love, C., Heyer, B.S., Bradsaw, R., Kerchner, A., Hooi, L., Gessaro, T.M., Swanberg, S.E., Delany, M.E. & Etches, R.J. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441: 766-769.

Morrow, J.K. 2006. Epitope tagging generates new products. *Genetic Engineering & Biotechnology News* 26.

8.2 Aplicaciones no heredables

Anson, D.S. 2004. The use of retroviral vectors for gene therapy what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genetic Vaccines and Therapy*, 2:9.

Burton, E.A., Wechuck, J.B., Wendell, S.K., Goins, W.F., Fink, D.J. & Glorioso, J.C. 2001. Multiple applications for replication defective herpes virus vectors. *Stem Cells* 19: 358-377.

Carter, E.W. & Kerr, D.E. 2003. Optimization of DNA-based vaccination in cows using green fluorescent protein and Protein A as a prelude to immunization against Staphylococcal mastitis. *Journal of Dairy Science* 86: 1177-1186.

Draghia-Akli, R., Li, X. & Schwartz, R.J. 1997. Enhanced growth by ectopic expression of growth hormone releasing hormone using an injectible myogenic vector. *Nature Biotechnology* 15: 1285-1289.

Van Drunen Littel-van den Hurk, Braun, R.P., Lewis, P.J., Karvonen, B.C., Baca-Estrada, M.E., Snider, M., McCartney, D., Watts, T. & Babiuk, L.A. 1998. Intradermal immunization with a bovine herpes virus -1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. *Journal of General Virology* 79: 831-839.

Jechlinger, W. 2006. Optimization and delivery of plasmid DNA for vaccination. *Expert Review of Vaccines* 5: 803-825.

Kafri, T., Morgan, D., Krahl, T., Sarvetnick, N., Sherman, L. & Verma, I. 1998. Cellular immune response to adenoviral vector infected cells does not require *de novo* viral gene expression: implications for gene therapy. *Proceedings of the National Academies of Sciences USA* 95: 11377-11382.

Kay, M.A., Glorioso, J.C. & Naldini, L. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Medicine* 7: 33-40.

Kochhar, H. P. S. & Evans, B. R. 2007. Current status of regulating biotechnology-derived animals in Canada and animal health and food safety considerations. *Theriogenology* 67:188-197.

Kopp, J., Wang, G.Y., Kulmburg, G., Schultze-Mosqau, S., Huan, J.N., Ying, K., Seyhan, H., Jeschke, M.D., Kneser, U., Bach, A.D., Ge, S.D., Dooley, S. & Horch, R.E. 2004. Accelerated wound healing by *in vivo* application of keratinocytes over expressing KGF. *Molecular Therapy* 10: 86-96.

Lavitrano M., Forni M., Bacci ML., Di Stefano C., Varzi V., Wang H., & Seren E. 2003. Sperm mediated gene transfer in pig: Selection of donor boars and optimization of DNA uptake. *Molecular reproduction and development* 64(3): 284-291.

Manzini, S., Varqiolu, A., Stehle, I.M., Bacci, M.L., Cerrito, M.G., Giovannoni, R., Zannoni, A., Bianco, M.R., Forni, M., Donini, P., Papa, M., Lipps, H.J. & Lavitrano, M. 2006. Genetically modified pigs produced with a nonviral episomal vector. *Proceedings of the National Academies of Sciences*.103: 17672-17677.

Mehier- Humbert, S. & Guy, R.H. 2005. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57: 733-753.

- Nakai, H., Yant, S.R., Storm, T.A., Fuess, S., Meuse, L. & Kay, M.A. 2001. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *Journal of Virology* 75: 6969-6976.
- Pachuk, C.J., McCallus, D.E., Weiner, D.B. & Satishchandran, C. 2000. DNA vaccines—challenges in delivery. *Current Opinion in Molecular Theory* 2: 188-198.
- Park, F., Ohashi, K., Chiu, W., Naldini, L. & Kay, M.A. 2000. Effective lentiviral transduction of liver requires cell cycling. *Nature Genetics* 24: 49-52.
- Recchia, A., Parks, R.J., Lamartina, S., Toniatti, C., Pieroni, L., Palombo, F., Ciliberto, G., Graham, F.L., Cortese, R., La Monica, M. & Colloca, S. 1999. Site-specific integration mediated by hybrid adenovirus/ adeno-associated virus vector. *Proceedings of the National Academies of Sciences USA* 96: 2615-2620.
- Richt, J. A., Kasinathan, P., Hamir, A.N., Castilla, J., Sathiyaseelan, T., Vargas, F., Sathiyaseelan, J., Wu, H., Matsushita, H., Koster, J., Kato, S., Ishida, I., Soto, C., Robl, J.M. & Kuroiwa, Y. 2007. Production of cattle lacking prion protein. *Nature Biotechnology* 25: 132-138.
- Smith, K.R. 2002. Gene transfer in higher animals: theoretical considerations and key concepts. *Journal of Biotechnology* 99: 1-22.
- Sorrell, D.A. & Kolb, A.F. 2005. Targeted modification of mammalian genomes. *Biotechnology Advances* 23: 431-469.
- Southwood, L.L., Frisbie, D.D., Kawcak, C.E. McIlwraith, C.W. 2004. Delivery of growth factors using gene therapy to enhance bone healing. *Veterinary Surgery* 33: 565-578.
- Sun, H-C., Xue, F-M., Qian, K., Fang, H-X., Qiu, H-L., Zhang, X-Y. & Yin, Z-H. 2006. Intramammary expression and therapeutic effect of a human lysozyme-expressing vector for treating bovine mastitis. *Journal of Zhejiang University Science B* 7: 324-330.
- Thacker, E.L., Holtkamp, D.J., Khan, A.S., Brown, P.A. & Draghia-Akli, R. 2006. Plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone efficacy in reducing disease associated with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Journal of Animal Science* 84: 733-742.
- Thomas, C.E., Ehrhardt, A. & Kay, M.A. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Genetics* 4: 346-358.
- Wheeler, M. (2007). Agricultural applications for transgenic livestock. *Trends in Biotechnology* 25(5): 204-208.

9. Glosario

Animal de ADN recombinante es un animal cuyo material genético se ha modificado mediante técnicas de ácidos nucleicos *in vitro*, incluidos el ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante y el ácido ribonucleico (ARN) recombinante y la inyección directa de ácidos nucleicos en células y orgánulos.

Animal modificado genéticamente es equivalente a animal de ADN recombinante y ambos términos se utilizan indistintamente.

Constructo es el ADN utilizado en la transferencia a una célula o tejido. El constructo puede estar formado por uno o varios genes de interés, un gen marcador y secuencias de control apropiadas como un conjunto único. Un constructo utilizado repetidamente se puede denominar casete.

Constructo heredable es un constructo que se incorpora de manera estable al genoma y se transmite de generación en generación.

Constructo no heredable es un constructo que se puede integrar en el genoma de células somáticas, pero no es previsible su transmisión vertical, es decir, que se herede de una generación a otra.

Efecto de los excipientes es cualquier efecto directo o indirecto como consecuencia de la exposición a ellos.

Episoma (episomal) es un elemento genético extracromosómico (por ejemplo el factor F en *Escherichia coli*) que se mantiene dentro de una célula independientemente del cromosoma, pero que puede integrarse en el cromosoma huésped. La fase de integración puede estar regida por diversos factores, de manera que el término *episoma* se ha sustituido por el más amplio de plásmido.

Excipiente es el material que sirve como vehículo para la liberación de constructos no heredables, por ejemplo liposomas, bolitas de oro utilizadas en la aplicación de la biobalística y fosfato de calcio utilizado para la transfección.

Gen indicador es un gen que codifica un producto que se puede analizar fácilmente. Se utiliza como marcador para confirmar la incorporación de un transgén a una célula, órgano o tejido y como medio de comprobación de la eficacia de estimulantes específicos.

Genes marcadores son los que se utilizan para determinar si un fragmento de ADN se ha introducido con éxito en la célula animal. Los genes marcadores se usan en la selección y/o en la detección.

Homólogo tradicional se refiere a una raza de un animal con antecedentes conocidos de utilización inocua como alimento del cual se ha derivado una estirpe de animal de ADN recombinante, así como los acompañantes en la reproducción utilizados para generar los animales que en último término se utilizan como alimento, y/o los alimentos derivados de tales animales.

Producto de la expresión es una molécula específica de ARN que puede codificar una secuencia proteica y la proteína resultante. Algunos ARN no codifican una proteína, sino que desempeñan una función reguladora o biológica.

Rasgo es una de las muchas características que definen un organismo. El fenotipo es una descripción de uno o varios rasgos. Sinónimo: carácter.

Recombinasas son un tipo de enzimas capaces de alterar la disposición de las secuencias de ADN de manera específica de un lugar. Algunas de estas enzimas pueden escindir segmentos de ADN entre lugares específicos de reconocimiento.

Transfección es la introducción de un constructo de un ácido nucleico en una o varias células, de manera que se mantiene intacto y conserva su función.

Transferencia horizontal de genes se refiere a la incorporación de moléculas de ADN a células independientemente de los procesos reproductivos normales.

Transferencia nuclear de células somáticas es la producción asexual de organismos en los cuales una célula somática proporciona un genoma donante y se reprograma para producir una copia genética del animal donante.

Transgén se refiere a un constructo genético heredable que se ha integrado en la línea germinal de un organismo.

Transgénico es un animal que contiene un constructo.

Vectores son los vehículos para la introducción de constructos de ADN recombinante en animales o células receptores, por ejemplo un plásmido, un virus o una bacteria.

Lista de participantes

EXPERTOS

BENFEY, Tillmann J., Profesor, Departamento de Biología, Universidad de New Brunswick, P. O. Box 4400, Fredericton, NB E3B 5A3, Canadá (Tel. 001 506 452 6293, Fax. 001 506 453 3583, Correo electrónico: benfey@unb.ca)

BURACHIK, Moisés, Coordinador General, Oficina de Biotecnología, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos Av., Paseo Colón 922 (2° piso, Oficina 247), C1063ACW Buenos Aires, Argentina (Tel. +54 11 4349 2074, Fax. +54 11 4349 2178, Correo electrónico: mburac@mecon.gov.ar)

ELMAGBOUL, Salma Bushra Abdel Rahman, Jefe del Departamento de Biología Molecular, Central Veterinary Research Laboratory, Animal Resources Research Corporation (ARCC), P. O. Box 8067, Khartoum, Sudán (Tel. +249 1227 18328) Correo electrónico: Salma_elmagboul@yahoo.com)

GILL, Harsharn, Director de Investigación - Animal Production Sciences, Primary Industries Research Victoria, Department of Primary Industries - Werribee Centre, 600 Sneydes Road, Werribee, Victoria 3030, Australia (Tel. +61 3 9742 0425, Fax. +61 3 9742 8617, Correo electrónico: harsharn.gill@dpi.vic.gov.au)

HANSEN, Michael, Científico Superior, Consumers Union, 101 Truman Avenue, Yonkers, NY 10703, Estados Unidos (Tel. 001 914 378 2452, Fax. 001 914 378 2928, Correo electrónico: hansmi@consumer.org, cc: rabito@consumer.org)

HO, Mae-wan, Director, Institute of Science in Society, ISIS Foundation, 29 Tytherton Road, London N19 4PZ, Reino Unido (Tel. 0044 20 7272 5636, Correo electrónico: m.w.ho@i-sis.org.uk)

HOUEBINE, Louis-Marie, Biologie du Développement et Reproduction, Institut National de la Recherche Agronomique, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, Francia (Tel. +33 1 3465 2540, Fax. +33 1 3465 2241, Correo electrónico: louis.houdebine@jouy.inra.fr)

KAPUSCINSKI, Anne R., Profesora de Pesca y Biología de la Conservación, Sea Grant Extension Specialist in Biotechnology and Aquaculture, y Directora, Institute for Social, Economic and Ecological Sustainability, University of Minnesota, 200 Hodson Hall, 1980 Folwell Avenue, St. Paul, MN 55108, Estados Unidos (Tel. 001 612 624 7719, Fax. 001 612, 625 5299, Correo electrónico: kapus001@umn.edu)

KELLY, Lisa, Científica Principal, Scientific Risk Assessment and Evaluation, Food Standards Australia New Zealand, P. O. Box 7186, Canberra Mail Centre, ACT 2610, Australia (Tel. +61 3 6248 8649, Fax. +61 2 6271 2278, Correo electrónico: lisa.kelly@foodstandards.gov.au)

MACKENZIE, Anne A., Asesora Científica, Programs Branch, Canadian Food Inspection Agency, 159 Cleopatra Drive, Ottawa, Ontario K1A 0Y9, Canadá (Tel. 001 613 221 7084, Fax. 001 613 221 0790, Correo electrónico: amackenzie@inspection.gc.ca)

MAKINDE, Martin O., Profesor de Ciencias de los Animales, 1175 Woodlands Drive, Pretoria, 0121 Sudáfrica (Tel. +27 12 333 7090, Fax. +27 12 667 1920, Correo electrónico: makinde@univen.ac.za or makinde@mweb.co.za)

MURRAY, James D., Profesor, Departamento de Ciencias de los Animales, Universidad de California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616-8521, Estados Unidos (Tel. 001 530 752 3179, Fax. 001 530 752 0175, Correo electrónico: jdmurray@ucdavis.edu)

NIELSEN, Kaare M., Profesor, Departamento de Farmacia, Facultad de Medicina, Universidad de Tromsø, y Asesor Científico, Instituto Noruego de Ecología Génica, 9037 Tromsø, Noruega (Tel. +47 77 646165, Fax. +47 77 646151, Correo electrónico: knielsen@farmasi.uit.no)

NIEMANN, Heiner, Departamento de Biotecnología, Instituto de Zoogenética (Institut für Tierzucht - FAL), Mariensee, Höltystrasse 10, 31535 Neustadt, Alemania (Tel. +49 5034 871-148, Fax. +49 5034 871-101, Correo electrónico: niemann@tzv.fal.de)

PHIPPS, Richard H., Director Adjunto, Centro de Investigaciones Lecheras, Universidad de Reading, P. O. Box 237, Reading RG6 6AR, Reino Unido (Tel. +44 118 378 8494, Fax. 0044 118 378 6595, Correo electrónico: r.h.phipps@reading.ac.uk)

RUDENKO, Larisa, Asesora Superior de Biotecnología, Centro de Medicina Veterinaria/ONADE, US Food and Drug Administration/DHHS, 7500 Standish Place, Rockville, MD 10855, Estados Unidos (Tel. 001 301 827 1072, Fax. 001 301 594 2297, Correo electrónico: larisa.rudenko@fda.hhs.gov)

WOLL, Karl, Asesor, Oficina de Asuntos Sociales, Protección de la Salud y el Consumidor / Landesamt für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz des Saarlandes (LSGV), Konrad-Zuse-Strasse 11, Postfach 66104, 66115 Saarbrücken, Alemania (Tel. +49 681 9978-4115, Fax. +49 681 9978 4197, Correo electrónico: K.Woll@lsgv.saarland.de)

YAMASHITA, Michiaki, Sección de Biotecnología de los Alimentos, División de Bioquímica y Tecnología de los Alimentos, Instituto Nacional de Investigación de Ciencias Pesqueras, 2-12-4 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-8648, Japón (Tel. +81 45 788 7665, Fax. +81 45 788 5001, Correo electrónico: mic@affrc.go.jp)

SECRETARÍA DE LA FAO/OMS

(OMS)

SCHLUNDT, Jørgen, Director, Departamento de Inocuidad de los Alimentos, Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria (FOS), Grupo de Desarrollo Sostenible (SDE), Organización Mundial de la Salud, Avenue Appia, 1211 Ginebra 27, Suiza (Tel. +41 22 791 3445, Fax. +41 22 791 4807, Correo electrónico: schlundtj@who.int)

ISEKI, Noriko, Oficial Superior de Normas Alimentarias Senior, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia (Tel. +39 06 5705 3195, Fax. +39 06 5705 4593, Correo electrónico: noriko.iseki@fao.org)

REVERDIN, Marion, Ayudante, Departamento de Inocuidad de los Alimentos, Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria, Organización Mundial de la Salud, Avenue Appia, 1211 Ginebra 27, Suiza (Tel. +41 22 791 2682, Fax. +41 22 791 4893, Correo electrónico: reverdinm@who.int)

(FAO)

BOUTRIF, Ezzeddine, Jefe del Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias (AGNS), Dirección de Nutrición y Protección del Consumidor, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia (Tel. +39 06 5705 6156, Fax. +39 06 5705 4593, Correo electrónico: ezzeddine.boutrif@fao.org)

TAKEUCHI, Masami T., Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias (AGNS), Dirección de Nutrición y Protección del Consumidor, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Roma, Italia (Tel. +39 06 5705 3076, Fax. +39 06 5705 4593, Correo electrónico: Masami.Takeuchi@fao.org)

Lista de documentos

Application of genetic engineering for livestock and biotechnology products (por Anne MacKenzie)

Latest developments in relation to the use of reporter and selectable genes in animal biotechnology (por Louis-Marie Houdebine)

Heritable and non-heritable traits (por Larisa Rudenko)

Non-heritable applications of r-DNA animals (presentado en un documento de sala (CRD 2, páginas 2-21) distribuido para la sexta reunión del Grupo de Acción del Codex, 2006)