



Detección de alimentos y piensos vegetales obtenidos por nuevas técnicas genómicas (NGT)

Red Europea de Laboratorios OMG (ENGL), 2019-2023

Introducción:

En 2019, la ENGL revisó en un informe las posibilidades y los desafíos para la detección de alimentos y productos vegetales obtenidos mediante nuevas técnicas de mutagénesis dirigida que conducen a la edición del genoma (GE), centrándose en los productos que no contienen ADN recombinante, ya que en esos casos podrían seguirse las mismas estrategias de detección que en organismos modificados genéticamente (OMG) convencionales.



La disponibilidad de un método de detección específico, sensible, robusto y viable es un requisito imprescindible para lograr la autorización de comercialización de un producto OMG. Debe ser aportado por el interesado en su solicitud, y ser validado por parte del Laboratorio de Referencia. Además, también es necesario contar con dicha metodología para la realización de los controles oficiales. En el informe se identificaron varios desafíos analíticos y limitaciones, si bien la ENGL reconocía carecer de evidencia experimental para algunas de las cuestiones analizadas, por lo que ciertas observaciones se basan únicamente en consideraciones teóricas.

En 2023 la ENGL emitió un nuevo informe, basado en el de 2019, en el que se reevaluaron los desafíos existentes en la detección de NGT, incorporando los últimos avances científicos en el campo e incluyendo en su ámbito, además de la mutagénesis dirigida, la cisgénesis y la intragénesis.

Este segundo informe no hace sino reforzar los argumentos y ratificar las conclusiones del primero.

Limitaciones y desafíos detectados:

Hay 3 características básicas de los productos GE que dificultan el desarrollo de métodos de detección:

- las modificaciones son típicamente pequeñas, comportando la sustitución de un único nucleótido (SNV) o pequeñas inserciones o deleciones (InDel).
- las alteraciones son típicamente no-únicas (podrían obtenerse por otros métodos de mejora).
- no existen elementos característicos en el ADN para desarrollar métodos de detección evento-específicos.

Detección de modificaciones del ADN

Los controles rutinarios que se realizan sobre alimentos y piensos importados deben ser capaces de detectar eventos desconocidos. En el caso de los OMG convencionales, se realiza un primer paso de cribado, que permite detectar la presencia de OMG, en general, buscando secuencias comunes (por ejemplo, promotores o terminadores) a todos ellos.

Tales secuencias no existirían en algunos productos GE, por lo que su presencia sólo puede detectarse caso a caso. Esto implica conocer la secuencia de genoma alterada y disponer de un método de

detección validado y materiales de referencia certificados. Para posibilitar controles rutinarios, la ENGL propone la posibilidad de desarrollar estrategias de detección dirigidas a todos los eventos GE conocidos simultáneamente.

Hallazgo de la secuencia diana

Para la detección de un OMG particular, debe conocerse la secuencia diana. En los OMG convencionales, las uniones creadas durante la inserción del ADN recombinante son únicas para cada evento, sirviendo como marcador de identificación sobre el que desarrollar un método de detección "evento-específico"

La tecnología estándar para la detección analítica, identificación y cuantificación de OMG está basada en PCR en tiempo real/PCR cuantitativo (qPCR). El principal desafío para detectar InDel cortos o SNV mediante PCR surge de la gran similitud entre la secuencia objetivo (modificada) y la secuencia de referencia. La PCR consigue detectar una secuencia objetivo mediante su unión a oligonucleótidos específicos (cebadores y sondas). La similitud entre la secuencia objetivo y la de referencia hace que las uniones de los oligonucleótidos con cada una de ellas sean muy cercanas termodinámicamente. Varias técnicas logran aumentar la estabilidad termodinámica de la unión oligonucleótido-secuencia objetivo mediante modificaciones de las sondas o los cebadores, favoreciendo su amplificación frente a la de la secuencia de referencia. A pesar de los éxitos particulares obtenidos, las muestras estudiadas son de baja complejidad, consistentes en genotipos y plantas individuales. La ENGL considera que la sensibilidad puede no ser suficiente en el control de alimentos y piensos, de los que se extraen muestras con una composición más compleja.

En los últimos años está aumentando el uso de la PCR digital (dPCR) que permite la cuantificación absoluta independiente de las curvas de calibración y es menos susceptible a inhibidores de PCR. Las técnicas de detección basadas en dPCR parecen dar mejor resultado que las basadas en qPCR. Por otro lado, se están desarrollando estrategias basadas en secuenciación para detectar tanto OMG convencionales como eventos GE, habiéndose explorado de forma exitosa la secuenciación de alto rendimiento usando enriquecimiento por PCR. Ambas estrategias han conseguido desarrollar métodos para la detección de un arroz GE con inserción de un solo nucleótido, funcionando incluso con mezclas y alimentos procesados. Finalmente, CRISPR-Cas también es una técnica prometedora para el desarrollo de métodos de detección, pero aún no se ha comprobado su idoneidad para los requerimientos mínimos de la ENGL.

Identificación de la secuencia como producto de un evento GE específico

El gran problema para la detección de productos GE reside en que a menudo se caracterizan por una alteración de ADN no única, al poder encontrarse la misma mutación en otros productos: (1) productos GE desarrollados por la inclusión de un evento GE original, previamente autorizado, en otra variedad o especie, (2) productos GE desarrollados de forma independiente, en la misma o distintas variedades/especies, (3) productos obtenidos por fitomejora convencional, o (4) variedades salvajes.

Con la posible existencia de secuencias idénticas con diferente origen, no está claro cómo demostrar o evaluar la especificidad del método de detección. Esto requeriría un conocimiento completo de todas las variaciones de secuencia existentes para el locus editado para todas las variedades y plantas silvestres de todas las especies utilizadas para la producción de alimentos o piensos, lo que serviría como base de referencia. Aunque cada vez se está acumulando más información de secuencias e incluso genomas enteros, las bases de datos nunca serán capaces de contemplar toda la variación genética existente en un momento dado, ni la variación que podría aparecer en el futuro, por lo que será virtualmente imposible garantizar que una alteración de tipo SNV o InDel sea única.

Cuantificación

Supone un desafío cuando los cambios son de pocos pares de bases. Algunos ensayos han utilizado un método basado en PCR digital, que consiste en cuantificar simultáneamente la secuencia mutada y la de tipo salvaje del mismo amplicón de PCR, mediante 2 sondas que se unen a cada una de las secuencias. El informe señala, una vez más, que las muestras son de complejidad limitada, no comparables con las muestras de alimentos y piensos. En cuanto a los métodos basados en secuenciación de próxima generación, tampoco están validados para la cuantificación de objetivos en muestras complejas.

Conclusiones:

- Es técnicamente posible detectar alteraciones.
- No es posible certificar el origen de dichas alteraciones.
- Los métodos analíticos propuestos tienen un valor limitado para el control de comercialización de productos desconocidos.
- La aplicación de los métodos propuestos supondría un gran aumento en los recursos económicos y humanos destinados al control de OMG.

La siguiente tabla recopila los desafíos analíticos para el desarrollo y validación de métodos de detección, identificación y cuantificación de productos vegetales desarrollados por diferentes NGT.

Técnica genómica	Tipo de modificación	Método de desarrollo y validación	Método de implementación para el control
Mutagénesis dirigida	Variación de un nucleótido (SNV)	La viabilidad depende de la secuencia (caso-a-caso), pero la especificidad del evento, la robustez y el uso cuantitativo del método son generalmente difíciles de demostrar.	Difícil/imposible de implementar tales métodos para control analítico, cuando los resultados no sean fiables
	Mutaciones cortas	La viabilidad depende de la secuencia (caso-a-caso), pero la especificidad del evento, la robustez y el uso cuantitativo del método puede ser difícil de demostrar en algunos casos.	Difícil/imposible de implementar tales métodos para control analítico, cuando los resultados no sean fiables
	Inserciones o deleciones largas	Técnicamente viable, pero la especificidad del evento depende de si la modificación creó o no una unión de secuencias nueva y única.	Factible, cuando la especificidad del evento es demostrada
Cisgénesis	Inserción o sustitución de secuencia objetivo	Técnicamente viable, pero la especificidad del evento del método depende de si la nueva secuencia alterada es diferente (y por cuántos nucleótidos) de secuencias similares ya presentes en la especie.	Factible, cuando la especificidad del evento es demostrada. Factible, pero pueden darse problemas de implementación si la nueva secuencia solo difiere de las existentes en un SNV o mutación corta.
	Inserción aleatoria de gen completo	Factible	Factible
Intragénesis	Inserción aleatoria de gen completo/ Inserción o sustitución de secuencia objetivo	Factible	Factible

Varias técnicas	Modificaciones múltiples	Requiere desarrollar y validar un método para cada sitio modificado, lo cual incrementa considerablemente la carga de trabajo; la viabilidad técnica depende de los tipos de modificaciones.	El análisis de cada producto vegetal con todos sus métodos individuales conocidos para las especies presentes en el producto conlleva un enorme incremento de la carga de trabajo analítico y hará imposible realizar el trabajo de control analítico de la forma en que se realiza actualmente. Por otro lado, será difícil evaluar la cantidad de producto en caso de múltiples modificaciones derivadas de la misma planta, algunas de las cuales pueden, además, segregarse.
-----------------	--------------------------	--	--

Madrid, a 30 de junio de 2023

Referencias

- (1) [‘Detección de alimentos y piensos vegetales obtenidos por nuevas técnicas de mutagénesis’](#), Red Europea de Laboratorios GMO (ENGL), 2019 (JRC116289)
- (2) [‘Detección de alimentos y piensos vegetales obtenidos por mutagénesis dirigida y cisgénesis’](#), Red Europea de Laboratorios GMO (ENGL), 2023 (JRC133689)
- (3) [Directiva 2009/41](#), relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente.
- (4) [Directiva 2001/18/CE](#), sobre liberación intencional en el medio ambiente de OMG y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE, y que fue modificada por la Directiva (UE) 2015/412.
- (5) [Reglamento 1830/2003](#), del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos, y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE.
- (6) [Genetic Technology \(Precision Breeding\) Act \(2023\)](#)