DEGRADACIÓN DEL ADN DE SOJA TRANSGÉNICA INCUBADA "IN VITRO" CON ENZIMAS DIGESTIVOS ESTIMADA MEDIANTE QC-PCR.

Martín-Orúe, S. M.[1], Ariño, J.[2], Barceló, A.[2], Mathers, J.[1], y Gilbert, H. J.[1]

1. *Biological and Nutritional Science Departament. University of Newcastle. UK.*
2. *Servei de Seqüenciació de Acids Nucleics. Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra*

INTRODUCCIÓN

La reciente aplicación de técnicas de ingeniería genética para la mejora de plantas de interés agronómico y su difusión comercial, ha hecho que en la actualidad gran parte de las dietas de nuestros animales contengan lo que se ha venido denominando organismos genéticamente modificados (OGMs).

Una de las mayores preocupaciones que despierta la inclusión de alimentos transgénicos en la dieta, es la posibilidad de transferencia de estos nuevos genes a los microorganismos de la flora intestinal o bien incluso a las propias células del animal hospedador. Tal posibilidad suele desdeñarse asumiendo la rápida degradación del ADN exógeno por parte de los enzimas digestivos. Sin embargo existen muy pocos trabajos que estudien la degradación del ADN en el tracto digestivo utilizando técnicas suficientemente sensibles que permitan detectar pequeñas cantidades de ADN (Schubbert y col., 1994, 1997).

El objetivo del presente trabajo fue el de estudiar la degradación del ADN transgénico de soja tras su digestión "in vitro" con enzimas digestivos mediante la técnica de PCR cuantitativo de competencia (QC-PCR), así como estudiar el posible efecto protector de la matriz del alimento sobre la integridad de su ADN.

MATERIAL Y METODOS

Como fuentes de ADN trasngénico se utilizaron un concentrado protéico de soja, previamente molido, así como su ADN genómico desnudo, purificado utilizando un kit comercial (Wizard DNA clean-up system, Promega). Para la simulación de la digestión gástrica se utilizó pepsina porcina (Sigma) y para la digestión intestinal un homogeneizado de extracto ileal liofilizado obtenido de cinco personas voluntarias que tenían practicadas ileostomías.

El protocolo de incubación fue el siguiente: 50 mg de concentrado protéico de soja o bien el DNA desnudo extraído de la misma cantidad, se incubaron durante una hora a 37 °C con 500 µl de una solución 15 mM de HCl y pepsina (2mg/ml). Tras neutralizar el pH con $NaHCO_3$ se añadieron 50 mg de contenido ileal liofilizado y 200 µl de agua. Las muestras se incubaron durante 5, 10, 15, 30, 60 120 y 180 minutos y tras finalizar cada tiempo de incubación se añadieron 800 µl de hidrocloruro de guanidinio 6 M para detener toda reacción enzimática. Posteriormente las muestras se incubaron durante 3 horas a 58 °C para extraer el ADN que fue purificado mediante un kit comercial (Wizard DNA clean-up system. Promega).

La cantidad de ADN transgénico que resistió el proceso de digestión se cuantificó mediante QC-PCR para lo cual se eligió como ADN diana un fragmento de 180 pb del transgen introducido en la soja y que le confiere resistencia a herbicidas, utilizando los iniciadores publicados por Studer y col. (1998). Como competidor se construyó un plásmido que contenía dicho fragmento con una inserción intermedia de 100 pb.

RESULTADOS Y DISCUSSIÓN

El método de QC-PCR mostró ser válido para la cuantificación de fragmentos de ADN en muestras de contenido digestivo, situándose los niveles mínimos de detección en unas 80 copias. Teniendo en cuenta que a t = 0 se detectaron más de 100.000 copias de los transgenes, nuestro procedimiento fue capaz de detectar hasta un 0.08 % del ADN superviviente. La proteína de soja y el ADN genómico desnudo se eligieron como substratos que pudieran ofrecer condiciones extremas de protección frente a los enzimas digestivos.

La incubación con pepsina y HCl tuvo escaso efecto sobre el ADN de la proteína de soja, sin embargo provocó un drástico descenso del ADN genómico desnudo y tras 60 minutos de digestión el 80.6 ± 3,06 % del los transgénes no fueron detectados (Tabla 1). La sensibilidad del ADN a pHs extremos y la depurinación de la cadena de ADN en soluciones ácidas es bien conocida (Raw, 1983) por lo que el hecho de que el ADN dentro de la matriz del alimento sea resistente a dichas condiciones podría deberse a un efecto tamponador de la soja, especialmente en la parte interior de las partículas donde el pH podría no ser tan extremo.

Tabla 1. Degradación del ADN transgénico de soja o ADN genómico desnudo incubado "in vitro" con pesina-HCl durante una hora y con enzimas intestinales durante 5, 10, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos. Los valores están expresados en Logaritmo del numero de copias del ADN transgénico detectadas mediante QC-PCR. Cada reacción contiene el DNA extraído de 0,3 mg de soja.

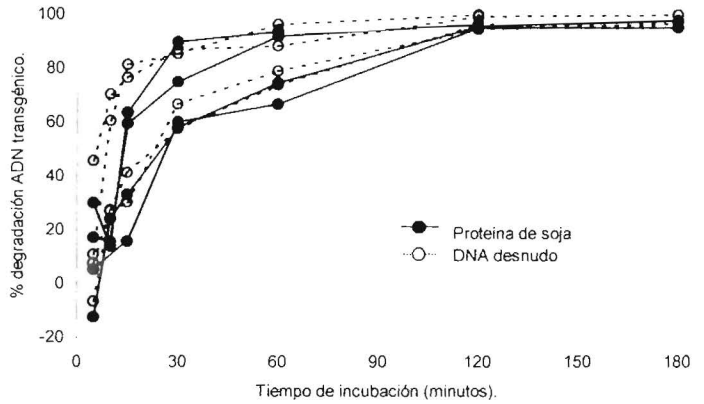
	Digestión gástrica.						Digestión intestinal											
	Minutos		Estadística				Minutos								Estadística			
	0	60	DER	S	T	SxT	0	5	10	15	30	60	120	180	DER	S	T	SxT
Soja	5,30	5,27	0.294	***	*	*	5,27	5,28	5,14	5,21	4,97	4,75	4,10	3,89	0,443	***	***	NS
ADN	4,63	3,93					3,93	3,83	3,54	3,55	3,29	3,15	2,38	1,98				

S: Tipo de susbstrato incubado (harina de soja or DNA genómico desnudo).
T: Tiempo de incubación.
SxT: Interacción substrato x tiempo.
DER. Desviación Estandar Residual. NS. No significativo, $p > 0,10$; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$.

La cantidad de ADN transgénico que resistió la digestión con el contenido ileal fue superior para la proteína de soja que para el ADN desnudo (Tabla 1, $P < 0,001$) sin embargo esas diferencias fueron debidas fundamentalmente a que una mayor

cantidad de ADN soportó la incubación con pepsina-HCl. Cuando expresamos los mismos valores con relación a la cantidad que inicialmente fue incubada con el contenido ileal (Figura 1), los resultados no fueron tan diferentes y tras 30 minutos de digestión 48 ± 13,1 y 66 ± 17,5 % del ADN transgénico de la proteína de soja y del ADN desnudo respectivamente habían sido degradados. Cuando dichos resultados porcentuales se ajustaron a un modelo monoexponencial ($y = a\ (1-e^{-kt})$), los ritmos fraccionales fueron algo superiores para el ADN desnudo que para la proteína de soja (0.053 ± 0.0183 vs. 0.022 ± 0.0008), sin embargo las diferencias no alcanzaron la significación estadística, lo que sugiere que el material en la proteína de soja fue capaz de proteger el ADN frente a las condiciones ácidas del estómago pero no frente a las enzimas digestivas del intestino delgado.

Figura 1. Porcentaje de degradación del DNA transgénico de proteína de soja o de DNA genómico desnudo incubado con contenido ileal.



En conjunto, tras la digestión péptica e intestinal un 4,2 ± 1,03 % del ADN transgénico de la soja y un 0.5 ± 0.32 % del ADN genómico desnudo resistieron todo el proceso de digestión. Estos valores aunque indican que el ADN es rápidamente degradado por los enzimas digestivos sugieren que, al menos bajo nuestras condiciones de digestión "in vitro", un pequeño porcentaje sería capaz de superar la barrera intestinal y ser disponible para la población microbiana de los tramos finales del tracto digestivo.

BIBLIOGRAFIA

Rawn, J. D. (1983). En: Biochemistry. p.358. Harper and Row publishers, Inc., New York

Schubbert, R., Lettmann, C. and Doerfler, W. (1994). Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. Mol Gen. Genet. 242: 495-504.

Schubbert, R., Renz, D., Schmitz, B. and Doerfler, W. (1997). Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 961-966.

Studer, E., Rhyner, C., Lüthy, J. and Hübner, P. (1998). Quantitative competitive PCR for the detection of genetically modified soybean and maize. Z. Lebensm Unters Forsch A 207:207-213.