

NOTICIAS RECIENTES

En febrero de 2015 la Fiscalía del Estado de Nueva York comunicó a varias empresas norteamericanas que debían cesar la venta de determinados suplementos dietéticos a base de hierbas al considerarse adulterados y/o mal etiquetados, respondiendo a una investigación llevada a cabo tras la aparición de graves problemas de salud y seguridad provocado por la falta de pureza de algunos suplementos de plantas.

La Oficina de Investigación del Fiscal General analizó el DNA vegetal sobre muestras de suplementos dietéticos con plantas (entre otras, *Serenoa repens*) encontrando que 5 de los 6 tipos de productos testados fueron irreconocibles o contenían una sustancia distinta de la que afirmaban contener lo que les convertía en "productos contaminados" de acuerdo con la legislación.

En el caso de *Serenoa repens*, sólo 6 de 20 pruebas identificaron su presencia, si bien los resultados positivos se obtuvieron a partir de una única marca.

VR6 DEFINITIVE HAIR YA HABIA REALIZADO ESTA ANALITICA DESDE SU LANZAMIENTO

VR6 Definitive Hair consciente de su responsabilidad para ofrecer un producto seguro y eficaz ha certificado desde su lanzamiento todos los lotes comercializados a través de una metodología única a partir de la cual se ha analizado la secuencia del gen que codifica la subunidad grande de la enzima RUBISCO (Ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) denominado Lrbc, que está localizado en el genoma del cloroplasto, siendo una de las secuencias más usadas para la detección de DNA proveniente de plantas.

Gracias a esta metodología no se ha puesto en el mercado producto con ingredientes no certificados, tal y como se describe seguidamente.

DESCRIPCIÓN

Las muestras biológicas originales eran granulado extraído de las capsulas de VR6 Definitive Hair a partir de las cuales se aisló DNA total, siguiendo una modificación del protocolo de extracción a partir de matrices procesadas "Wizard® Magnetic DNA Purification System for Food". Tras analizar la calidad de las muestras se declararon aptas para su análisis cuando cumplieron las características mínimas de cantidad, calidad y estabilidad previamente establecidas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Partiendo de 50 ng de DNA total se generó una librería de secuenciación masiva mediante amplificación por PCR, capturando la región específica del gen Lrbc. Estas librerías están marcadas con una serie de bases conocidas que nos permiten diferenciar en análisis posteriores las secuencias que provienen de cada una de las muestras. Además, están perfectamente adaptadas al sistema de secuenciación masiva Illumina Inc.

Una vez obtenidas las librerías se limpiaron de restos de dímeros de cebadores y se cuantificó individualmente la muestra para conocer la cantidad exacta de DNA amplificado usando el sistema “Quant-iTT PicoGreen” de Invitrogen. Tras esta operación se realizó una mezcla equimolar que se usó en la secuenciación. Esta mezcla se limpió de nuevo para eliminar el remanente de dímeros de cebadores y con el resultante se llevó a cabo la secuenciación de las muestras en el sistema MiSeq de Illumina en combinación de 150 de extremos pareados (PE).

RESULTADOS

Debido a la forma de secuenciación, para cada una de las muestra se obtuvieron dos juegos de secuencias, un fichero con las secuencias secuenciadas en una dirección, y otro fichero secuenciadas en la otra dirección. Cada par de secuencias de cada extremo se sometieron a solapamiento entre los pares, para la obtención de una secuencia solapante, usando el programa PEAR V.0.9.1 con los parámetros por defecto, excepto el parámetro de solapamiento entre la secuencias de cada extremo que se fijó en 100 nucleótidos. El fichero de las secuencias solapadas resultante, se procesó por calidad, y se eliminaron todas aquellas secuencias que tenían una calidad menor a Q20 (es decir aquellas en las que se sabía que el 99% de las bases que aparecían en las secuencias se habían incorporado de manera correcta). Las secuencias resultantes del filtraje por calidad se usaron para los análisis bioinformáticos posteriores y están resumidas en la Tabla 1 para los últimos lotes analizados.

Tabla 1. Número total de secuencias aprovechables, longitud media y cantidad total de secuencia (en megabases) para cada una de las muestras analizadas.

Referencia	Nº secuencias	Longitud media (nt)	Total Mb
141072_S1	475.867	183	87,00
141073_S2	241.512	183	44,10

Tras disponer de las secuencias filtradas y limpias, se llevó a cabo la asignación taxonómica de cada una de ellas. Primero, se realizó una búsqueda basada en alineamientos locales tipo BLASTN, contra una base de datos que contiene una recopilación de las secuencias depositadas en la base de datos de la especie *Serenoa repens* que es la especie utilizada como materia prima en la formulación del producto. Los resultados de esta comparativa, usando un nivel de identidad entre las secuencias obtenidas en la base de datos y las secuencias analizadas del 90% y un e-valor < 10⁻⁵, es el que se refleja en la Tabla 2 para los últimos lotes analizados.

Tabla 2. Porcentaje de secuencias de cada una de las muestras que contienen una asociación positiva con las secuencias de la base de datos de *Serenoa repens*, con una identidad del 90% entre las secuencias están indicadas.

Referencia	<i>Serenoa repens</i>	NO <i>Serenoa repens</i>	noHit
141072_S1	32,41	67,13	0,46
141073_S2	98,84	0,48	0,68

Los resultados apuntan que la muestra que contiene mayor cantidad de DNA proveniente de *Serenoa repens* es la muestra 141073_S2, ya que el 98,84% de las secuencias obtenidas dan un resultado positivo. Por el contrario, en la muestra 141072_S1 solo el 32,41% de las secuencias dan un resultado positivo.

Posteriormente se realizó un análisis del 67,13% de las secuencias que no dieron resultado positivo de la muestra 141072_S1, para poder determinar que otras especies podrían estar presentes en la muestra. La distribución de las especies detectadas en conteos de más de un 1% de las secuencias que no dieron resultado positivo contra *S. repens* en la muestra 141072_S1, se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Especies presentes en más de un 1% y porcentaje de secuencias que no dieron un resultado positivo en la muestra 141072_S1.

Especie	Porcentaje respecto al total
<i>Hordeum secalinum</i>	56,74
<i>Elymus spicatus</i>	6,876
<i>Zea mays</i>	2

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

A tenor de los resultados obtenidos resulta que en la fabricación de la muestra 141073_S2 se ha utilizado *Serenoa repens* como materia prima, mientras que para la muestra 141072_S1, se ha usado *Serenoa repens*, pero también de forma mayoritaria *Hordeum secalinum* (cebada silvestre), y en menor *Elymus spicatus* (trigo silvestre) y *Zea mays* (maíz).

ACCIONES TOMADAS

Solo la muestra 141073_S2 ha sido comercializada y puesta a disposición de los consumidores.

Ver resumen del estudio de lifesequencing