

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**Análisis de Transgénesis mediante PCR de 20 Polentas que se encuentran a la venta en el Mercado Uruguayo.**

Martín Fernández Campos

TUTOR: Dr. Claudio Martínez Debat

Sección Bioquímica – Facultad de Ciencias

## CONTENIDO

ABREVIATURAS.....	3
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
LEGISLACIÓN NACIONAL.....	12
PROTOCOLO DE CARTAGENA.....	15
FERTILIZACION CRUZADA EN MAÍZ.....	16
DERECHO DEL CONSUMIDOR.....	20
Trazabilidad basada en el ADN.....	20
Especificidad de los métodos de detección por PCR.....	22
DETECCIÓN.....	24
IDENTIFICACIÓN DE EVENTO.....	25
Controles Positivos.....	26
Parámetros que afectan los métodos de detección de OGMs.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
Estrategia experimental.....	30
Muestras utilizadas.....	31
Descontaminación del lugar y elementos de trabajo.....	31
Protocolo de extracción de ADN.....	32
Estimación de la concentración y pureza del ADN extraído.....	33
Estimación de la integridad del ADN extraído.....	33
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	34
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Puesta a punto.....	39
Muestras de Bromatología.....	44
TABLA DE RESULTADOS.....	53
CONCLUSIÓN.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	58

## ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

BSA: Seroalbúmina bovina.

Bt11: Maíz genéticamente modificado conocido como *YieldGard*, evento SYN-BTØ11-1.

Bt176: Maíz genéticamente modificado conocido como *NaturGard KnockOut*, evento SYN-EV176-9.

CAI: Comité de Articulación Institucional.

CCB: Comité Consultivo en Bioseguridad.

CDB: Convenio de Diversidad Biológica.

CE: Comunidad Europea.

CERV: Comisión para la Evaluación de Riesgo en Vegetales.

CGR: Comisión para la Gestión de Riesgo.

CUS: Cámara Uruguaya de Semillas.

DGSA: Dirección Nacional de Servicios Agrícolas.

EDTA: Ácido etilendiamino tetraacético.

ERB: Evaluación de Riesgo en Bioseguridad.

GM: Genéticamente modificado.

GNBio: Gabinete Nacional de Bioseguridad.

INASE: Instituto Nacional de Semillas.

INIA: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria.

ISAAA: International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications.

JRC: Joint Research Center (del Instituto de Salud y Protección al Consumidor de la UE)

LD: Límite de detección.

MEF: Ministerios de Economía y Finanzas.

MGAP: Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca.

MIEM: Ministerio de Industria, Energía y Minería.

Mon810: Maíz genéticamente modificado conocido como *YieldGard*, evento MON-ØØ81Ø-6.

MPM: Marcador de Peso Molecular.

MRREE: Ministerio de Relaciones Exteriores.

MSP: Ministerio de Salud Pública.

MVOTMA: Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente.

OGM: Organismo Genéticamente Modificado.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OVM: Organismo Vivo Modificado.

PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction).

PCSB: Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología.

PEDECIBA: Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas.

PTB: *N*-phenacyl thiazolium bromide.

RR: Soja genéticamente modificada conocida como *Roundup Ready*, evento MON-Ø4Ø32-6.

rt-PCR: Real Time PCR.

TAE: Buffer compuesto por Tris, acetato y EDTA, de uso frecuente en electroforesis, en especial en gel de agarosa para separar ácidos nucleicos.

TBE: Buffer compuesto por Tris, borato y EDTA, de uso frecuente en electroforesis.

TEMED: Tetrametiletilendiamina.

## RESUMEN

En julio del 2008, cuando entra en vigencia el Decreto de Ley N°353/008 que deroga al 037/007, se levanta la moratoria que prohibía la entrada de nuevos eventos genéticamente modificados al Uruguay para su siembra. Si bien a partir de este suceso existen varios eventos en trámite de liberación, tanto de soja como de maíz, por el momento, aún siguen siendo el maíz Bt11, maíz Mon810 y soja RR los únicos cultivos genéticamente modificados liberados al ambiente.

En la zafra 2008/2009 aproximadamente el 88% del maíz sembrado fue genéticamente modificado (unas 60 mil hectáreas), esto sumado a la reglamentación de la Cámara Uruguaya de Semillas en donde se establece que debe sembrarse un 10% de maíz no GM como área de refugio en las chacras donde se siembre maíz transgénico, dan un resultado total aproximado de 98% del área total sembrada (maíz GM + refugio). Dejando solamente un 2% de maíz no genéticamente modificado producido durante la zafra.

Nuestros vecinos Argentina y Brasil son el segundo y tercer productores de transgénicos más importantes del mundo, y también grandes vendedores de productos alimenticios a Uruguay. Si bien Brasil tiene en su legislación, y exige el etiquetado de transgénico en producto final como obligatorio (si el porcentaje es mayor al 1%), es de conocimiento público que esta ley no es respetada aún, por lo menos en su gran mayoría. Argentina por otro lado, carece de regulación alguna al respecto por lo que ni los alimentos ni los granos para producción de alimento son trazados.

Si bien el nuevo decreto (N° 353/008) crea una nueva estructura para bioseguridad en vegetales, deja a libre albedrío el etiquetado de transgénico/no-transgénico en el producto final. Teniendo en cuenta que el consumidor insiste en conocer exactamente qué es lo que está comprando tanto para consumo, procesamiento o para raciones animales, nos pareció de suma importancia poner a punto y utilizar en muestras reales las técnicas de biología molecular disponibles para trazabilidad y determinación de transgénicos.

En este trabajo se pusieron a punto las técnicas de PCR y electroforesis para rastreo de maíz transgénico mediante la detección del promotor 35S. Se seleccionaron varios productos del mercado en donde el maíz mostraba distinto grado de procesamiento en la cadena alimenticia y se pusieron a punto los métodos de extracción de ADN, PCR y electroforesis para cada una.

Una vez optimizadas las técnicas, se analizaron 20 muestras de harina de maíz (“polenta”), provenientes del Laboratorio de Bromatología de la Intendencia de Montevideo en busca del promotor 35S. Hecho el rastreo se dio un paso más y se buscó determinar específicamente que

evento/s se encontraban en las muestras, para lo que se realizaron PCR específicas para cada evento buscando detectar maíz Bt11, maíz Mon810 y maíz Bt176 en dichas muestras.

## INTRODUCCIÓN

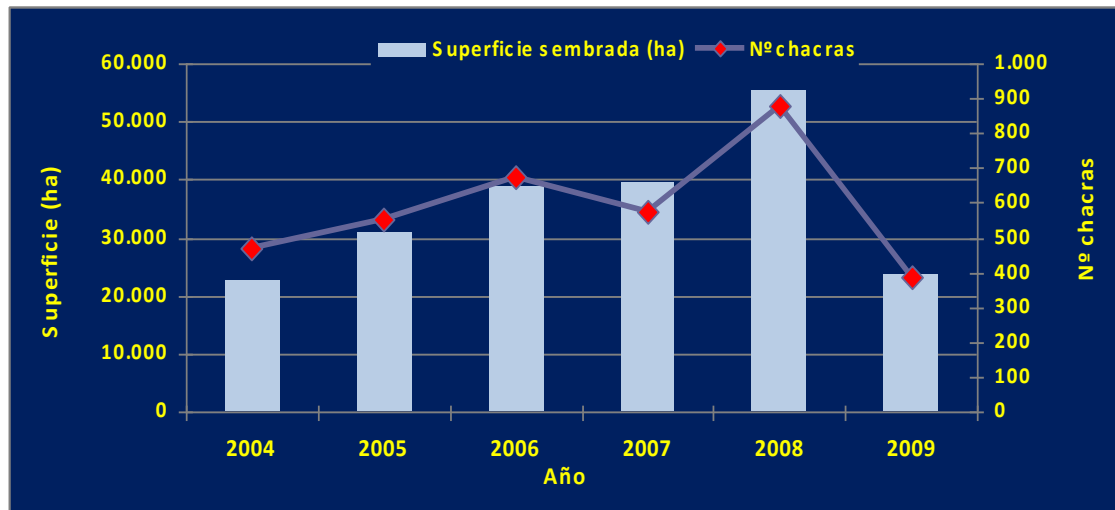
Durante la zafra 2008/2009, 13.3 millones de agricultores en 25 países plantaron cultivos transgénicos, más del 90% de estos países fueron naciones en desarrollo. También fue el año en que se alcanzaron las 81 millones de hectáreas sembradas con OGM en el mundo (solamente tres años después de que se alcanzaran las primeras 40 millones de hectáreas). La Unión Europea sigue resistiendo la aprobación de nuevos eventos modificados para liberación al ambiente y solamente autoriza los mismos para su utilización en alimentos animales, humanos y pienso. Sin embargo en Sudamérica el crecimiento de cultivos transgénicos liberados al ambiente sigue en alza, liderado por Argentina y Brasil (Marshall, 2009).

En Uruguay hasta el momento hay tres eventos aprobados para liberación al ambiente, maíz Bt11, maíz Mon810 y soja RR (40-3-2) (Tabla 1). En cuanto a las áreas de siembra, la soja transgénica ya ha alcanzado prácticamente el 100% del área total sembrada mientras que el maíz ha alcanzado casi el 90% (aproximadamente el 88% en la zafra 2008/2009) del área de maíz total sembrada, lo que equivale casi al 100% del total posible (hay que recordar que en Uruguay es obligatorio para el maíz plantar un 10% de maíz no transgénico como refugio) (CUS, 2009) (Figura 1). De todas maneras aún hay muchos productores orgánicos que siembran maíz y soja no genéticamente modificados siendo el área de siembra no GM muy pequeña en comparación con el área GM total sembrada (700 mil hectáreas GM aproximadas para la zafra 2008/2009). Las 700 mil hectáreas de OGM sembradas en la zafra 2008-2009 totalizan un aumento en el área de siembra de un 40% en comparación con la zafra anterior, siendo éste el mayor aumento mundial de área de siembra para el período (Figura 2). Se calcula que en la zafra 2009/2010 se sembraron aproximadamente 800 mil hectáreas entre soja y maíz GM. Si bien los eventos aprobados hasta el momento son pocos en relación a otros países productores de transgénicos, estas cifras mantienen a Uruguay como el noveno país con mayor área de siembra de OGM en el mundo y el cuarto a nivel de Sudamérica por detrás de Brasil (21,4 millones de hectáreas), Argentina (21,3 millones de hectáreas) y Paraguay (2,2 millones de hectáreas) (ISAAA, 2009).

**Tabla 1:** Eventos aprobados en Uruguay para su siembra, consumo y comercialización

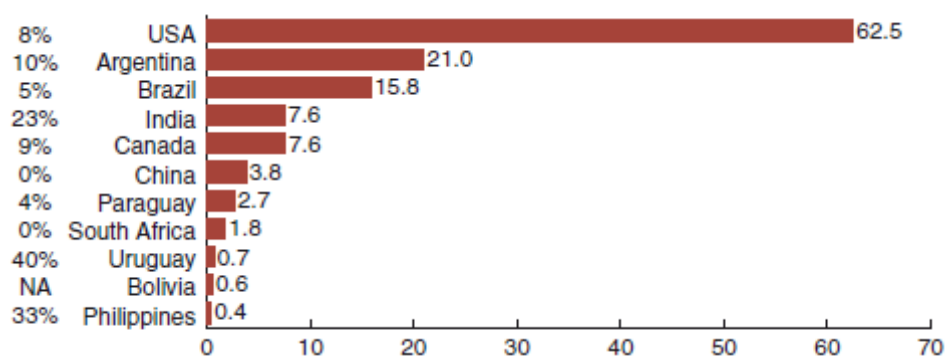
Cultivo	Característica introducida	Evento	Año de aprobación
soja	tolerancia al herbicida glifosato	40-3-2	1996
maíz	resistencia a insectos lepidópteros	MON810	2003
maíz	resistencia a insectos lepidópteros	Bt11	2004

El panorama en Brasil y Argentina es más complejo que en Uruguay, donde son el segundo y tercer productor mundial de OGM respectivamente por atrás de Estados Unidos y primeros en Sudamérica. No solamente tienen áreas sembradas más grandes (21,3 y 21.4 millones de hectáreas contra las 0,8 millones de Uruguay) sino que además tienen gran variedad de eventos aprobados para su siembra, consumo y comercialización.



**Figura 1:** Evolución del número de chacras y área transgénica sembrada en el Uruguay para maíz. Período 2004 – 2009. Se estima que la baja en la zafra 2009/2010 se debe a que no fueron entregadas aún muchas de las declaraciones juradas de siembra. Fuente: CUS en base a Declaraciones Juradas de Siembra.

El primer evento aprobado en la región fue la soja RR en el año 1996 para Argentina y en el año 1998 para Brasil. Uruguay hace su primera aprobación junto a Argentina en 1996 pero a partir de ese momento permanece bastante estático aprobando únicamente 2 eventos de maíz hasta la fecha. Recién en el año 2009, debido al cese de la moratoria instaurada en el año 2007, por el decreto 353/008, se han empezado a estudiar nuevas solicitudes para la aprobación de eventos de maíz y soja (Figura 3)(Tabla 2). Argentina tuvo un crecimiento relativamente lineal desde la primera aprobación hasta el año 2009, con un total de 13 eventos liberados entre los cuales se encuentran 3 eventos apilados (para maíz y algodón) (Tabla 3). Brasil si bien hasta el año 2007 tenía 1 solo evento aprobado (entre maíz y soja) a la fecha tiene 12 (18 si sumamos los de algodón) por lo que ha realizado 11 aprobaciones en los últimos dos años, todas ellas para eventos de maíz modificado (GMDatabase, 2009) (Tabla 4).

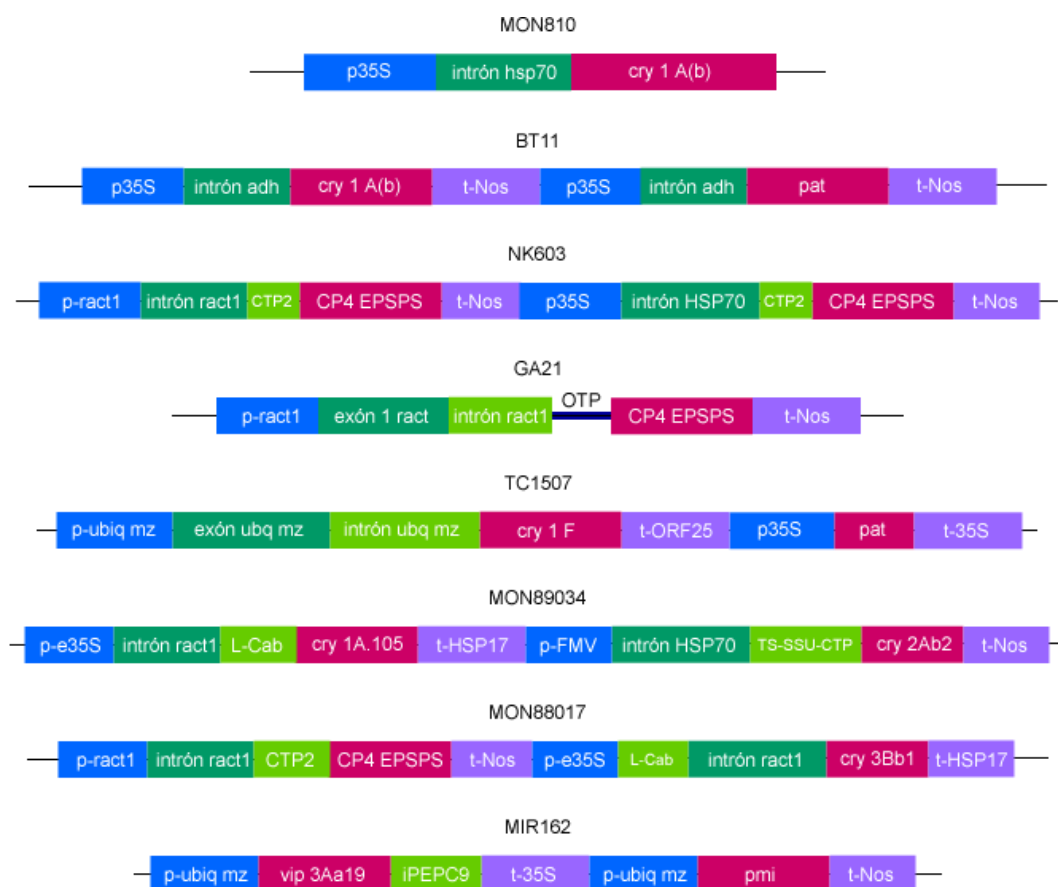


**Figura 2:** Porcentaje de cambio en el área de cultivo GM desde la zafra 2007/2008 a 2008/2009 (Marshall, 2009).



**Tabla 2:** Solicitudes de aprobación de eventos a partir de la caída de la moratoria hasta la fecha (CGR, 2009).

Cultivo	Característica introducida	Evento	Año de aprobación
soja	tolerancia al glifosato	RR2Y	Se autorizó para producción de semilla en 2009
soja	tolerancia al glifosato y resistencia a lepidópteros	MON89788 x MON87701	en estudio
maíz	tolerancia al glifosato	GA21	Se encuentra en evaluación agronómica desde 2009
maíz	tolerancia al glifosato, glufosinato y resistencia a lepidópteros	GA21 x Bt11	Se encuentra en evaluación agronómica desde 2009
maíz	resistencia a lepidópteros	DAS01507	Se encuentra en evaluación agronómica desde 2009
maíz	tolerancia al glifosato	NK603	en estudio
maíz	tolerancia al glifosato y resistencia a lepidópteros	DAS01507 x NK603	Se encuentra en evaluación agronómica desde 2009
maíz	tolerancia al glifosato y resistencia a lepidópteros y coleópteros	MON89034 x MON88017	Se rechazó en el año 2009 para evaluación agronómica
maíz	tolerancia al glifosato, glufosinato y resistencia a lepidópteros (bt11 y mir162)	GA21xMIR162xBt11	en estudio
maíz	tolerancia a glifosato y resistencia a lepidópteros	MON810 x NK603	en estudio



**Figura 3:** Representación de las construcciones de los eventos de maíz aprobados (MON810 y Bt11) y con solicitud de aprobación (NK603, GA21, TC1507, GA21xBt11, TC1507xNK603, MON89034XMON88017, GA21xMIR162xBt11) hasta el momento en Uruguay. En la imagen se muestran los eventos por separado, para los eventos apilados se utilizan las mismas construcciones pero de forma combinada. Referencias: **p35S** (promotor 35S virus mosaico del coliflor), **p-e35S** (promotor 35S del virus del mosaico del coliflor potenciado), **HSP70** (intrón hsp70 de maíz), **cry1A(b)** (delta-endotoxina cry1Ab de *B. thuringiensis* subsp. kurstaki), **intrón adh** (intrón del gen 1S de la enzima alcohol deshidrogenasa de maíz), **t-Nos** (terminador del gen nopalinsintasa de *Agrobacterium tumefaciens*), **pat** (gen que codifica para la enzima fosfoinotricin-acetil transferasa de *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494), **ract1** (gen de actina de arroz), **CTP2** (péptido de tránsito al cloroplasto de *A. thaliana*), **CP4 EPSPS** (proveniente de *A. tumefaciens*, codifica para la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato 3-fosfato sintetasa), **ubiq mz** (gen de ubiquitina de maíz), **cry1F** (delta-endotoxina cry1F de *B. thuringiensis*), **t-ORF25** (secuencia ORF25 PolyA de *Agrobacterium tumefaciens*), **L-Cab** (región 5' no traducida de la proteína de unión a la clorofila a/b de trigo), **cry1A.105** (delta-endotoxina artificial que consta de los dominios I y II de *Cry1Ab* o *Cry1Ac* (ambas proteínas muestran un 100% de similitud en la secuencia de los dominios I y II), dominio II de la *Cry1F* y la porción c-terminal de la *Cry1Ac*), **t-HSP17** (secuencia 3' de terminación de la transcripción para la proteína de golpe de calor del trigo 17.3), **p-FMV** (promotor del virus del mosaico del higo), **TS-SSU-CTP** (región de ADN que contiene la secuencia de acceso para la región del péptido de tránsito al cloroplasto de la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa del maíz y el primer intrón), **cry2Ab2** (secuencia codificante de la proteína *Cry2Ab2* de *B. thuringiensis*. Esta secuencia emplea codones modificados), **vip 3Aa19** (delta-endotoxina producida por *B. thuringiensis* durante su etapa vegetativa de crecimiento), **iPEPC9** (intrón #9 del gen fosfoenolpiruvato carboxilasa de maíz), **t-35S** (terminador del gen 35S del virus del mosaico del coliflor), **pmi** (gen pmi de *E. coli* que codifica para la fosfomanosa isomerasa. utilizado como marcador de selección).

**Tabla 3:** Eventos aprobados en Argentina para maíz y soja (SAGPyA & CONABIA, 2009)

Cultivo	Característica introducida	Evento	Año de aprobación
soja	tolerancia al herbicida glifosato	40-3-2	1996
maíz	resistencia a insectos lepidópteros	Bt176	1998
maíz	tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	T14, T25	1998
maíz	resistencia a insectos lepidópteros	MON810	1998
maíz	resistencia a insectos lepidópteros	Bt11	2001
maíz	tolerancia al herbicida glifosato	NK603	2004
maíz	resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	TC1507	2005
maíz	tolerancia al herbicida glifosato	GA21	2005
maíz	tolerancia al herbicida glifosato y resistencia a insectos lepidópteros, acumulados por cruzamiento	NK603 X MON810	2007
maíz	tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, y resistencia a insectos lepidópteros	1507 X NK603	2008
maíz	Resistencia a insectos lepidópteros	BtXtra	Autorizado en 1998 Revocado en 2008

**Tabla 4:** Eventos aprobados en Brasil para maíz y soja (GMDatabase, 2009).

Cultivo	Característica introducida	Evento	Año de aprobación
soja	tolerancia al herbicida glifosato	40-3-2	1998
maíz	Tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio. Resistencia a lepidópteros	Bt11xGA21	2009
maíz	tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	T14, T25	2007
maíz	resistencia a insectos lepidópteros	MON810	2007
maíz	Tolerancia a glufosinato de amonio, resistencia a insectos lepidópteros	Bt11	2007
maíz	tolerancia al herbicida glifosato	NK603	2008
maíz	resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	TC1507	2008
maíz	tolerancia al herbicida glifosato	GA21	2008
maíz	tolerancia al herbicida glifosato y resistencia a insectos lepidópteros, acumulados por cruzamiento	NK603 X MON810	2009
maíz	tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, y resistencia a insectos lepidópteros	TC1507 X NK603	2009
maíz	Resistencia a insectos lepidópteros	MIR162	2009
maíz	Resistencia a insectos lepidópteros	MON89034	2009

## LEGISLACIÓN NACIONAL

En el año 1996 por resolución de la Dirección Nacional de Servicios Agrícolas y del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca se aprueba el primer evento GM para siembra en el país. Este evento es la soja 40-3-2 (también conocida como Soja RR) que hasta el día de hoy continúa con aprobación vigente. En el año 2000 se firma el decreto 249/2000 el cual crea la Comisión para la Evaluación de Riesgo en Vegetales, en este mismo año se crea la Ley General del Ambiente en cuyo artículo 23 cita los OGM.

Recién en el año 2003 por resolución ministerial conjunta de los MEF y MGAP se aprueba el maíz transgénico Mon810 y poco tiempo después el MVOTMA establece la resolución ministerial 236/276/2003 en la cual se establecen las condiciones que deben cumplir las plantaciones de Mon810. No es hasta el año 2004 en el cual por un proceso similar al ocurrido el año anterior se aprueba por resolución ministerial (290/2004) de MEF y MGAP el evento de maíz Bt11 y más tarde por nueva resolución ministerial del MVOTMA (292/2004) se establecen las condiciones de siembra para el mismo.

Las resoluciones que establecen las condiciones y que rigen hasta el día de hoy (236/276/2003 y 292/2004), incluyen la consolidación de un registro que permita la identificación precisa de quien importa, adquiere o distribuye, así como la identificación del titular de la exportación y de la chacra en la que las semillas de maíz transgénico serán sembradas. Además del establecimiento de un área de refugio del 10% del área sembrada con maíz convencional dentro de cada chacra en la que se cultive maíz transgénico y el establecimiento de zonas de amortiguación de al menos 250 metros de separación entre predios de maíz transgénico y no transgénico. Todos los datos de las transacciones y siembras realizadas con maíz genéticamente modificado deben ser presentados ante la DINAMA en forma de declaración jurada y son almacenados en una base de datos específica que incluye las declaraciones presentadas desde la zafra 2004/2005. Además se crea un "... Programa de manejo de resistencia específica para insectos Lepidópteros en maíz de este evento, a ser implementado por la Cámara Uruguaya de Semillas, y fiscalizado por el INASE, con la participación de todas las empresas semilleras que comercialicen el evento."

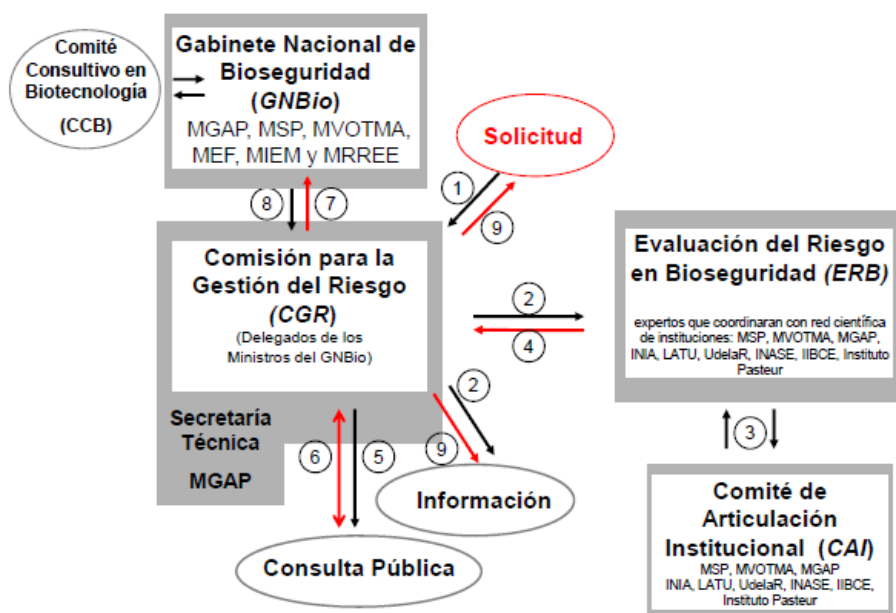
El día 17 de agosto del 2006 por resolución ministerial del MVOTMA y MGAP se suspende "el uso, producción y comercialización de semilla de maíz dulce genéticamente modificado".

El 29 de enero de 2007 se aprueba el Decreto 037/007 (también conocido como Moratoria), en el cual, según su Art. 1º, se procede a "suspender transitoriamente el tratamiento de nuevas

solicitudes de autorización para introducir eventos de organismos vivos de origen vegetal y sus partes genéticamente modificados para cualquier aplicación prevista” y se establece un plazo máximo de 18 meses para elaborar una nueva normativa relativa a Bioseguridad.

Transcurridos los 18 meses de suspensión previstos por el decreto 037/007, el 21 de julio de 2008 se aprueba el nuevo Decreto de Ley N°353/008 que deroga al anterior y en el cual se establecen normas relativas a Bioseguridad de vegetales y sus partes genéticamente modificadas. Se restablece la posibilidad de que nuevos eventos vegetales genéticamente modificados puedan ingresar al país bajo la previa evaluación de una nueva estructura orgánica en materia de Bioseguridad de Vegetales creada en el mismo decreto (Figura 4). Se trata de una primera etapa de cara a la redacción de una Ley Nacional de Bioseguridad de organismos genéticamente modificados a enviar al Parlamento en el plazo de un año.

El decreto genera una nueva estructura que incluye el Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNBio); Comisión para la Gestión de Riesgo (CGR); Evaluación de Riesgo en Bioseguridad (ERB); Comité de Articulación Institucional (CAI), en la que confluyen instancias técnico-científicas y de decisión, a partir de las cuales el GNBio, conformado por MGAP, MSP, MEF, MVOTMA, MRREE y MIEM, determinará la pertinencia de autorizar nuevas solicitudes vinculadas a los vegetales y sus partes genéticamente modificadas que ingresen al país



**Figura 4:** Esquema de trabajo propuesto en el Decreto 037/07 para la aprobación de nuevos eventos vegetales genéticamente modificados. La figura fue tomada de la presentación “Nuevo marco legal para OGM’s vegetales” por Ing. Agr. Alejandra Ferenczi, coordinadora del ERB.

En lo que se refiere a participación pública, el decreto 353/008 considera diferentes niveles en la interacción entre los tomadores de decisiones y la población. En primer lugar, se definieron instancias de información a la ciudadanía sobre el evento que se quiere ingresar al país, a través

de canales de difusión pública. Asimismo, previo a la presentación al GNBio para la toma de decisión se tiene previsto la apertura de una fase de consulta a la ciudadanía, a través de puesta de manifiesto, audiencia pública u otra alternativa que la CGR considere pertinente. Finalmente, el Comité Consultivo en Bioseguridad (CCB), órgano asesor de carácter no vinculante, integrado por representantes de instituciones públicas, la Universidad de la República, sector privado y sociedad civil, colaborará en la construcción y seguimiento de las políticas de bioseguridad de vegetales y sus partes genéticamente modificadas.

Las nuevas autorizaciones que se realicen se considerarán según corresponda para las siguientes aplicaciones:

- a. uso contenido (a escala de laboratorio);
- b. realización de pruebas y ensayos en condiciones controladas (a escala de campo);
- c. producción y uso comercial para consumo directo o transformación;
- d. importación y exportación con destinos específicos para consumo directo o transformación.

El decreto establece una política de coexistencia regulada, reconociendo que los diferentes sistemas productivos: convencional, orgánico, o transgénico, tienen un rol a cumplir en la agropecuaria y por tanto es deseable promover el desarrollo de esos diferentes sistemas productivos.

En cuanto a lo que a trazabilidad de transgénicos en alimentos respecta, en el Artículo 4° de este nuevo decreto se establece que el GNBio promoverá acciones tendientes a la implementación del etiquetado voluntario "GM" o "no GM", aplicable a aquellos alimentos en los que se pueda comprobar mediante análisis del producto final la presencia de ADN o proteínas genéticamente modificados.

Según el Ing. Enzo Benech, actual presidente del INIA y miembro del Grupo Interministerial que elaboró el decreto, "...se priorizó en el tema etiquetado, el tener en cuenta lo que pasa en el mundo y los costos y beneficios que implica adherir a una u otra postura. Para tomar esta decisión, no solo se consideró lo que es correcto y lo que no, sino la capacidad como país de hacer cumplir la normativa y eso implica el seguimiento de las decisiones, denuncias en el caso de que no se cumplan y sanciones cuando se prueba que no se cumple. Por esto, la decisión fue optar por un sistema de etiquetado voluntario "Genéticamente Modificado" o "No Genéticamente Modificado", ambos tendrán la posibilidad de diferenciarse con el requisito que pueda probarse mediante análisis del producto final la presencia o no de ADN o proteínas genéticamente modificadas. Para tomar esta decisión también se tuvo en cuenta la cantidad de productos intermediarios de la industria que el país importa de países que no tienen normativa

de etiquetado o trazabilidad de su producción. De poner una exigencia fuerte en este sentido, el país pondría una fuerte restricción al comercio y al desarrollo de algunos sectores, industriales y agroindustriales importantes para el país.” (Benech, 2009)

## PROTOCOLO DE CARTAGENA

El Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (PCSB) es un acuerdo internacional (tratado), concluido y adoptado dentro del marco del Convenio de Diversidad Biológica (CDB) el 11 de setiembre del 2003. Tiene su origen en el Principio 15 (Enfoque de Precaución) de la Declaración de Río y en el Artículo 19 del Convenio de Diversidad Biológica.

El objetivo primordial del Protocolo, es contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los Organismos Vivos Modificados (OVM) resultantes de biotecnología moderna que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, tomando en cuenta los riesgos para la salud humana.

El PCSB se aplica especialmente a OVM que van a ser introducidos intencionalmente en el medio ambiente (bajo el Artículo 7) y también se aplica a OVM que se utilizan como alimento humano, animal o para procesamiento (bajo el Artículo 11). Sin embargo el Protocolo no se aplica a OVM que son productos farmacéuticos destinados a seres humanos o animales (ya que están contemplados en otros acuerdos internacionales por la OMS), tampoco a OVM que son alimentos procesados, ya que estos no son considerados organismos “vivos” ni contienen combinaciones nuevas de material genético replicable. Otros productos a los cuales el Protocolo no se aplica son los derivados como los combustibles, plásticos, etc.

El 29 de diciembre de 2008, el Poder Ejecutivo envió un mensaje al Parlamento (firmado por el Presidente de la República) solicitando la ratificación por parte de Uruguay del Protocolo de Cartagena sobre Seguridad en Biotecnología (Asunto N° 672a/2008). Esto significa que, seguramente en poco tiempo, el Protocolo de Cartagena comience a ser parte de nuestra legislación nacional y por lo tanto tengamos que adaptarnos como país a su normativa. Si bien el Protocolo deja a libre decisión de las Partes el etiquetado de productos GM dentro de su territorio, sí exige el etiquetado de los *containers* o recipientes que van a hacer movimientos transfronterizos con contenidos de organismos vivos genéticamente modificados.

## FERTILIZACION CRUZADA EN MAÍZ

Ha sido estimado que por cada óvulo, una planta de maíz produce entre 9000 (Bonnett, 1947) y 50000 (Weatherwax, 1955) granos de polen, generalmente en un período entre 5 y 8 días. Asumiendo que por cada mazorca de maíz crecen aproximadamente unos 500 granos, una planta producirá entre 4.5 y 25 millones de partículas de polen (Paterniani & Stort, 1974). Los granos de polen son grandes (90-125µm), y cuando son comparados con otras plantas anemófilas tienen una alta velocidad terminal.

El maíz es considerado una planta protándrica (que desarrolla a destiempo sus órganos masculinos y femeninos para evitar la autofecundación), a pesar de ello usualmente existe un solapamiento entre la liberación del polen y la emergencia de los estigmas en la misma planta que puede provocar hasta un 5% de autopolinización.

Desde la liberación al medio ambiente del primer evento transgénico en maíz, existe una creciente preocupación por la preservación de la identidad genética del maíz convencional (*Zea mays L.*) y de la distancia necesaria para segregar la producción de semillas de maíz no genéticamente modificado de la producción de granos genéticamente modificados. Se han llevado a cabo varios estudios al respecto, entre los cuales a los efectos de este trabajo se detallan dos.

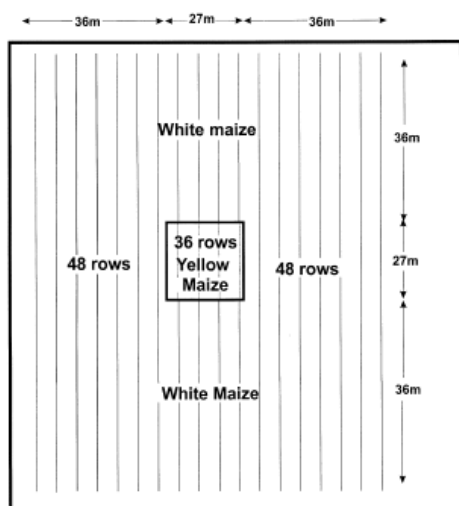
### *Dispersión del polen.*

La polinización del maíz se debe mayoritariamente a la acción del viento, a pesar de que existe evidencia que abejas y otros insectos recolectan su polen (Bateman, 1947). Emberlin et al concluyen en su trabajo que los insectos tienen un rol muy pequeño en la polinización cruzada del maíz (Emberlin, 1999). Los datos publicados sobre la viabilidad del polen bajo condiciones naturales varían desde 24 horas hasta varios días (European Environment Agency, 2002).

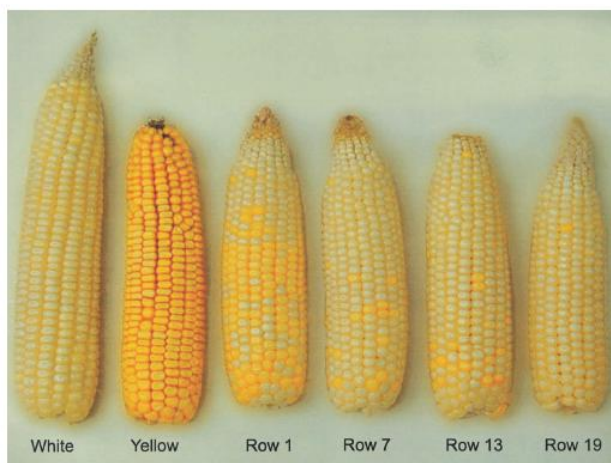
Sears y Stanley-Horn (Sears & Stanley-Horn, 2000) examinaron la distancia, dirección y la densidad de la dispersión del polen del maíz Bt en varios sitios de Ontario, Canadá. Los resultados muestran que sin importar la orientación de la plantación, la mayoría del polen, cae dentro de los 5 metros de los bordes exteriores de la siembra (Figuras 5). Estos datos son consistentes con otros experimentos llevados a cabo por Pleasants et al (Pleasants, 1999). En siete de los nueve campos analizados (en los siete que se completo el análisis y muestreo de polen), un promedio del 90% del polen fue atrapado en platos dentro de los 5 metros desde el



borde de la plantación. La tabla 5 muestra el porcentaje acumulativo de la deposición de polen de maíz a distancias de hasta 100 metros. Estos datos demuestran que el 98% del polen permanece dentro de los 25 – 50 metros de distancia en la mayoría de los campos de maíz.



**Figura 5:** Esquema del diseño experimental para estudiar fertilización cruzada en maíz. El maíz amarillo corresponde al maíz GM y el maíz blanco al no-GM.



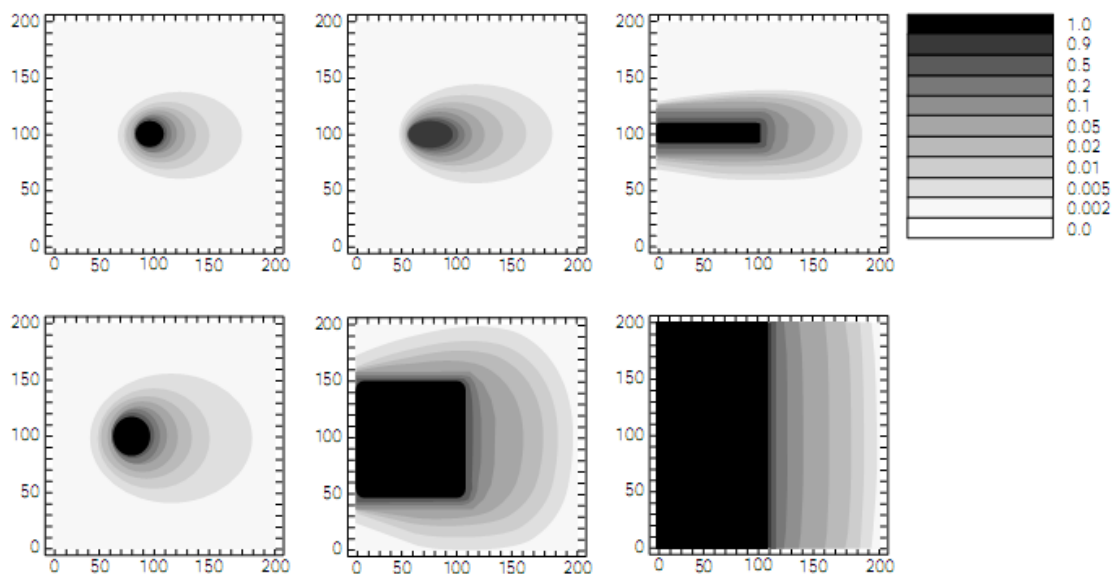
**Figura 6:** Ejemplo de fertilización cruzada en mazorcas de maíz blanco contaminadas con polen foráneo de una plantación vecina de maíz Amarillo. Las primeras dos mazorcas son los controles de maíz blanco y amarillo respectivamente. Luego en orden de cercanía al centro (maíz amarillo) se ven los niveles de fertilización cruzada.

Cumulative percentage pollen deposition (%)							
Field	0 m	1 m	5 m	10 m	25 m	50 m	100 m
1	46	75	91	97	99	100	100
2	43	70	88	94	96	97	100
3	46	73	88	95	98	99	100
4	47	81	92	96	98	99	100
5	35	69	88	93	98	99	100
6	41	76	90	97	98	99	100
7	38	72	84	96	98	99	100
Overall	43	74	89	95	98	99	100

Source: Sears and Stanley-Horn, 2000

**Tabla 5:** Porcentajes acumulativos de deposición de polen a varias distancias de siete campos de maíz Bt en Ontario, Canadá.

Klein et al (Klein, 2003), llevaron a cabo un experimento utilizando semillas de diferentes colores para estimar la hibridación entre plantas de maíz (Figura 6). Según sus resultados es claro que el flujo del polen y la frecuencia de polinización cruzada desde un campo hacia otro dependen del tamaño y forma del campo de manera no lineal (Figura 7).



**Figura 7:** Modelo para predecir los patrones de dispersión del polen de maíz desde una fuente de tamaño y forma variada dentro un campo de 200 x 200 metros. La fuente de dispersión está representada en negro. (arriba) 20 m x 20 m, 40 m x 20 m, 100 m x 20 m (abajo) 40 m x 40 m, 100 m x 100 m, 200 m x 200 m. Klein et al

Jones & Brooks, estimaron el porcentaje de cruzamiento entre grandes bloques de cultivos emisores y receptores durante un período de tres años en una distancia máxima de 500 metros (Jones & Brooks, 1950). El porcentaje de hibridización mas alto fue de un 25,4% en las siembras más próximas, cayendo a 1,6% a 200 metros y a 0,2% a 500 metros. Un estudio similar llevado a cabo por Salamov, reporta porcentajes de 3.3% a 10 metros de la fuente, 0,5% a 200 metros, 0,8% a 600 metros y 0,2% a 800 metros (Salamov, 1940).

### *Posibles consecuencias del flujo génico*

Se ha encontrado polinización entre variedades de maíz a distancias de hasta 800 metros, por lo que es posible que al menos hasta esta distancia, pueda producirse polinización cruzada entre plantas no-GM y GM. A pesar que los estudios solo consideran distancias de dispersión de hasta 800 metros, es probable que pequeñas cantidades de polen, bajo condiciones atmosféricas particulares, puedan viajar distancias mayores (Treu & Emberlin, 2000). Estos autores también aseguran que, el maíz genéticamente modificado presenta riesgo medio a alto de inclusión de polen en mieles que se produzcan en establecimientos cercanos a la siembra.

La mínima distancia de separación entre cultivos para producción de semillas que asegure un 99% de pureza entre líneas es de 200 metros. Para asegurar un 99,5% de pureza deberían utilizarse distancias de 300 metros (Ingram, 2000).

Por otro lado, debido a la falta de publicaciones a nivel nacional sobre el grado de contaminación entre cultivos GM y no-GM, se presenta el estudio realizado en nuestro país durante el año 2009, desarrollado en colaboración entre la ONG REDES-AT y el laboratorio de Trazabilidad Molecular (Sección Bioquímica) de Facultad de Ciencias. Los resultados de éste arrojan que, de las 11 chacras no transgénicas muestreadas, sólo 5 presentaban riesgo real de fertilización cruzada por transgénicos, teniendo en cuenta la distancia a la chacra transgénica más cercana y la coincidencia en las fechas de floración de ambos cultivos. De éstas, tres presentaron contaminación (hubo expresión del transgen en la progenie del cultivo no transgénico). Cuando se analizaron las distancias entre las chacras, dos de estas se encontraban a distancias de aproximadamente 40 y 100 metros de distancia de la plantación de maíz GM más cercana y en el tercer caso se encontraba a mas de 300 metros de la plantación de maíz GM más cercana (Galeano et al, 2009).

## **DERECHO DEL CONSUMIDOR**

La preocupación del consumidor en relación a la composición de los alimentos es cada vez mayor. Los consumidores exigen información clara y exacta, dado que la elección de un producto puede estar relacionada con un estilo de vida (vegetarianismo, preferencia de productos “orgánicos”), problemas de salud (ausencia de lactosa o gluten), o temas religiosos (ausencia de cerdo para los judíos y musulmanes, y de vaca para los hindúes (Rodríguez M, 1994). Por lo tanto, la descripción y/o etiquetado de los alimentos debe ser fidedigna y precisa. La información que debe ser suministrada está regida por ley en la mayoría de los países, de manera que los alimentos deben coincidir exactamente con lo descrito en sus etiquetas. Así, se busca tanto proteger al consumidor como evitar una competencia desleal que afecte al comerciante honesto (Lumley, 1996).

La descripción falsa, fraudulenta, de los contenidos de los alimentos en las etiquetas de los productos es un problema generalizado, dadas las importantes ganancias que puede producir (Ashurst & Dennis, 1996) (Patel, 1994), particularmente en productos de alto valor agregado. Algunos casos de adulteración han generado graves problemas de salud, como la sustitución de algunas especias con óxido de plomo, o la adición de anticongelante al vino, o un contaminante tóxico al aceite de oliva (Vallejo, 2005). Sin embargo, la mayoría de los casos de fraude alimenticio tienen consecuencias económicas más que de salud, ya que ningún consumidor quiere pagar más por algo que lo que realmente vale (Al-Jowder, 1999).

### **Trazabilidad basada en el ADN**

Para el análisis de transgenicidad, tanto en semillas como en matrices alimenticias, últimamente la atención se ha ido enfocando en los ensayos de trazabilidad basados en el ADN. Éstos presentan varias ventajas respecto a aquellos basados en la identificación de proteínas, debido principalmente a la mayor estabilidad estructural del ADN a altas temperaturas (el ADN permanece normalmente estable en el rango de temperaturas utilizado para procesar los alimentos, y suele obtenerse en cantidad y calidad suficientes como para ser analizado posteriormente), y a la posibilidad de permitir una identificación absolutamente precisa mediante el secuenciado nucleotídico (Lockley & Bardsley, 2000). Además, el ADN puede extraerse de la casi totalidad de los tejidos del organismo (incluyendo semillas, hojas, polen, frutos, etc), lo que permite la obtención de información idéntica a partir de cualquier muestra del mismo organismo, sin importar el tejido de origen (Martínez & Yman, 1998) (Wolf, 1999). De esta manera, la identificación basada en el ADN ha tenido un rápido desarrollo, y a lo largo

de los últimos años se ha ido estableciendo como la herramienta más utilizada para determinar si un alimento fue elaborado a partir de materia prima con contenido transgénico.

Los métodos hoy utilizados están basados en la amplificación de secuencias nucleotídicas específicas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En esta técnica, *primers* sintéticos que actúan como cebadores se hibridan a secuencias complementarias en el ADN blanco, y dirigen la síntesis de millones de copias del fragmento de ADN al cual fueron diseñados para flanquear. Los productos de dicha amplificación (amplicones) pueden luego ser analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa e incluso secuenciados para determinar la presencia o ausencia del evento buscado.

La PCR es una técnica rápida, que permite obtener cantidades suficientes de ADN para su posterior análisis a partir de cantidades mínimas del mismo. Sin embargo, es una técnica costosa en infraestructura de partida (por el equipamiento, reactivos y recursos humanos capacitados) y dada su gran sensibilidad requiere un lugar de trabajo debidamente diseñado para evitar contaminación por producto previamente amplificado, ya que esto puede provocar la aparición de “falsos positivos” en el resultado final. Entre las medidas a tomar se incluye el tener áreas de trabajo separadas para la manipulación pre-PCR y post-PCR. Es necesario también que el ADN de partida esté libre de contaminantes que puedan inhibir la reacción (Rossen, 1992).

Existen tres factores esenciales que determinan el éxito del método de detección de OGM mediante PCR. Estos son la cantidad de ADN extraído, la calidad, la cual se relaciona con la cantidad de daño que ha sufrido el ADN durante los pasos de procesamiento del alimento antes de la purificación, y la pureza, la cual refleja la cantidad de contaminantes co-purificados con el ADN (Griffiths, 2002).

Una extracción optimizada del ADN resulta fundamental para asegurar la presencia y calidad del material a amplificar por PCR. Este aspecto resulta particularmente importante en el análisis de alimentos que han sido altamente procesados, pues el ADN puede degradarse durante el procesamiento, particularmente por tratamiento térmico en presencia de agua, por lo que la cantidad de fragmentos que aún contienen el blanco de interés intacto, decrece a medida que el alimento es procesado. En adición, el método de purificación de ADN utilizado debe remover todas las sustancias inhibitoras presentes en la muestra, lo cual no siempre es sencillo (Griffiths, 2002).

## Especificidad de los métodos de detección por PCR

Básicamente existen cuatro niveles de especificidad para los análisis de transgénesis realizados por PCR (Figura 8), dependiendo del blanco al cual estén dirigidos los cebadores utilizados (Miraglia, 2004) (Holst-Jensen, 2003).

En el primer nivel de especificidad encontramos lo que llamaremos rastreo (*screening*) de transgénicos. Los elementos génicos contra los que están dirigidos los *primers* son secuencias comunes a la mayoría de los transgénicos como son los promotores (ej. p-35S) y terminadores (ej. t-Nos). Por esta misma razón, este tipo de aproximación no sirve para determinar específicamente frente a qué evento estamos, sino, simplemente para establecer en primera instancia, si la muestra contiene o no rastros de material transgénico. Si bien tienen la ventaja de poder detectar la presencia de varios eventos en un solo ensayo, no existe un solo rastreo que detecte todos los OGM. Son métodos cualitativos, cuya sensibilidad suele estar en el entorno del 0.1% (Griffiths, 2002).

El segundo nivel es el de los métodos específicos de gen o característica (*trait-specific*). Estos, tienen como blanco alguno de los genes activos del transgén como pueden ser el gen *cryIAb* en Mon810 y Bt11 o el *pat* en Bt11. Pueden dar información sobre las características fenotípicas en un OGM o la posible presencia de un grupo de eventos con cierta característica en una muestra, pero no sirven para indicar específicamente que evento es el que se encuentra en la muestra, ya que el gen en cuestión puede haber sido utilizado en varios OGM diferentes.

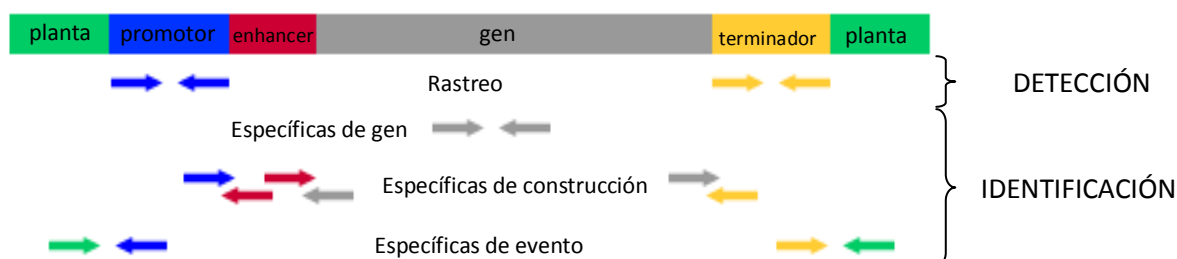
Tanto los métodos de rastreo como los específicos de gen se basan en la detección de secuencias de ADN que ocurren naturalmente en el ambiente, hecho que aumenta el riesgo de obtener falsos positivos al analizar la muestra (Miraglia, 2004), y más en los casos en que la muestra es una mezcla compleja que no se conocen sus componentes como son los alimentos.

Subiendo un nivel más en especificidad, nos encontramos con estrategias de detección específicas de construcción. Este tipo de aproximación tiene como blanco amplificar secuencias borde dentro de la construcción del transgén, por ejemplo el borde entre el promotor y el gen o entre el gen y el terminador. Mediante los PCR construcción específicos se acota de manera considerable el abanico de posibilidades, pero siguen siendo métodos que no sirven para determinar exactamente cuál es el evento que se encuentra en la muestra ya que existen varios eventos transgénicos que comparten construcciones (resistencia a lepidópteros en Mon810 y Bt11). Si bien en general son métodos cualitativos, hay algunos ejemplos de métodos

cuantitativos basados en estrategias de este tipo (Protection, Institute for Health & Consumer, 2007).

Por último, los métodos evento específicos, permiten identificar un evento de transformación (Griffiths, 2002). Son los que logran mayor especificidad ya que el blanco de detección es la unión encontrada en el locus de integración entre el ADN transgénico y el genoma del huésped. De todas maneras, incluso estos métodos tienen sus limitaciones ya que existen cruzamientos entre líneas de OGM los cuales pueden llevar a generar genes apilados (*stacked*) en la descendencia, por lo que los métodos pueden no distinguir entre el gen apilado y una mezcla entre dos OGM parentales. En los Estados Unidos, este tipo de OGM híbrido no es regulado si ambos OGM parentales son autorizados. En la Unión Europea, sin embargo, los organismos de la prole con el gen apilado requieren autorizaciones separadas y por lo tanto debe ser cuantificado como un solo OGM (Miraglia, 2004).

Para el caso de Uruguay, los eventos en *stack* son tratados como eventos diferentes, por lo que hay que hacer todo el proceso de solicitud de entrada y evaluación de riesgo para cada uno de ellos por más que todos las construcciones que forman parte del apilado ya se encuentren aprobadas (Decreto 353/008).



**Figura 8:** Categorías de ensayos de PCR según el blanco a analizar marcada sobre una construcción de un evento transgénico tipo. De arriba hacia abajo se muestran las estrategias en grado creciente de especificidad.

## DETECCIÓN

### *PROMOTOR 35S*

El promotor 35S es un promotor fuerte constitutivo que causa altos niveles de expresión en plantas dicotiledóneas. Sin embargo es menos eficiente en monocotiledóneas, especialmente en cereales, las diferencias de expresión son posiblemente debidas a diferencias en la cantidad/calidad de los factores de regulación (Delta and Pine Land Co., 1995). Existe una versión del promotor 35S, el e35S el cual está modificado para que funcione de forma más efectiva en este tipo de vegetales (Monsanto, 1993).

Para la detección del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor, común a la mayoría de los eventos genéticamente modificados (incluidos el Bt11, Bt176 y Mon810), y por lo tanto útil para realizar un rastreo primario, se utilizó en este trabajo el par de cebadores 35S-1/35S-2 (ver tabla materiales y métodos), que amplifica un fragmento de 195pb (Lipp, 1999). Este juego de cebadores está validado por el Joint Research Center (JRC) tanto para eventos de maíz como de soja.

### *TERMINADOR Nos*

El terminador t-Nos también es un elemento común entre los eventos vegetales genéticamente modificados (Bevan, 1983). Es por ésta razón que utilizado junto con el promotor 35S es un blanco de suma importancia para el rastreo de OGM. Dos cebadores muy utilizados son el HA-nos 118-f (GCATGACGTTATTTATGAGATGGG) y el HA-nos 118-r (GACACCGCGCGATAATTTATCC), también aprobados por el JRC europeo. El amplicón producido al realizar PCR utilizando el par HA-nos, en caso de encontrarse la presencia de la secuencia t-Nos en la muestra problema, es de 118pb.



## IDENTIFICACIÓN DE EVENTO

### *Mon810*

Para determinar la presencia del evento Mon810 en las muestras se utilizó el par de cebadores VW01/VW03 que producen un amplicón de 170pb únicamente en presencia de material que contenga el evento. El VW01 hibridiza en el genoma de maíz (5'-genoma vegetal) mientras que el VW03 hibridiza con en el promotor P-e35S del inserto.

Si bien el método es evento específico y nos permite confirmar la presencia de Mon810 en una muestra, no sirve para realizar análisis cuantitativos (Institute for Health & Consumer Protection, 2007).

Para realizar análisis cuantitativo de Mon810 se puede utilizar el par de cebadores Mail-F1 (TCGAAGGACGAAGGACTCTAACGT) / Mail-F2 (GCCACCTTCCTTTTCCACTATCTT) que amplifican una región de 92pb en la unión 5` entre el genoma de maíz y el promotor e35S del transgen. La sonda a utilizar durante el rt-PCR es la Mail-S2 (5'-FAM-AACATCCTTTGCCATTGCCAGC-TAMRA-3'). Como control endógeno se utilizan los cebadores ZM1-F (TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA) / ZM1-R (GCTACATAGGGAGCCTTGTCTT) que amplifican el gen *hmg* de maíz (*high mobility group*) con la sonda ZM1 (5'-FAM-CAATCCACACAAACGCACGCGTA-TAMRA-3'). Este método fue publicado en el año 2003 por el Federal Institute for Risk Assessment (BfR) de Alemania y se encuentra entre los validados por el JRC.

### *Bt11*

Para determinar la presencia del evento Bt11 en las muestras se utilizó el par de primers IVS2-2/PAT-B que producen un amplicón de 189pb únicamente en presencia de material que contenga el evento. El IVS2-2 hibridiza en el gen *adh* del inserto (intron 2 de la alcohol deshidrogenasa 1 de maíz) mientras que el PAT-B en el gen *pat* (fosfinotricin N-acetil transferasa) del inserto. Éste es un método construcción específico ya que amplifica la zona de unión entre el gen *adh* y el gen *pat* del transgen. Como en el caso del Mon810 el método que se utilizó está aprobado por el JRC como estrategia cualitativa y no cuantitativa.

Para realizar análisis cuantitativo de Bt11 se puede utilizar el par de cebadores Bt113JFor (GCGGAACCCCTATTTGTTTA) / Bt113JRev (TCCAAGAATCCCTCCATGAG) que amplifican una región de 70pb en la unión 3` entre el genoma de maíz y el transgen. La sonda a

utilizar durante el rt-PCR es la Bt113JFT (5'-FAM-AAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA-TAMRA-3'). Como control endógeno se utilizan los cebadores ZmayInvFor (CACTCCATCGTGGAGAGCTT) / ZmayInvFor (GGCGTTGTTGAAGAGGAAGA) que amplifican el gen de zeína de maíz con la sonda ZmayInvFT (5'-FAM-TACCCACACGAGCCATCTACGACT-TAMRA-3'). Este método fue publicado en el año 2003 por el Join Research Centre de Italia y se encuentra entre los validados por el JRC.

### **Bt176**

Para determinar la presencia del evento Bt176 en las muestras se utilizó el par de cebadores Cry05/Cry06 que producen un amplicón de 134pb únicamente en presencia de material que contenga el evento. El Cry05 hibridiza en la secuencia que codifica para el promotor CDPK (proteínkinasa dependiente de calcio) mientras que el Cry06 en el gen *cry1ab* del inserto. Éste es un método específico de construcción ya que amplifica la zona de unión entre el promotor CDPK y el gen *cry1ab* del transgen. Como en el caso del Mon810 y el Bt11 el método que se utilizó está validado por el JRC como estrategia cualitativa y no cuantitativa.

### **Controles Positivos**

Tanto en las PCR de rastreo como en las realizadas para detección evento específicas de todos los eventos, se utilizaron controles positivos de maíz no transgénico. Para amplificar estos controles positivos se usaron los cebadores IVR1/IVR2 que amplifican el gen endógeno *ivr* que codifica la invertasa de maíz. Este par de cebadores generan un amplicón de 205pb únicamente cuando en la muestra hay presencia de maíz.

## Parámetros que afectan los métodos de detección de OGMs

Para la detección de OGM en alimentos, varios parámetros deben de ser tenidos en cuenta: el límite de detección, la matriz del alimento, el grado de degradación y la homogeneidad de la muestra, disponibilidad de métodos validados y la disponibilidad de materiales de referencia (Pöpping, 2001) (Kay, 2001).

### *Límite de detección*

Los límites de detección para OGMs se definen como la cantidad mínima de material genéticamente modificado que puede ser detectado con cierta confianza determinada. Estos límites son específicos para cada evento y para cada muestra que se está analizando. Para cada método de análisis se define un límite de detección (LD) que está relacionado con la sensibilidad del método y es normalmente expresado como un porcentaje (%w/w, se define como la masa de soluto por cada 100 unidades de masa de la disolución). Es común reportar límites de detección para alimentos casi sin procesar como harina de maíz, sin embargo, productos como aceite, almidón hidrolizado, azúcar refinado, jarabes y productos fermentados, se caracterizan por presentar trazas de ADN altamente degradado, por lo cual es muy difícil establecer estos límites (Miraglia, 2004).

Para alimentos que sean una mezcla compleja de ingredientes, la estimación del LD es más complicada. Por ejemplo, en un producto elaborado de panadería, si se utiliza soja transgénica 1% (w/w) en forma de polvo de hornear, la cantidad necesaria del producto en la mezcla final podría ser de tan solo 0,5 % (w/w) del total de la receta. El contenido de soja GM total sería entonces de 0,005% (w/w) del total de la muestra, lo cual estaría muy por debajo del límite de detección para la mayoría de los métodos de detección. Algunos ingredientes de la comida pueden no contener ADN (por ejemplo agua y azúcar) mientras que otros ingredientes varían ampliamente en contenido de ADN y tamaño del genoma. Aunque el total de ADN pueda ser extraído de una muestra de torta, no es posible determinar qué porcentaje de ADN derivó de soja GM. Por lo tanto, el límite de detección de un método debe ser definido en base al análisis de un producto que contenga un solo ingrediente (Griffiths, 2002) (Akiyama, 2005).

Para resolver el problema del LD al analizar productos conteniendo varios ingredientes, se han introducido cláusulas en algunas reglamentaciones que expresan que cualquier ingrediente presente en cantidades menores al porcentaje w/w definido para el producto total, no requerirá el etiquetado y no deberá ser analizado (Griffiths, 2002).

### ***Matriz del alimento***

La matriz contiene una gran variedad de componentes además de ADN, incluyendo proteínas, lípidos, ácidos grasos y polisacáridos, muchos de estos, conocidos inhibidores de la reacción en cadena de la polimerasa en alguno de sus pasos o problemáticos a la hora de realizar la extracción de ADN. La presencia de algunos polisacáridos vegetales como la pectina puede efectivamente inhibir la reacción de PCR y complicar de sobremanera las extracciones de ADN (Rogstad H, 2001). En ausencia de controles apropiados, esto podría ser interpretado como un falso negativo (Pöpping, 2001).

### ***Grado de degradación***

El grado de degradación de los materiales a analizar también es importante. Tanto, la humedad, el pH como la temperatura en los procesos de manufactura de alimentos son variables que hay que tener en cuenta a la hora de desarrollar los métodos de extracción de ADN y estimar la calidad del mismo para desarrollar estrategias de trazabilidad. Si se quiere detectar el ADN y está demasiado degradado para ser reconocido (por cebadores), hay nuevamente una posibilidad de obtener falsos negativos. Esto puede ser evitado realizando los controles apropiados (Pöpping, 2001).

### ***Homogeneidad de la muestra***

La homogeneidad de la muestra es crucial en la mayoría de los casos, ya que sólo una submuestra es analizada. Si el material genéticamente modificado no está uniformemente distribuido en la muestra, existe alta probabilidad de obtener falsos negativos (Pöpping, 2001).

### ***Dificultades durante la extracción en matrices cocidas***

La reacción de Maillard es la glucosilación no enzimática de proteínas. Se trata de un conjunto complejo de reacciones químicas que se producen entre las proteínas y los azúcares reductores que se dan al calentar (no es necesario que sea a temperaturas muy altas) los alimentos o mezclas similares. Se trata básicamente de una especie de *caramelización* de los alimentos, es la misma reacción la que colorea de marrón la costra de la carne mientras se cocina al horno. (J. Harrison & R. Dake, 2005).

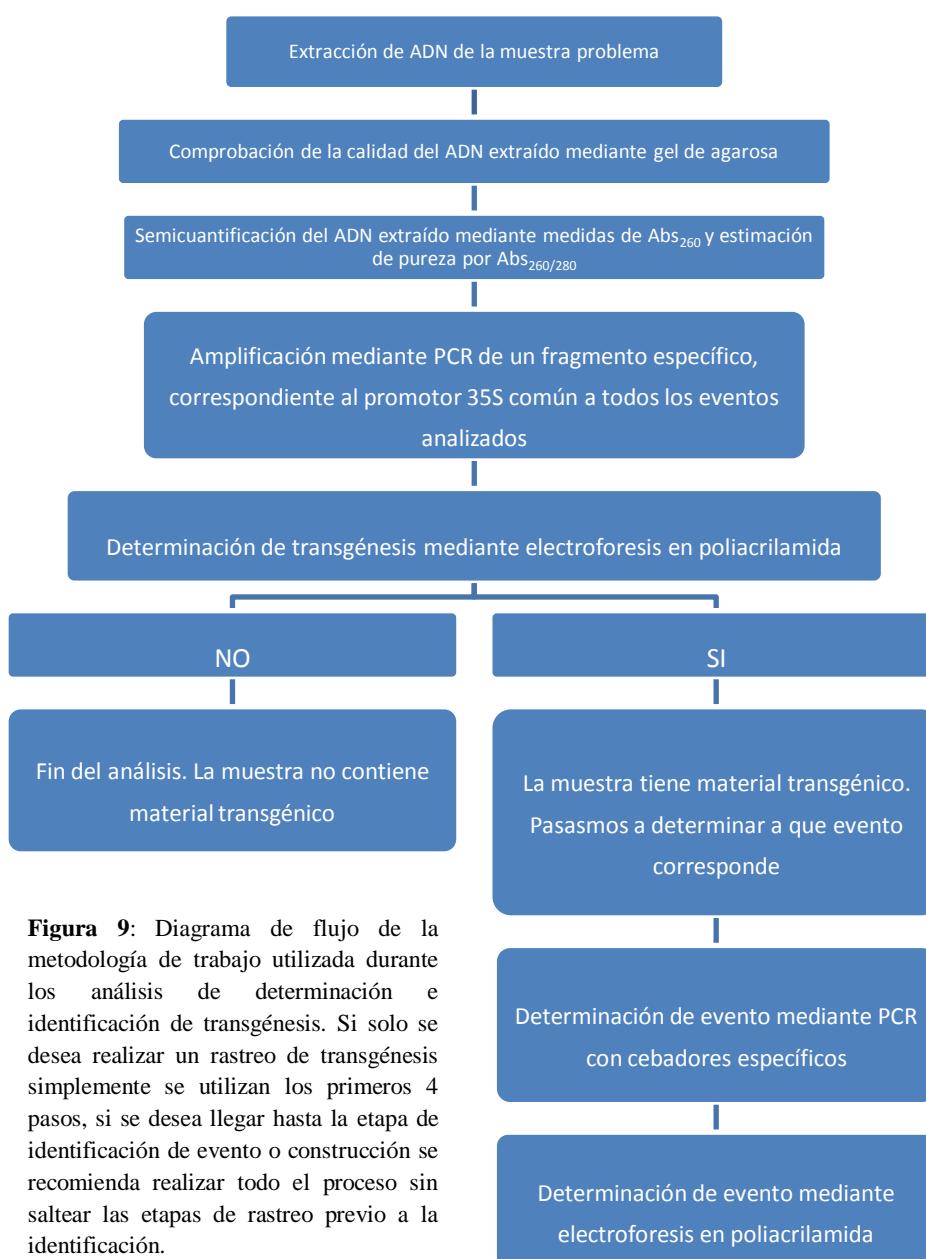
Esta reacción dificulta la posterior extracción del ADN de las muestras, por lo que hay que utilizar durante la extracción productos como el PTB (*N*-phenacyl thiazolium bromide) que

rompen los enlaces formados durante la cocción del alimento. El PTB es utilizado para la extracción de ADN de muestras con alto avance de degradación como alimentos altamente procesados (Di Bernardo, 2008) o huesos en yacimientos paleontológicos (Gugerli, 2005) (Asif, 2005) por ejemplo extracciones de ADN a partir de restos humanos del Neanderthal (Kring, 1997).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Estrategia experimental

El método utilizado en este trabajo para la detección e identificación de transgénicos (Figura 9) se basa en la extracción de ADN a partir de las muestras problema y su posterior análisis mediante técnicas moleculares. Tanto la detección del transgénico como la identificación del evento específico están basadas en las técnicas de PCR y electroforesis de poliacrilamida. Los perfiles obtenidos para las muestras se comparan con controles positivos y negativos de maíz transgénico.



**Figura 9:** Diagrama de flujo de la metodología de trabajo utilizada durante los análisis de determinación e identificación de transgénesis. Si solo se desea realizar un rastreo de transgénesis simplemente se utilizan los primeros 4 pasos, si se desea llegar hasta la etapa de identificación de evento o construcción se recomienda realizar todo el proceso sin saltar las etapas de rastreo previo a la identificación.

La mayor parte de las plantas genéticamente modificadas aprobadas para comercio, contienen los mismos elementos reguladores (P-35S y T-NOS), por esta razón con reacciones de PCR que permitan detectar P-35S y T-NOS, se detectan más del 95% de estos eventos. De esta forma podemos detectar si un alimento contiene o no un OGM (pero no identificarlo). Todos los eventos transgénicos que se analizan en este trabajo contienen el promotor 35S como elemento regulador por lo que podemos asegurarnos la presencia o ausencia de material genéticamente modificado analizando únicamente la presencia o ausencia del mismo en la matriz alimentaria.

Para detectar los eventos Bt11, Bt176 y Mon810, se utilizaron cebadores específicos (detallados anteriormente) que tienen como blanco único la unión entre el ADN insertado y el genoma del huésped.

### **Muestras utilizadas**

Las muestras empleadas para la realización de los análisis fueron 20 polentas (harina de maíz) proporcionadas por el Laboratorio de Bromatología de la Intendencia Municipal de Montevideo. Todas las muestras se encuentran actualmente en el mercado. Cada muestra fue entregada al laboratorio correctamente sellada para que no exista transferencia de material entre ellas y además diferenciadas mediante un código, tal que, solamente el personal del laboratorio de Bromatología tenía conocimiento del origen de cada una.

Tanto los controles positivos como los controles negativos fueron proporcionados por el Dr. Claudio Martínez Debat. Se usaron controles positivos para promotor del virus del mosaico del coliflor (35S), Bt11, Mon810, Bt176 e Invertasa de Maíz.

El proceso de detección fue puesto a punto y aplicado a ADNs extraídos puros de 3 muestras de polenta de marcas conocidas, 1 muestra de cereales azucarados, 1 muestra de “Nachos”, varias muestras de propoleo y 1 muestra de hojas de maíz frescas.

### **Descontaminación del lugar y elementos de trabajo**

Las mesadas, morteros y pipetas fueron descontaminados antes de cada experimento siguiendo los siguientes pasos: 5 minutos en Hipoclorito de Sodio 10%, 5 minutos en alcohol 70% y posterior lavado con H<sub>2</sub>O mRO (Dupont).

Se utilizaron guantes libres de “talco” en todas las etapas experimentales debido a razones que más adelante se discutirán.

## Protocolo de extracción de ADN

Las muestras fueron homogeneizadas utilizando morteros de cerámica (previamente autoclavados y descontaminados) hasta obtener polvillo fino.

Para las extracciones de ADN se utilizaron el protocolo Dellaporta et al (Dellaporta, 1983) con pequeñas modificaciones y el Kit QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit.

**Dellaporta:** A 70 mg de muestra homogenizada se agregan 700  $\mu$ L de Buffer de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8.0; EDTA 10 mM pH 8.0; NaCl 100 mM; SDS 1%;  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM). Se mezcla por inversión unas 10 veces hasta que el buffer de extracción llega a toda la muestra y se incuba a 65 °C durante 20min, agitando cada 2 min. Posteriormente se agregan 200  $\mu$ L de acetato de potasio 5M, se invierte el tubo 5 veces, y se incuba en hielo por 10 min. Luego se centrifuga a 12000 rpm por 20 min, y se toman 500  $\mu$ L del sobrenadante, a los cuales se les incorporan 500  $\mu$ L de isopropanol y se mezcla por inversión unas 10 veces. Se centrifuga por 15 min a 12000 rpm, y luego de descartar el sobrenadante se agregan 250  $\mu$ L de etanol 70%, centrifugando nuevamente por 5 min a 12000 rpm. Por último, se descarta el sobrenadante, se seca el precipitado, se resuspende en 100  $\mu$ L de agua mQ y se guarda en freezer a -20°C para su posterior utilización.

**QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit:** Las muestras son homogenizadas mecánicamente y luego lisadas químicamente con un buffer proporcionado por el Kit. El ARN es removido mediante digestión con ARNasa para asegurarnos de obtener ADN celular puro. Los restos celulares son removidos al pasar la muestra por una columna tipo filtro (QIAshredder) y centrifugar. Se precipitan las proteínas y polisacáridos y el lisado es cargado en una columna de sílica-gel. Esta columna pega selectivamente el ADN dejando pasar el resto de los contaminantes. Los contaminantes que quedan pegados débilmente a la columna son eliminados mediante dos pasos de lavado. El ADN es luego eluido de la columna con agua o buffer salino.

Para hacer las extracciones se partió de la misma cantidad de muestra para ambos protocolos de extracción de manera de poder comparar tanto la cantidad como la calidad del ADN purificado a partir de ambos métodos y decidir mediante un balance costo/beneficio cual utilizar para el trabajo.



### Estimación de la concentración y pureza del ADN extraído

Para la estimación de la concentración de ADN extraído de las muestras se preparó una dilución del ADN extraído y se realizaron lecturas de absorbancia a 260nm específica para ADN y a 280nm para determinar la pureza del ácido nucleico (la mayoría de las proteínas muestran un pico de absorbancia a 280nm, debido a la presencia de aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano y fenilalanina)). Para estimar la concentración de ADN se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = (\text{Abs}_{260} \times \text{FD} \times 50) / 1000$$

Donde:

$\text{Abs}_{260}$ : absorbancia de la muestra a 260nm.

FD: factor de dilución de la muestra.

50: factor que indica que una absorbancia de 1.0 se tienen 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ADN de doble cadena.

1000: factor de conversión de mL a  $\mu\text{L}$ .

También se estimó la pureza del ADN extraído, según el índice  $\text{A}_{260}/\text{A}_{280}$ . Se consideran puras las muestras de ADN cuya relación  $\text{Abs}_{260}/\text{Abs}_{280}$  es mayor a 1,6.

### Estimación de la integridad del ADN extraído.

Para asegurarnos que durante el proceso de extracción se obtuvo ADN total de buena calidad (ADN no degradado), se realizaron electroforesis en agarosa 1% para todos los extractos. Los geles se prepararon diluyendo la agarosa necesaria en buffer TAE 1x (40 mM Tris, 20 mM Ácido acético, 1 mM EDTA) y añadiendo luego Bromuro de Etidio (BrEt) hasta llegar a la concentración final de 0,01 mg/ml.

Para visualizar el estado del ADN se utilizó un transiluminador UV que hace fluorecer el BrEt intercalado entre las bases del ADN durante la electroforesis. Se compararon los perfiles obtenidos con un estándar de peso molecular  $\lambda/\text{HindIII}$  para estimar la integridad del ADN extraído.

## Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Tanto para el rastreo del promotor 35S como para las identificaciones evento específicas de Bt11, Mon810 y Bt176 se amplificó específicamente el ADN extraído mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tabla 6). Todas las amplificaciones fueron realizadas en termocicladores de punto final. Las muestras a ser analizadas eran preparadas para la PCR en una zona exclusiva (sala de pre-PCR) descontaminada (según descrito anteriormente) previo a cada análisis.

**Tabla 6:** Cebadores utilizados para las reacciones de PCR de rastreo e identificación de eventos en este trabajo.

NOMBRE	SECUENCIA	T <sub>m</sub> (°C)	REPORTADO POR
35S-1	5' GCTCCTACAAATGCCATCA 3'	58	Comisión Europea Joint Research Centre (JRC)
35S-2	5' GATAGTGGGATTGTGCGTCA 3'	60,4	Comisión Europea Joint Research Centre (JRC)
IVR-1	5' CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC 3'	69,5	Ehlers et al., 1997
IVR-2	5' GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC 3'	69,5	Ehlers et al., 1997
Cry05	5' CCGCAGCCGATCCAACAATG 3'	64.5	Alemania, Federal Institute for Health Protection of Consumers (BgVV)
Cry06	5' GCTGATGTCGATGGGGGTGTAG 3'	66.4	Alemania, Federal Institute for Health Protection of Consumers (BgVV)
VW01	5' TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG 3'	64.55	Alemania, Federal Institute for Health Protection of Consumers (BgVV)
VW03	5' TCCATCTTTGGGACCACTGTCTG 3'	64.54	Alemania, Federal Institute for Health Protection of Consumers (BgVV)
PAT-B	5' GCTGCTGTAGCTGGCCTAATCT 3'	64.54	Alemania, Federal Institute for Health Protection of Consumers (BgVV)
IVS2-2	5' CTGGGAGGCCAAGGTATCTAAT 3'	62.52	Alemania, Federal Institute for Health Protection of Consumers (BgVV)

### *Puesta a punto de las reacciones de PCR*

La PCR fue puesta a punto con 7 muestras diferentes previo al análisis de las 20 polentas enviadas por Bromatología. Las nombraremos “P1” a “P7”:

**P1- Polenta instantánea (marca Gourmet)**

**P2- Polenta instantánea (marca Del Cultivo)**

**P3- Polenta instantánea (marca Puritas)**

Granos de maíz pulverizados mecánicamente mediante molienda seca sin ningún proceso de cocción (Araya, 1996).

**P4- Nachos (Doritos marca Pepsico)**

Tras la preparación de la masa (harina de maíz pulverizada, azúcar, agua y sal), se hornean (se precuecen) durante 1 minuto, endureciéndose para posteriormente pasar a una fritura en aceite vegetal (1 minuto a 175 °C). Luego sigue el sazonado donde se añaden las sales y especias que les darán los aromas y sabores característicos, para que los polvos de especias queden pegados se vuelve a añadir un poco de aceite.

**P5- Cereales de maíz azucarado (CornFlakes marca Ricard)**

En el proceso industrial de elaboración de “cornflakes”, los “flakinggrits” (fracciones gruesas de endosperma córneo que provienen de la industria de molienda) se cocinan a presión durante 1 a 2 hr en jarabe de sacarosa, malta y sal para ablandarlos. Una vez secos, se procede al laminado en rodillos de acero inoxidable. Así, se obtienen las hojuelas que a continuación se tuestan en un horno a alta temperatura (300° C durante 50 segundos), donde se desecan y ampollan; dando los copos de maíz de color marrón dorado que pueden o no ser saborizados antes del empaque comercial (Fast, 2000).

**P6- Hojas frescas de maíz**

Como muestra sin ningún tipo de procesamiento.

## P7- Propoleo- Laboratorios Apiter

Muestras de propoleo producido a partir de colmenas cercanas a siembra de maíz. El propoleo es una sustancia que obtienen las abejas de las yemas y cortezas de algunos árboles y que luego procesan, convirtiéndola en un potente antibiótico con el que cubren las paredes de la colmena, con el fin de combatir las bacterias, virus y hongos que puedan afectarla.

El propoleo tiene materias colorantes, los flavonoides, que son las más activas en la función antiséptica. Además contienen resinas y bálsamos, cera de abeja, aceites esenciales, polen y diversos materiales minerales como aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, estaño, hierro entre otros. También contiene provitamina A y vitaminas del grupo B, especialmente B3.

### DetECCIÓN

Para esta reacción se utilizaron los cebadores 35S-1 y 35S2 que amplifican una región del promotor 35S, utilizado en más del 95% de los eventos transgénicos (Hurst, 1999). El tamaño del amplicón es de 195pb. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25µL, cada tubo conteniendo, 1µL de ADN molde, 1µL del cebador 35S-1 [10µM], 1µL del cebador 35S-2 [10µM], 0,2µL Taq polimerasa Fermentas (equivalente a 1U), 0,2µL de solución dNTP's Fermentas (25mM), 2,5µL Buffer KCl (10x), 2,5µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM) y H<sub>2</sub>OmQc.s.p.. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer).

El termociclador fue programado para realizar 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 35 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 30 segundos a 72°C. Por último un ciclo de 7 minutos a 72°C.

Para el resto de las reacciones, es decir, control endógeno de maíz y determinación específica de Bt11, Mon810 y Bt176, se utilizó el mismo protocolo que para el rastreo de 35S pero usando los cebadores específicos correspondientes. Para Bt11: **IVS2-2/PAT-B** con un amplicón de 189 pb; para Mon810: **VW01/VW03** con un amplicón de 170pb; para Bt176 **Cry05/Cry06** con un amplicón de 134pb; para gen invertasa (*inv*) endógeno de maíz **IVR1/IVR2** con un amplicón de 205pb.

### *Testeo de Duplex PCR*

Las PCR en dúplex se llevaron a cabo utilizando los cebadores 35S para detectar presencia de material GM y el par IVR1/IVR2 como control endógeno de maíz. Un resultado positivo debe generar un patrón de dos bandas, una de 195pb que muestra la presencia del promotor 35S y una de 205pb que confirma la presencia de maíz en la muestra.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 25µL, cada tubo conteniendo, 1µL de ADN molde, 1µL del primer 35S-1 [10µM], 1µL del primer 35S-2 [10µM], 1µL del primer IVR1 [10µM], 1µL del primer IVR2 [10µM], 0,2µL Taq polimerasa Fermentas (equivalente a 1U), 0,2µL de solución dNTP's Fermentas (25mM), 2,5µL Buffer KCl (10x), 2,5µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM) y H<sub>2</sub>O mQ c.s.p.. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCRSystem 2400 (Perkin Elmer).

El termociclador fue programado para realizar 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 35 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 30 segundos a 72°C. Por último un ciclo de 7 minutos a 72°C.

### *Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)*

La visualización de los productos de PCR se realizó en geles de poliacrilamida, 7mL de acrilamida-bisacrilamida 6% en tampón TBE 1X (90mM Trisbase, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA pH 8.0), 7µL TEMED, y 70µL de Persulfato de amonio 10%. Los geles se revelaron mediante la técnica de tinción de plata con modificaciones (Sanguinetti, 1994). Luego de la electroforesis los geles fueron incubados por 5 min en solución fijadora (10% etanol y 0,5% ácido acético glacial en H<sub>2</sub>O mRO) con agitación constante, posteriormente 8 min en solución de plata (0,225% AgNO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>O mRO), luego se lavan 2 veces en agua mRO durante aproximadamente 30 segundos y por último se exponen al revelador (3% NaOH; 0,12% formaldehído en H<sub>2</sub>O mRO) hasta que se completa la tinción. Para detener la reacción de teñido y que los geles no se “quemem” se deben colocar nuevamente en la solución fijadora por un par de minutos.

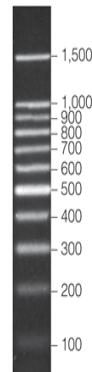
Todos los geles son escaneados y conservados para su posterior análisis en sobres de nylon sellados y guardados a temperatura ambiente.

### Marcadores de Peso Molecular y Buffer de Carga

Para las electroforesis en agarosa se utilizó el marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindIII (Figura 10) y para las electroforesis en gel de poliacrilamida se utilizó un Ladder de 100pb (Figura 11).



**Figura 10:** Patrón de bandas en gel de agarosa 1% generado por el marcador de peso molecular  $\lambda$ /HindIII.



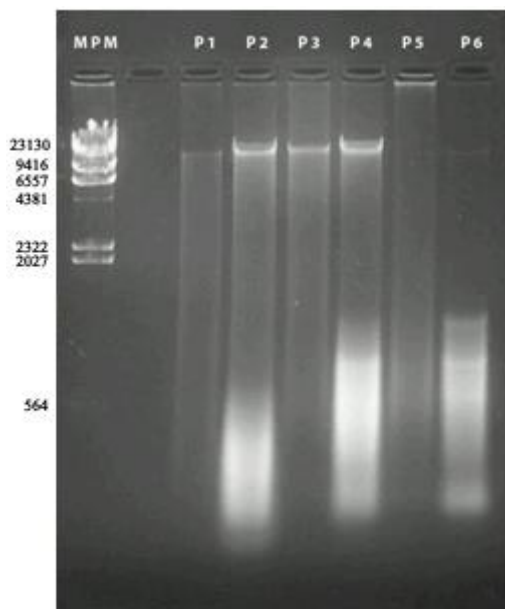
**Figura 11:** Patrón de bandas en gel de agarosa 2% generado por el marcador de peso molecular Ladder 100.

El buffer de carga utilizado tanto para los geles de agarosa como para los de poliacrilamida fue el azul de carga 6x, este está compuesto por 25mg de Azul de Bromofenol (migra junto con fragmentos de 300pb en agarosa 1%), 25mg de Xylene Cyanol (migra junto con fragmentos de 4Kpb en agarosa 1%), 3ml de Glicerol y se lleva hasta volumen final de 10ml con agua destilada.

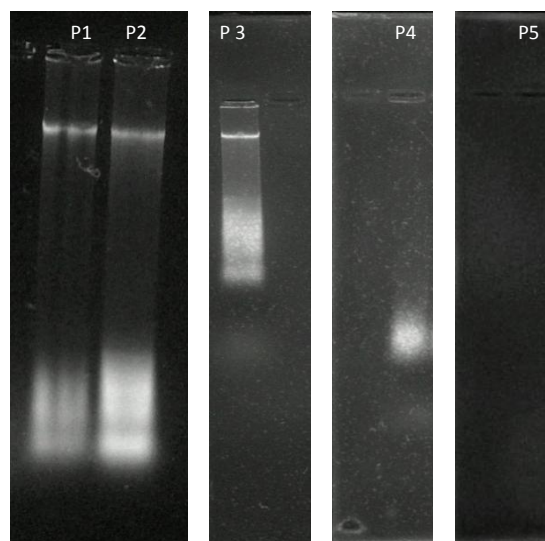
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Puesta a punto

#### Extracciones de ADN



**Figura 12:** Electroforesis en gel de agarosa 1% de la extracción de ADN mediante Kit QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit. MPM ( $\lambda$ Hind III), **P1** (harina de maíz marca Gourmet), **P2** (harina de maíz marca Del Cultivo), **P3** (harina de maíz marca Puritas), **P4** (“Doritos” marca Pepsico), **P5** (cereales de maíz azucarados marca Ricard), **P6** (hojas frescas maíz)



**Figura 13:** Electroforesis en gel de agarosa 1% de la extracción de ADN de las muestras P1 a P5 mediante protocolo Dellaporta et al. **P1:** harina de maíz marca Gorumet, **P2:** harina de maíz marca Del Cultivo, **P3:** harina de maíz marca Puritas, **P4:** “Doritos” marca Pepsico, **P5:** cereales de maíz azucarados marca Ricard.

En las figuras 12 y 13 se observan electroforesis en gel de agarosa 1% y tinción de Bromuro de Etidio para las extracciones de ADN realizadas a las muestras problema, utilizadas para poner a punto las técnicas de trabajo. Se compararon dos estrategias diferentes de extracción de ADN, el método Dellaporta et al utilizado comúnmente para extraer ADN de muestras vegetales (Dellaporta, 1983) y el Kit comercial QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit. En la figura 12 se puede ver como para matrices complejas como son los Doritos y cereales azucarados, el kit de QIAGEN tiene mejores resultados. Sin embargo, para matrices con poco procesamiento como son las harinas de maíz (Araya, 1996), se obtienen resultados similares en ambos métodos de extracción.

Estos resultados son coherentes con los mostrados en la tabla 7 en los que se puede ver como mediante ambos métodos de extracción se obtienen concentraciones finales de ADN similares, si bien el método QIAGEN presenta ADN con relación de  $Abs_{260/280}$  más cercanas al óptimo.

**Tabla 7:** Cuantificación de ADN y estimación de pureza mediante espectrofotometría de las extracciones de ADN para los métodos Dellaporta y QIAGEN.

	Dellaporta			QIAGEN DNeasy Plant Mini Kit		
	Abs 260	Abs 280/Abs 280	[ADN] <sub>ng/μL</sub>	Abs260	Abs 260/Abs 280	[ADN] <sub>ng/μL</sub>
<b>P1</b>	0,078	1,523	780	0,084	1,625	840
<b>P2</b>	0,093	1,201	930	0,112	1,851	1120
<b>P3</b>	0,105	1,308	1050	0,111	1,580	1110

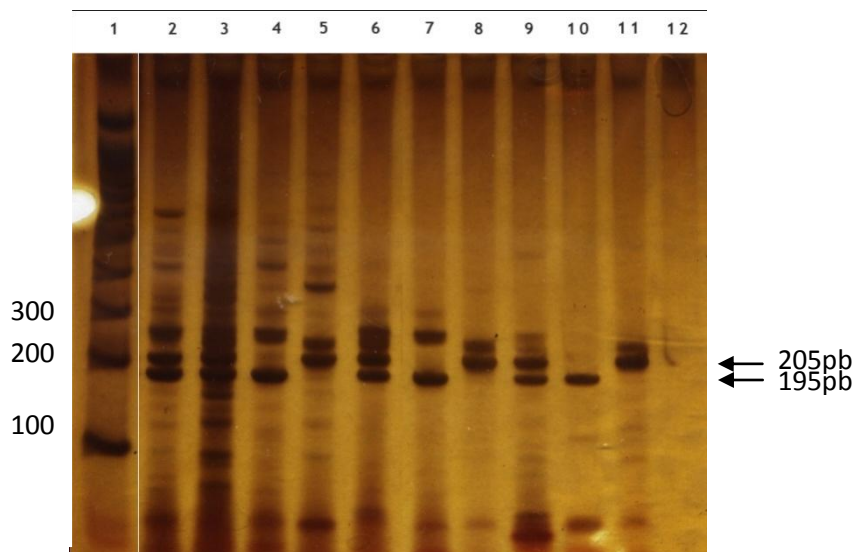
Dado que el objetivo de este trabajo es analizar muestras de harina de maíz, con poco procesamiento y la diferencia de costo entre ambos métodos es importante, se decidió utilizar el protocolo Dellaporta para las extracciones de las muestras enviadas por Bromatología.

Si se quisiese utilizar Dellaporta para obtener mejores resultados en muestras con mayor procesamiento como los cereales azucarados y los Doritos, habría que hacer pruebas agregando al protocolo Dellaporta un paso extra para romper los enlaces formados entre los aminoácidos de las proteínas y los azúcares del ADN durante los procesos de cocción (J. Harrison & R. Dake, 2005), con agentes como el PTB (Di Bernardo, 2008).

En cuanto a las muestras de propoleo de las que no se pudo obtener ADN (no se muestran en las figuras) sería necesario implementar algunos pasos previos a la extracción de ADN para preparar la muestra. Estos pasos deberían incluir el aislar los granos de polen de las ceras que conforman el propoleo. Además agregar un paso de molienda con nitrógeno líquido para romper las paredes de los granos de polen y otro para eliminar los polisacáridos que son potenciales inhibidores de la reacción de PCR (Brodmann, 2008).



### PRUEBA DE PCR DUPLEX CON IVR Y 35S



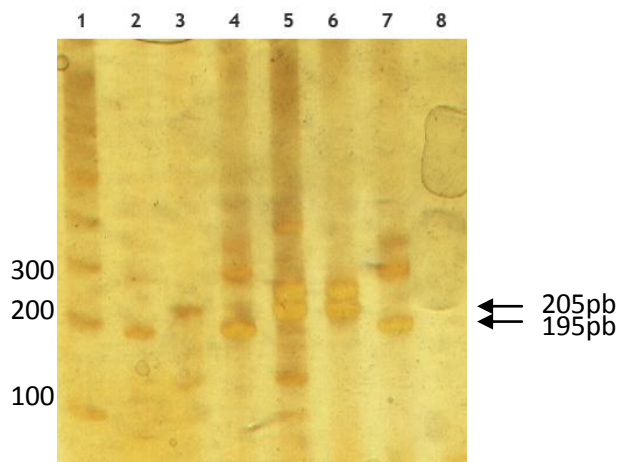
**Figura 14:** Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% de la puesta a punto de PCR multiplex con IVR y 35S para harinas de maíz. 1-MPM 100pb 2- C(+) 35S + IVR 3- P1 35S + IVR 4- P1 35S 5- P1 IVR 6- P2 35S + IVR 7- P2 35S 8- P2 IVR 9- Hoja maíz 35S + IVR 10- Hoja maíz 35S 11- Hoja maíz IVR 12- C(-)

Se muestra en la figura 14 un dúplex PCR con los cebadores 35S e IVR realizada para muestras de harina de maíz (P1 y P2) y hojas frescas de maíz. Se puede observar que los resultados son consistentes entre las amplificaciones simples en donde solo se ve la banda correspondiente a 35S o solo IVR (195pb y 205pb respectivamente) y los dúplex en donde se observan el par de bandas en el mismo carril (carriles 2, 3, 6 y 9).

Si bien el dúplex funcionó correctamente, ya que se pueden diferenciar las muestras donde hay presencia del promotor 35S de las que no, se puede observar la presencia de varias bandas extra de baja intensidad principalmente en los primeros 5 carriles. Las bandas extra de menor intensidad de estos carriles podrían ser atenuadas o eliminadas cargando menos cantidad de muestra en el PAGE ya que las bandas de interés (195pb y 205pb) tienen una intensidad muy superior. En los geles se cargaron 5µl de muestra por lo que perfectamente podrían cargarse 2µl para que las bandas extra se atenúen sin perder las 2 de interés.

También aparecen algunas bandas extra de gran intensidad tanto en los carriles solo IVR (aproximadamente de 210pb) como solo 35S (aproximadamente de 215pb) que también se ven reflejadas en los carriles IVR + 35S donde se ven ambas bandas.

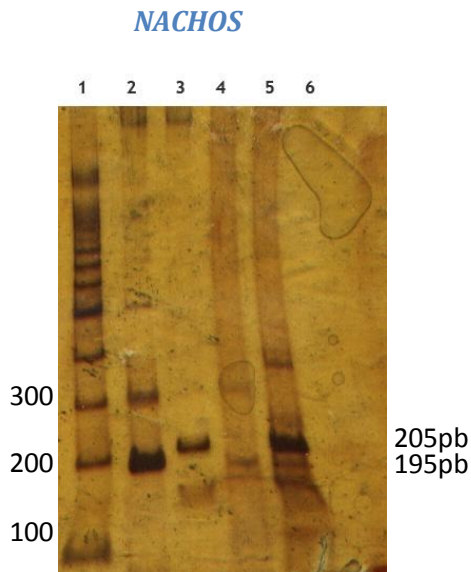
### ANÁLISIS DE MUESTRAS DE POLENTA MEDIANTE PCR



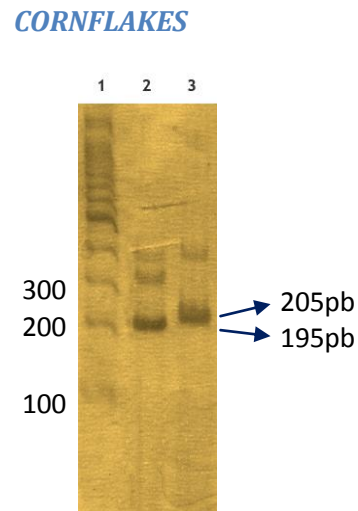
**Figura 15: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6%** de la puesta a punto de PCR para IVR y 35S en harinas de maíz. **1-** L100 **2-** C(+) 35S **3-** C(+) IVR **4-** P1 35S **5-** P1 IVR **6-** P2 IVR **7-** P2 35S **8-** C(-).

En la figura 15 se puede observar un PAGE con el rastreo del promotor 35S para las polentas P1 y P2. Se puede ver en los carriles 4 a 7 las bandas de 195pb y 205pb correspondientes al amplicón de los primers 35S1/35S2 e IVR1/IVR2 respectivamente para las muestras de polenta. Este resultado estaría indicando que en ambas polentas se pudo detectar la presencia del promotor 35S, lo que implica la presencia de material genéticamente modificado en las muestras (Lipp et al, 1999).

Si bien se pueden observar al igual que en el dúplex algunas bandas extra, estas disminuyen considerablemente tanto en cantidad como en intensidad. Las bandas de baja intensidad fueron casi completamente eliminadas cargando menos cantidad del producto de PCR (2µl) en el PAGE. Sin embargo las bandas de 210pb y 215pb siguen apareciendo con gran intensidad.



**Figura 16: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% de la PCR para muestra de "Nachos". 1- L100 2- C(+) 35S 3- C(+) IVR 4- Nacho 35S 5- Nacho IVR 6- C(-)**



**Figura 17: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% de la PCR para muestra de cereales azucarados. 1- L100 2- P5 35S 3- P5 IVR.**

En las figuras 16 y 17 se puede ver como el protocolo de PCR utilizado para detección del promotor 35S en harinas de maíz funciona correctamente para muestras procesadas como lo son los Doritos y los cereales azucarados. En ambas figuras se puede ver una banda de 195pb correspondiente al amplicón producto del par de cebadores 35S-1 y 35S-2 (carril 4 en la figura 16 y carril 2 en la figura 17). Como control de PCR se utilizaron en ambas PCR los cebadores que amplifican el gen *ivr* de maíz, los cuales dan un amplicón de 205pb (carriles 5 y 3 respectivamente).

Tanto en la figura 16 como 17 se pueden ver algunas bandas extra pero de baja intensidad, las cuales, como en el caso anterior, podrían ser eliminadas disminuyendo la cantidad de muestra cargada en el gel. En ninguna de las dos imágenes aparecen las bandas de 210pb y 215pb que se veían para las polentas de los geles 14 y 15, si bien habría que realizar pruebas de BLAST contra alguna base de datos de genes, se podría comenzar a sospechar que tanto IVR como 35S tengan como blanco alguna secuencia de ADN presente en las especias utilizadas como condimentos de las harinas de maíz.

### **Fuentes de contaminación**

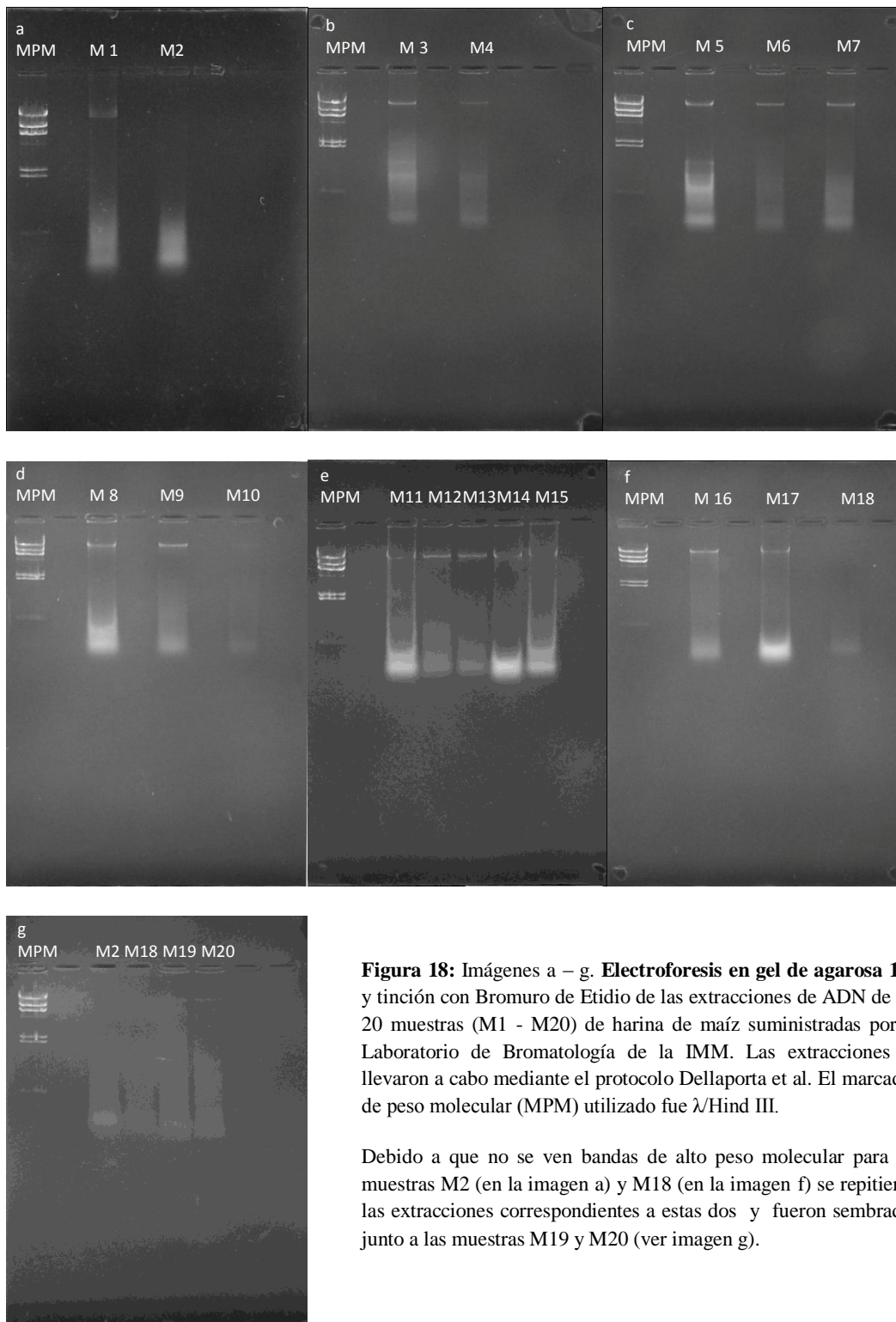
Durante la puesta a punto surgieron problemas de contaminación tanto de las muestras como de los reactivos utilizados. Para eliminar los falsos positivos producto de estas contaminaciones se tuvieron que cambiar los reactivos utilizados por otros nuevos (buffer de extracción, Taq

polimerasa, dNTPs, buffers de PCR, H<sub>2</sub>O mQ) y además se implementó un nuevo protocolo de limpieza de mesadas, morteros y micropipetas que implica la utilización de hipoclorito de sodio, alcohol 70 o 90 y lavados con H<sub>2</sub>O mRO, recomendado por técnicos de la Dupont (Dupont).

El almidón de maíz presente en los guantes (Hinsch, 2009) también fue un foco importante de contaminación durante la manipulación, principalmente durante la preparación de las PCR. Por esta razón se decidió utilizar guantes sin almidón durante los experimentos, lo que redujo considerablemente el número de muestras contaminadas por lo tanto de falsos positivos en los resultados finales.

## Muestras de Bromatología

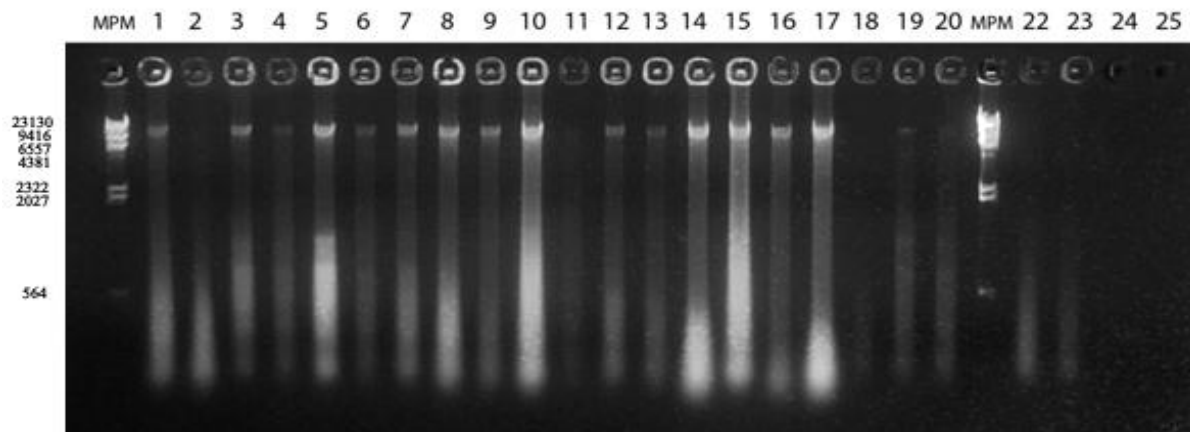
### EXTRACCIONES DE ADN



**Figura 18:** Imágenes a – g. **Electroforesis en gel de agarosa 1%** y tinción con Bromuro de Etidio de las extracciones de ADN de las 20 muestras (M1 - M20) de harina de maíz suministradas por el Laboratorio de Bromatología de la IMM. Las extracciones se llevaron a cabo mediante el protocolo Dellaporta et al. El marcador de peso molecular (MPM) utilizado fue  $\lambda$ /Hind III.

Debido a que no se ven bandas de alto peso molecular para las muestras M2 (en la imagen a) y M18 (en la imagen f) se repitieron las extracciones correspondientes a estas dos y fueron sembradas junto a las muestras M19 y M20 (ver imagen g).

### *Electroforesis en gel de agarosa 1% de las muestras M1 a M20*



**Figura 19:** Electroforesis en gel de agarosa 1% de las muestras M1 a M20 de harina de maíz. Marcador de peso molecular  $\lambda$ Hind III (MPM). Carriles 1 a 20 muestras M1 a M20 respectivamente. Carriles 22 y 23 repetición de la extracción para muestras M2 y M18. Carril 24 control negativo de extracción, carril 25 vacío.

Las figuras 18 y 19 muestran electroforesis en geles de agarosas 1% con tinción de bromuro de etidio para las extracciones realizadas a las polentas M1 a M20. Específicamente en la figura 18 se muestran las extracciones a medida que se fueron realizando mientras que la figura 19 muestra una comparación de los rendimientos de las extracciones de todas las muestras juntas. En todas las muestras (menos M2 y M18) se puede apreciar la presencia de una banda de alto peso molecular lo que indica que se obtuvo ADN de buena calidad para utilizar en las posteriores PCR. Esto confirma que el método Dellaporta, si bien no era óptimo para muestras altamente procesadas como los cereales azucarados o los nachos, funciona correctamente para las harinas de maíz.

Para la muestra M2 como para la muestra M18 se realizaron al menos 3 intentos de extracción de ADN mediante el protocolo Dellaporta como por el kit de QIAGEN sin obtener resultados positivos. En ninguna de las muestras se obtuvo ADN amplificable pese a la repetición de las extracciones.

## ESPECTROFOTOMETRÍA 260/280

**Tabla 8:** medidas de Abs<sub>260</sub>, relación Abs<sub>260/280</sub> y concentración de ácidos nucleicos en ng/μl para las muestras analizadas (M1-M20). Todas las extracciones de ADN fueron realizadas mediante el protocolo Dellaporta et al.

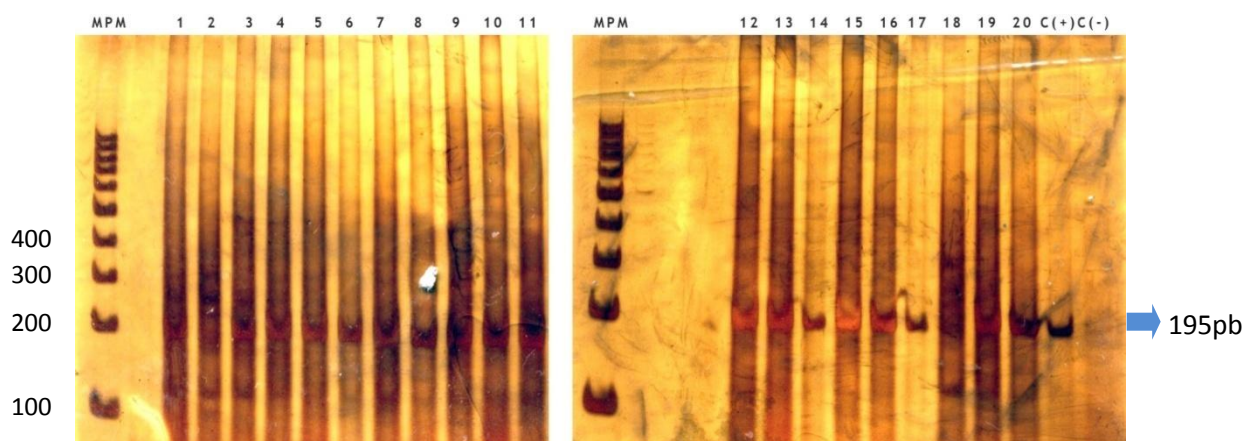
MUESTRA	ABS 260	ABS 280	ABS 260/280	[ADN] ng/μl
M1	0,150	0,105	1,428	750
M2	0,427	0,348	1,227	2135
M3	0,094	0,060	1,572	470
M4	0,128	0,105	1,224	640
M5	0,226	0,149	1,523	1130
M6	0,174	0,149	1,167	870
M7	0,088	0,051	1,726	440
M8	0,293	0,212	1,380	1465
M9	0,204	0,168	1,215	1020
M10	0,378	0,236	1,605	1890
M11	0,179	0,160	1,119	895
M12	0,409	0,356	1,147	2045
M13	0,304	0,236	1,157	1520
M14	0,346	0,216	1,604	1730
M15	0,375	0,226	1,657	1875
M16	0,196	0,150	1,305	980
M17	0,321	0,185	1,730	1605
M18	0,408	0,371	1,100	2040
M19	0,299	0,249	1,201	1495
M20	0,387	0,329	1,174	1935

Si bien las medidas de Abs<sub>260</sub> (Tabla 8) fueron consistentes con los resultados mostrados en las agarosas 1% antes mencionadas, solamente 5 polentas mostraron una relación Abs<sub>260</sub>/Abs<sub>280</sub> dentro del óptimo de pureza (entre 1,6 y 1,8) (Gallagher & Desjardins, 2001). De las restantes, 5 polentas mostraron relación de absorbancia entre 1,3 y 1,6 y el resto de las 20 muestras resultados entre 1,1 y 1,3. De todas maneras, excepto M2 y M18, todas las muestras amplificaron correctamente en las posteriores PCR como se discute a continuación. La relación de Abs<sub>260/280</sub> de la muestra M2 fue 1,227 y la de la muestra M18 fue 1,100. Además mostraron medidas de Abs<sub>260</sub> de 2135ng/μl y 2040ng/μl respectivamente.

Lo descripto en los dos párrafos anteriores no concuerda ni con las imágenes de las agarosas 1% que no muestran rastros de ADN de alto peso molecular en las muestras M2 y M18 ni con la falta de amplificación en las PCR de rastreo e identificación posteriores. Si bien es posible que esta inconsistencia sea debido a errores técnicos en la manipulación durante las extracciones de ADN o durante las medidas de absorbancia, ambos procedimientos fueron repetidos varias

veces, inclusive modificando el método de extracción (para M2 y M18 se probó a utilizar el kit QIAGEN además de Dellaporta), por lo que si bien no se tienen pruebas, no se puede descartar que en esas polentas el ADN estuviese tan degradado que no puedan utilizarse los métodos de detección e identificación usados en este trabajo. Si esta última afirmación fuese real, también justificaría las altas medidas de  $Abs_{260}$  que se observaron en ambas muestras ya que podríamos estar midiendo fragmentos sumamente pequeños de ADN o inclusive bases sueltas en grandes cantidades, sin que esto se refleje en bandas de alto peso en las agarosas ni posteriores resultados positivos durante las PCR.

### **RASTREO 35S PARA LAS 20 MUESTRAS**



**Figura 20:** Rastreo de las 20 muestras de harina de maíz suministradas por el laboratorio de bromatología. El marcador de peso molecular utilizado (MPM) es un ladder de 100pb. La numeración de 1 a 20 corresponde a las 20 muestras. Se puede observar que los únicos dos carriles en los que no se ve banda son los que corresponden a las muestras M2 y M18. El tamaño de amplicón del resto de los carriles corresponde a 195pb, tamaño esperado para el promotor 35S.

Luego de realizadas las extracciones de ADN de todas las muestras se pasó a detectar el promotor 35S en las 20 muestras mediante PCR. Si bien no se habían obtenido bandas de alto peso molecular para las muestras M2 y M18 igual se utilizaron para realizar las PCR de rastreo ya que los amplicones en teoría son lo suficientemente pequeños como para funcionar en matrices con ADN degradado.

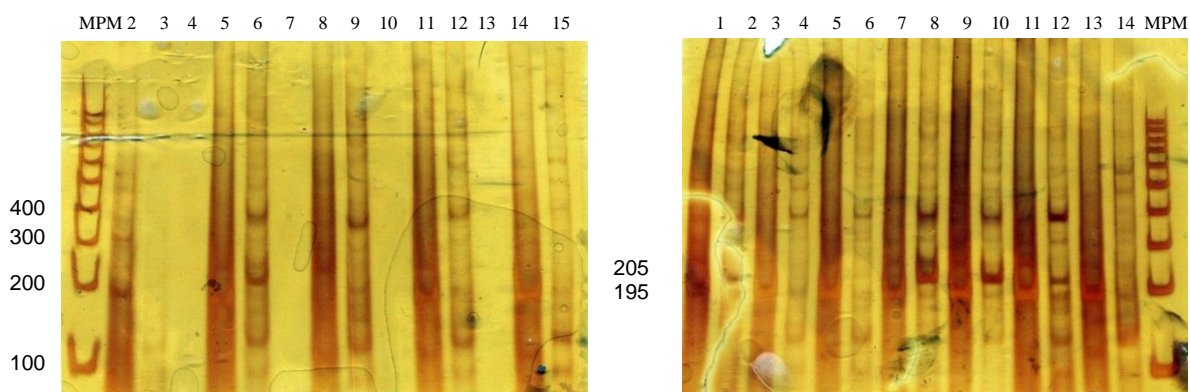
En la figura 20 se puede observar una única corrida en la que se analizaron las 20 muestras más control positivo y control negativo, amplificadas con el par 35S1/35S2. En la imagen se puede ver como en todas las muestras, excepto M2, M18 y control negativo, aparece la banda de 195pb correspondiente al amplicón generado por los cebadores 35S, lo que nos estaría



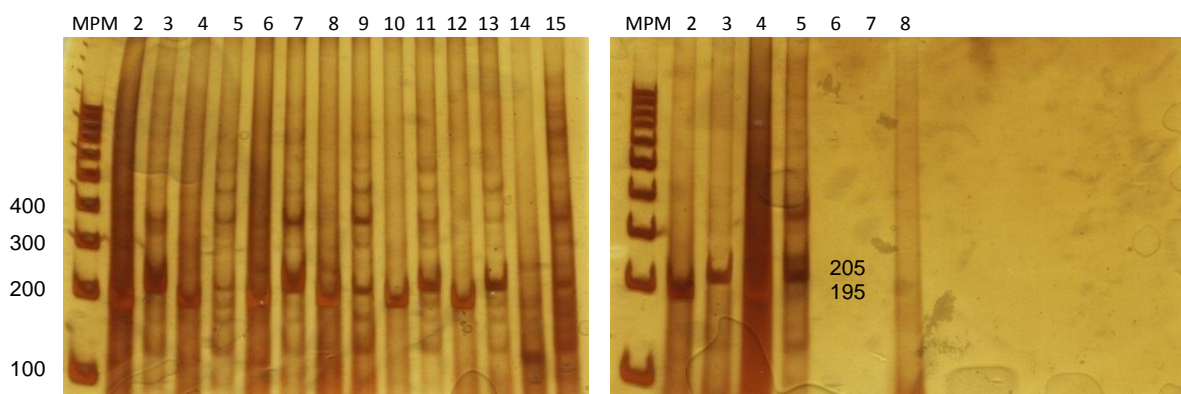
indicando la presencia de material genéticamente modificado en las 18 polentas donde apareció la banda.

De las muestras M2 y M18 no se puede asegurar ni que no contienen material GM ni que lo tienen. En primera medida porque al no aparecer banda podría significar que en esos carriles no funcionó la PCR y en segundo lugar porque podrían contener transgénicos que funcionan con un promotor diferente al 35S (Ahmed, 2001). Además se suma que no se obtuvo en principio ADN de buena calidad durante las extracciones, por lo que a las dos posibilidades anteriores se les suma también los posibles errores de manipulación durante las extracciones de las muestras M2 y M18 o la alta degradación del ADN de esas muestras.

### **RASTREO 35S + IVR PARA LAS MUESTRAS M1 a M20**



**Figura 21: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6%** del rastreo de las muestras M1 a M12 de harina de maíz, suministradas por el laboratorio de bromatología. El marcador de peso molecular utilizado (MPM en ambos geles) es un ladder de 100pb. En el gel de la izquierda: 2: C(+) 35S, 3: C(+) IVR, 4: M13 35S, 5: M13 IVR, 6: M14 35S, 7: M14 IVR, 8: M15 35S, 9: M15 IVR, 10: M16 35S, 11: M16 IVR, 12: M17 35S, 13: M17 IVR, 14: M18 35S, 15: M18 IVR. En el gel de la derecha: 2: M19 35S, 3: M19 IVR, 4: M20 35S, 5: M20 IVR, 6 y 7: ---, 8: C(-).



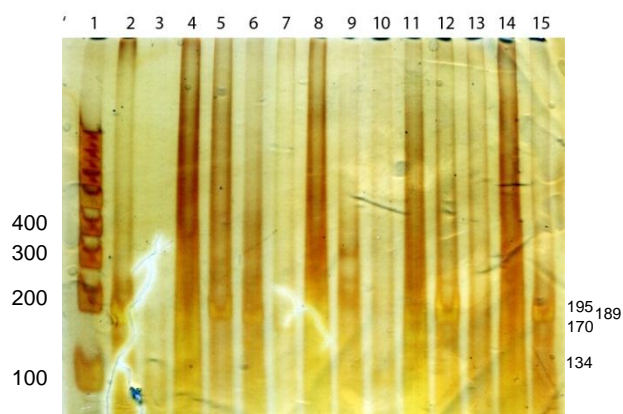
**Figura 22: Electroforesis en gel de poliacrilamida 6%** del rastreo de las muestras M13 a M20 de harina de maíz suministradas por el laboratorio de bromatología. El marcador de peso molecular utilizado (carril 1 en ambos geles) es un ladder de 100pb. En el gel de la izquierda: 2: C(+) 35S, 3: C(+) IVR, 4: M13 35S, 5: M13 IVR, 6: M14 35S, 7: M14 IVR, 8: M15 35S, 9: M15 IVR, 10: M16 35S, 11: M16 IVR, 12: M17 35S, 13: M17 IVR, 14: M18 35S, 15: M18 IVR. En el gel de la derecha: 2: M19 35S, 3: M19 IVR, 4: M20 35S, 5: M20 IVR, 6 y 7: ---, 8: C(-).

En las figuras 21 y 22 se muestra una nueva PCR de rastreo en donde además de usarse los cebadores 35S también se amplifican las 20 muestras con el par IVR que tiene como *target* el gen *ivr* endógeno de maíz. Como en el caso anterior, se puede observar que tanto la muestra M2 como la muestra M18 no amplifican ni para 35S ni para IVR. Además, se puede observar que en varias muestras no amplificó correctamente el gen *ivr*. Esta PCR fue repetida en varias ocasiones con la finalidad de determinar si se mantenían constantes las muestras en las que no se veía producto de amplificación del par IVR, lo cual no fue así.

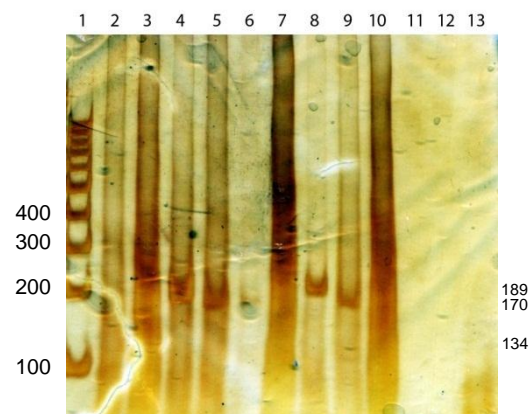
Dada la diferencia entre las  $T_m$  de los cebadores IVR y 35S (10 °C en promedio, ver tabla 6) y que la metodología utilizada trabaja bastante por debajo de la  $T_m$  óptima para los cebadores IVR, es posible que tanto las bandas extra que aparecen en los carriles IVR como la falta de amplificación en varias de las muestras sean producto de una baja especificidad de los *primers* a la temperatura de trabajo. Esto se podría solucionar trabajando en un equipo donde se puedan realizar PCR en gradiente de temperatura y ajustando la  $T_m$  para los tubos con cebadores IVR. Si no es posible conseguir un termociclador con gradiente se deberían realizar rondas separadas de amplificación para los 35S y los IVR cada una con  $T_m$  optimizada para los cebadores utilizados. Otra opción es utilizar un par de cebadores diferente al IVR que amplifiquen otra zona endógena de maíz, como pueden ser el par ZM1-F/ZM1-R que amplifican el gen *hmg* (Monsanto, 2006).

No obstante, la falta de amplificación de las muestras M2 y M18 en todos los casos mostrados hasta el momento, principalmente la falta de amplicón para las corridas realizadas con el par IVR1/IVR2 que amplifica el gen *ivr* endógeno de maíz nos confirman la hipótesis que sea cual sea la razón, no se pudo extraer ADN amplificable de estas muestras.

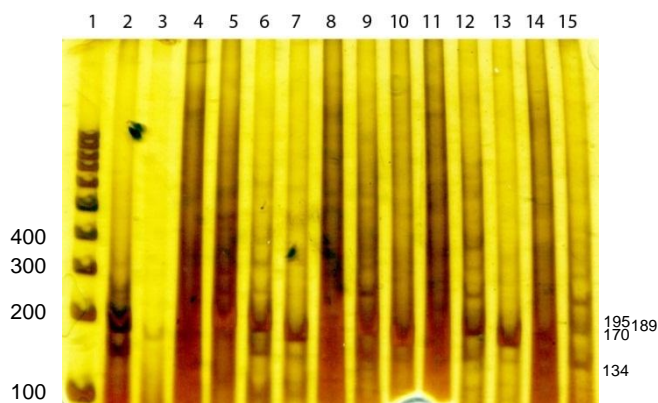
### IDENTIFICACIÓN DE EVENTOS Bt11, Mon810 y Bt176



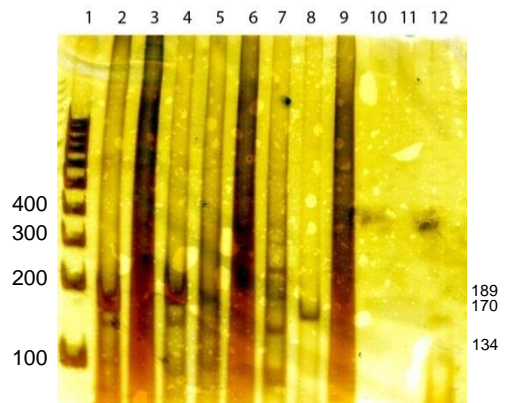
**Figura 23:** Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% de las muestras M1-M4. Carril 1: MPM L100, 2: C(+) Bt11, 3: C(+) Mon810, 4: C(+) Bt176, 5: C(+) 35S, 6: M1 Bt11, 7: M1 Mon810, 8: M1 Bt176, 9: M2 Bt11, 10: M2 Mon810, 11: M2 Bt176, 12: M3 Bt11, 13: M3 Mon810, 14: M3 Bt176, 15: M4 Bt11.



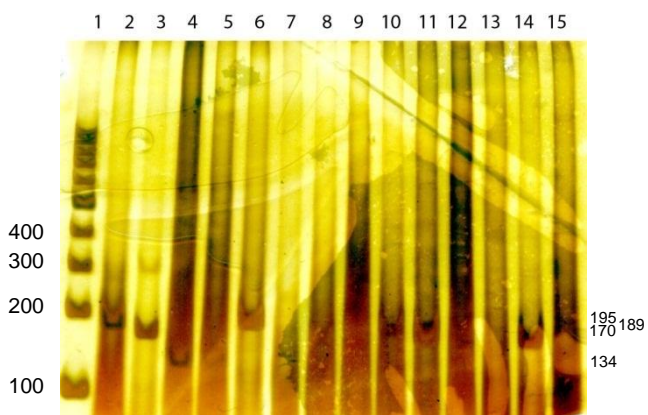
**Figura 24:** Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% de las muestras M4-M6. Carril 1: MPM L100, 2: M4 Mon810, 3: M4 Bt176, 4: M5 Bt11, 5: M5 Mon810, 6: contaminación M5 Mon810, 7: M5 Bt176, 8: M6 Bt11, 9: M6 Mon810, 10: M6 Bt176, 11: ---, 12: ---, 13: C(-).



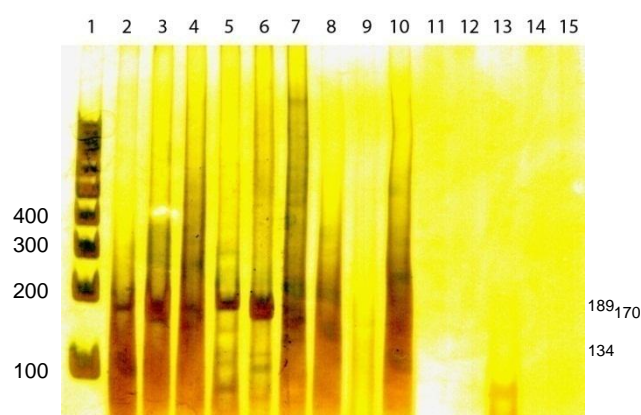
**Figura 25:** Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% de las muestras M7-M10. Carril 1: MPM L100, 2: C(+) Bt11, 3: C(+) Mon810, 4: C(+) Bt176, 5: C(+) 35S, 6: M7 Bt11, 7: M7 Mon810, 8: M7 Bt176, 9: M8 Bt11, 10: M8 Mon810, 11: M8 Bt176, 12: M9 Bt11, 13: M9 Mon810, 14: M9 Bt176, 15: M10Bt11.



**Figura 26:** Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% de las muestras M10-M12. Carril 1: MPM L100, 2: M10 Mon810, 3: M10 Bt176, 4: M11 Bt11, 5: M11 Mon810, 6: M11Bt176, 7: M12 Bt11, 8: M12Mon810, 9: M12Bt176, 10: ---, 11: ---, 12: C(-).



**Figura 27:** Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% de las muestras M13-M15. Carril 1: MPM L100, 2: C(+) Bt11, 3: C(+) Mon810, 4: C(+) Bt176, 5: C(+) Bt176 1/10, 6: C(+) 35S, 7: M13 Bt11, 8: M13 Mon810, 9: M13 Bt176, 10: M14 Bt11, 11: M14 Mon810, 12: M14 Bt176, 13: M15 Bt11, 14: M15 Mon810, 15: M15 Bt176.

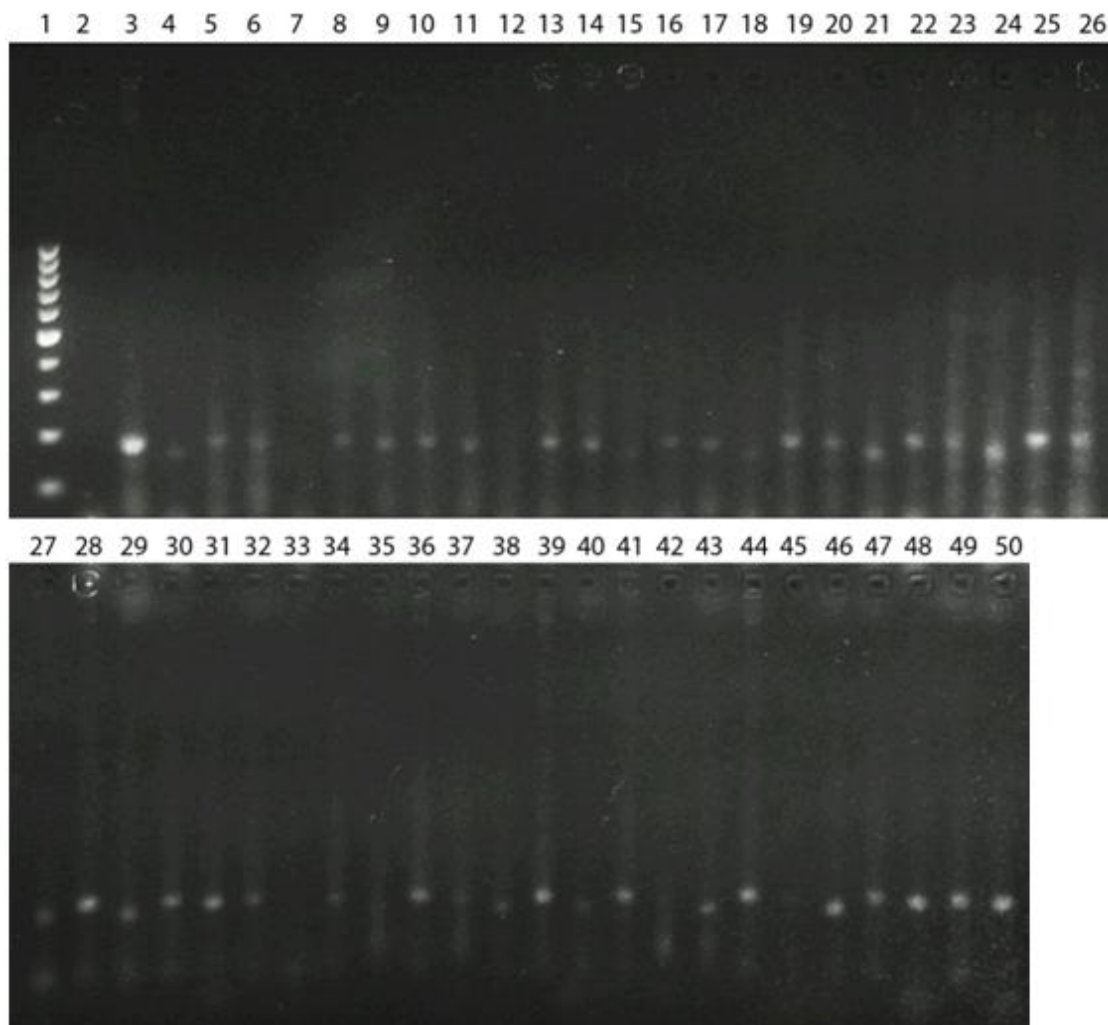


**Figura 28:** Electroforesis en gel de poliacrilamida 6% de las muestras M16-M18. Carril 1: MPM L100, 2: M16Bt11, 3: M16Mon810, 4: M16 Bt176, 5: M17 Bt11, 6: M17Mon810, 7: M17 Bt176, 8: M18Bt11, 9: M18Mon810, 10: M18 Bt176, 11: ---, 12: ---, 13: C(-), 14: ---, 15: ---.

Desde la imagen 23 a la 28 se muestran los geles de poliacrilamida utilizados para revelar las PCR evento específicas de las muestras M1 a M18, el gel correspondiente a las muestras M19 y M20 no se muestra arriba. Se puede observar que ninguna de las muestras dio positiva para el evento Bt176 pero si lo dieron para los eventos Bt11, Mon810 y mezcla de ambos eventos.

Se puede observar que todos los geles están sobreexpuestos, esto se debe a que no se detuvo el proceso de revelado a tiempo. Si bien los geles fueron analizados y los datos colectados mientras se veían correctamente, estos ya se habían oscurecido demasiado a la hora de escanearlos. La solución a este problema es al final del proceso de revelado colocar los geles en un recipiente con la solución fijadora; de esta manera se frena el proceso de oxidación de la plata y el gel deja de oscurecerse.

*Electroforesis en gel de agarosa 2% de las PCR evento específicas para las muestras M1 a M20.*



**Figura 29:** Resultado de las PCR evento específicas visto en una agarosa 2%. Solo se sembraron las muestras que mostraron resultado positivo en acrilamida. 1: Marcador de peso molecular L100, 2: C(+) 35S, 3: C(+) Bt11, 4: C(+) Mon810, 5: M1 35S, 6: M1 Bt11, 7: M1 Mon810, 8: M3 35S, 9: M3 Bt11, 10: M4 35S, 11: M4 Bt11, 12: M4 Mon810, 13: M5 35S, 14: M5 Bt11, 15: M5 Mon810, 16: M6 35S, 17: M6 Bt11, 18: M6 Mon810, 19: M7 35S, 20: M7 Bt11, 21: M7 Mon810, 22: M8 35S, 23: M8 Bt11, 24: M8 Mon810, 25: M9 35S, 26: M9 Bt11, 27: M9 Mon810, 28: M10 35S, 29: M10 Mon810, 30: M11 35S, 31: M11 Bt11, 32: M12 35S, 33: M12 Mon810, 34: M13 35S, 35: M13 Mon810, 36: M14 35S, 37: M14 Bt11, 38: M14 Mon810, 39: M15 35S, 40: M15 Mon810, 41: M16 35S, 42: M16 Bt11, 43: M16 Mon810, 44: M17 35S, 45: M17 Bt11, 46: M17 Mon810, 47: M19 35S, 48: M19 Bt11, 49: M20 35S, 50: M20 Bt11.

Dado el tamaño de los fragmentos analizados, la agarosa 2% de las muestras no llegó a diferenciar bien entre las bandas correspondientes a cada evento. Para mejorar este problema habría que utilizar geles más largos que permitan mayor separación entre fragmentos pequeños. A lo anterior se suman que el tiempo de corrida es mucho mayor en una agarosa 2% que para un PAGE 6% como los utilizados en este trabajo y que hay que utilizar mucho más cantidad de muestra por carril para visualizar correctamente los resultados en agarosa dada la sensibilidad de ambos métodos. Por las razones anteriores, es aconsejable para este tipo de trabajo, utilizar

geles de poliacrilamida con tinción de plata en lugar de agarosa con tinción de bromuro de etidio.

## TABLA DE RESULTADOS

	35-S	Bt11	Mon810	Bt176
M1	+++	+++	+	---
M2	---	---	---	---
M3	+++	+++	---	---
M4	+++	+++	---	---
M5	+++	+++	++	---
M6	+++	+++	++	---
M7	+++	+++	+++	---
M8	+++	+++	+++	---
M9	+++	+++	+++	---
M10	+++	---	+++	---
M11	+++	+++	---	---
M12	+++	---	++	---
M13	+++	---	+++	---
M14	+++	+++	+++	---
M15	+++	---	+++	---
M16	+++	++	+++	---
M17	+++	+++	+++	---
M18	---	---	---	---
M19	+++	+++	---	---
M20	+++	+++	---	---

**Tabla 9:** Resultado del rastreo del promotor 35-S y la identificación de eventos Bt11, Mon810 y Bt176 para las 20 harinas de maíz M1 a M20. El resultado se muestra en una denotación propia en donde se representa la intensidad de la banda obtenida en el gel de poliacrilamida de la siguiente manera: --- sin banda, + banda muy tenue, ++ banda, +++ banda muy intensa. Se puede observar que luego de realizar la PCR no se obtuvieron resultados positivos que muestren la presencia de material GM en las muestras M2 y M18, además no se detectó en ninguna de las 20 muestras el evento Bt176. El resto de las muestras presentan una de las 3 posibles combinaciones de Bt11 y Mon810 (mezcla, solo Bt11 o solo Mon810).

En la tabla 9 se resumen los resultados de la identificación específica para los eventos Bt11, Mon810 y Bt176, más detallados en las imágenes 23 a 29.

Dado que el amplicón correspondiente al evento Bt176 (134pb) no apareció en ninguna de las muestras y que el método utilizado para identificarlo es construcción específica podemos asegurarnos que el evento no se encuentra en ninguna de las muestras, ni siquiera como un apilado o en alguna planta híbrida al menos dentro de los límites de detección de la metodología y las limitantes de la estrategia de muestreo. Podemos entonces centrarnos en el análisis de los resultados de los pares de cebadores utilizados para detectar Bt11 y Mon810.

Como ya se había observado en la introducción, el par de cebadores utilizados para identificar Mon810 (VW01/VW03), son evento específicos, lo cual implicaría en primera instancia que si generan un amplicón en la PCR (170pb), estaríamos frente a una muestra que contiene el evento. Lo que no podemos saber con este análisis es si, la planta o el alimento que se está

analizando contienen material híbrido entre plantas genéticamente modificadas o si es un evento apilado distinto al Mon810 que fue generado por hibridación de eventos GM utilizando como uno de los parentales al Mon810.

Para el caso de los resultados positivos para el par PAT-B/IVS-2, es más complicado aún, ya que estos cebadores son construcción específicos. Esto implica que si luego de la PCR se genera amplicón (189pb) no nos está diciendo que el evento presente es Bt11 sino que puede ser también cualquiera de los eventos apilados que hay en mercado que contienen la construcción Bt11 sea cual sea su método de producción, además de cualquier híbrido que tenga como parental una planta Bt11.

Dicho lo anterior se puede concluir que las 4 muestras cuyos análisis dieron positivos solo para el par VW01/VW03 podrían contener los eventos comerciales Mon810, Mon810 x NK603 (presente en Argentina y Brasil y generado por hibridación de eventos parentales NK603 y Mon810) y cualquier otro híbrido no comercial que tenga como parental una planta Mon810.

En tanto las 5 muestras que dieron positivas para el par PAT-B/IVS-2 podrían contener Bt11, Bt11xGA21 (aprobado en Brasil y Argentina) y cualquier otro híbrido no comercial que tenga como parental una planta Bt11.

Como sabemos que generalmente las harinas de maíz son mezclas de granos de varias chacras estamos frente a la posibilidad que no solo una de las opciones descriptas más arriba sea la correcta, sino que la polenta sea una mezcla de varias de las posibilidades anteriores. Es decir, que las muestras positivas para VW01/VW03 sean una mezcla de Mon810, Mon810 x NK603 y cualquier otro híbrido no comercial que tenga como parental una planta Mon810 y que las muestras positivas para PAT-B/IVS-2 sean una mezcla de Bt11, Bt11xGA21 y cualquier otro híbrido no comercial que tenga como parental una planta Bt11.

En los 9 casos que las muestras dieron positivo tanto para PAT-B/IVS-2 como VW01/VW03 las posibilidades de mezcla son mucho más grandes ya que implicarían las combinaciones de todas las anteriores.

Debido a que para realizar el rastreo de OGMs se utilizó únicamente el promotor 35S, quedaron fuera del análisis todos los eventos de maíz que utilizan promotores diferentes a este. Si bien en Uruguay no hay eventos liberados hasta el momento que contengan otros promotores, si los hay en Argentina y Brasil, ambos países grandes exportadores de alimentos hacia Uruguay. Por lo

tanto quedaron fuera del *screening*, eventos como el GA21 que utiliza el promotor I de actina de arroz y el TC1507 que utiliza el promotor ubiquitina de maíz; entre otros (GMDatabase, 2009).

También es importante destacar que todas las metodologías aplicadas en este trabajo son cualitativas y solamente sirven para confirmar la presencia ausencia de un determinado evento o grupo de eventos. Sería importante poner a punto los análisis cuantitativos de determinación e identificación ya que es la única manera de poder cumplir con los análisis exigidos para realizar exportaciones a mercados como la Unión Europea (ya que se exigen umbrales específicos de presencia). De todas maneras para las necesidades locales basta con poder determinar la presencia o ausencia de material GM en la muestra problema ya que no existen umbrales establecidos por ley.

Es primordial para poder estandarizar y certificar los métodos utilizados el poder acceder a los materiales de referencia de cada uno de los eventos y de maíz no genéticamente modificado. Estos materiales de referencia son sumamente difíciles de conseguir, lo cual dificulta el poder poner a punto las metodologías de análisis.



## CONCLUSIÓN

De las 20 muestras de harina de maíz enviadas por el Laboratorio de Bromatología de la Intendencia de Montevideo se pudo obtener ADN analizable a partir de 18 de ellas mediante el protocolo de extracción Dellaporta. Estas 18 muestras fueron analizadas mediante PCR en busca del promotor 35S presente en todos los eventos transgénicos aprobados hasta el momento en el Uruguay y el resultado fue positivo para todas ellas por lo que se concluye que el 100% de las muestras analizadas están elaboradas al menos en parte por maíz genéticamente modificado.

Posteriormente se pasó a identificar la presencia de los eventos MON810, BT11 y BT176 para las muestras. Los resultados arrojan que el evento BT176 no está presente en ninguna de las muestras pero si lo están el evento MON810 Y BT11. Se encontró el evento MON810 en 13 de las muestras mientras que el BT11 en 14 de ellas (solo MON810 en 4 muestras, solo BT11 en 5 y mezcla en 9 de ellas). Esto indica cómo se discutió antes, no solo la presencia de MON810 y BT11 en las muestras, sino también de varios eventos apilados de los cuales MON810 y BT11 forman parte.

Si el 100% de las harinas de maíz que se analizaron contenían maíz genéticamente modificado, es de esperar que muchos alimentos elaborados a base de maíz como galletas, pan, aceites, raciones animales, entre muchos otros, también lo contengan. Durante la puesta a punto de las metodologías se analizaron nachos y cereales de marcas conocidas y ambos productos también contenían maíz GM.

Si bien hasta la fecha en nuestro país hay aprobados para liberación al ambiente únicamente 3 eventos transgénicos (Bt11, Mon810 y Soja RR) (Tabla 1), ya se encuentran desde el año pasado 5 eventos de maíz en etapa de evaluación agronómica (DAS01507, NK603, NK603xDAS01507, GA21 y GA21xBt11), y se estima que otros tantos entren al mismo proceso este año (Tabla 2). Además, desde la zafra pasada se realizan siembras para reproducción de semilla de soja RR2Y y hay solicitud para realizar reproducción de semilla con soja MON89788 x MON87701 y RR2Y para esta zafra. Esto muestra la necesidad de poner a punto a corto plazo todas las metodologías de trazabilidad para estos eventos.

Estudios realizados sobre interpolinización y dispersión (Emberlin, 1999) (Pleasant, 1999) (Klein, 2003), demuestran que el polen de maíz puede viajar a distancias mayores a 800mts bajo circunstancias climáticas particulares. Dado que la legislación nacional prevee la coexistencia de cultivos GM y no-GM en el territorio es indispensable poner a punto metodologías que permitan detectar contaminación entre chacras. Estas metodologías en conjunto con políticas de control estrictas de las distancias de amortiguación (250 mts de distancia para asegurar un 99%

de aislamiento (Ingram, 2000)) impuestas por DINAMA deberían asegurar la coexistencia de cultivos GM y no GM.

Aunque la legislación de nuestro país no exige el etiquetado transgénico en producto final, es de prever que tanto los productores que trabajan con variedades híbridas no genéticamente modificadas como los que lo hacen con maíces criollos u orgánicos, comiencen a etiquetar sus productos para poder diferenciarlos de los productos transgénicos y de esta manera poder darles cierto valor agregado. Creando la necesidad de tener laboratorios que realicen los análisis y puedan certificar la presencia o ausencia de ingredientes genéticamente modificados en un producto.

Si el país aprueba ser parte del Protocolo de Cartagena, a nivel de importaciones se deberán analizar los cargamentos para constatar que las semillas ingresadas, sea para liberación al ambiente o para consumo humano, animal o pienso, contengan los eventos declarados y no otros diferentes, algo imposible de determinar a simple vista. Además, deberán analizarse los cargamentos que estén declarados como sin contenido de material genéticamente modificado para descartar posibles fraudes o contaminaciones. Sumado a esto, deberán analizarse los cargamentos a exportar para asegurar el cumplimiento de las exigencias impuestas por el importador. Es bien sabido que muchos países de la Unión Europea tienen estrictos controles sobre los alimentos derivados de OGM por lo que es importante asegurar que los productos que se exporten hacia allí cumplan con las normas establecidas.

Esta tesis surge como primera aproximación a la necesidad de poner a punto las técnicas de trazabilidad de OGM en laboratorios nacionales y utilizarlas en muestras reales. Es la primera vez que se analiza un gran número de muestras de alimentos de consumo interno en busca de ingredientes genéticamente modificados con un método reproducible y relativamente barato mediante técnicas de detección de ADN.

Los resultados de los análisis realizados fueron entregados en un informe detallado al Laboratorio de Bromatología. También se presentaron los resultados del trabajo en diferentes foros académicos y del sector productivo, tanto a nivel nacional como extranjero (dos presentaciones en México), siempre obteniendo gran interés por parte del público presente.

Tanto la metodología para detectar presencia/ausencia de material genéticamente modificado (rastreo) como la utilizada para identificar eventos específicos en una matriz, son herramientas de uso común en un laboratorio de biología molecular por lo que es posible utilizar las mismas herramientas de detección de transgénicos pero aplicadas a trazabilidad de especies en muestras

complejas de alimentos. Dada la facilidad de esta transferencia se comenzaron a desarrollar en el laboratorio metodologías de detección específicas basadas en la detección de secuencias de ADN especie específicas en muestras complejas. La finalidad de estos desarrollos es detectar posibles fraudes, contaminaciones o simplemente asegurar al cliente la presencia/ausencia de cierto ingrediente en un alimento. Dentro de esta rama ya se han desarrollado metodologías que diferencian tanto especies animales (básicamente detección de especies animales en chacinados y embutidos) como vegetales (detección de especies en quesos, dulces, salsas, etc), en matrices complejas de alimentos.

Como forma de transferir los conocimientos generados y las herramientas de detección de OGM's y trazabilidad de especies en alimentos, tanto a la comunidad científica como a miembros de organismos de control públicos y privados, el laboratorio ha organizado el curso TraMA (Trazabilidad Molecular en Alimentos), que ya se ha dictado en tres ocasiones y el cual en su última edición además de ser curso de Educación Permanente, también fue PEDECIBA y contó con la presencia de un docente extranjero especializado en el tema.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, F. E. (2001). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, 20 (5), 215-223.
- Akiyama, H., Watanabe, T., Wakabayashi, K., Nakade, S., Yasui, S., Sakata, K., y otros. (2005). Quantitative Detection System for Maize Sample Containing Combined-Trait Genetically Modified Maize. *Analytical Chemistry*, 77 (22), 7421-7428.
- Al-Jowder, O., Defernez, M., Kemsley, E., & Wilson, R. (1999). Mid-Infrared Spectroscopy and Chemometrics for the Authentication of Meat Products. *J. Agric. Food. Chem*, 47, 3210-3218.
- Araya, J. (1996). Producción de Harinas. *Tesis para obtención de título Técnico Universitario en Industria Alimentaria - Universidad de Santiago de Chile*. Chile.
- Ashurst, P., & Dennis, M. (1996). *Food Authentication*. London: Blackie Academic & Professional-Chapman & Hall.
- Asif, M. J., & H. Cannon, C. (2005). DNA Extraction From Processed Wood: A Case Study for the Identification of an Endangered Timber Species (*Gonystylus bancanus*). *Plant Molecular Biology Reporter*, 23, 185-192.
- Bateman, A. J. (1947). Contamination of seed crops II. *Heredity*, 1, 235-246.
- Benech, E. (2009). *Publicación proyecto BCH - DINAMA*.
- Bevan, M. (1983). *Nucleic Acid Research*, 11, 369-385.
- Bonnett, O. T. (1947). Development of the corn kernel. In: Growth and development of the corn plant. *American Seed Trade Association*, 32-36.
- Brodmann, P. (18-19 de Diciembre de 2008). Molecular Biology Methods for Traceability Purposes. Berlin, Alemania.
- CGR. (2009). Comunicación personal.
- CUS, D. &. (2009). Comunicación personal.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (4), 19-21.
- Delta and Pine Land Co., T. U. (1995). *Patente nº 5196525*. US.
- Di Bernardo, G., Del Gaudio, S., Galderisi, U., Cascino, A., & Cipollaro, M. (2008). Comparative Evaluation of Different DNA Extraction Procedures from Food Samples. *Biotechnology Progress*, 23 (2), 297-301.
- Dupont, L. (s.f.).

Emberlin, J., Adams-Groom, B., & Tidmarsh, J. (1999). The dispersal of maize (*Zea mays*) pollen. A report based on evidence available from publications and internet sites. *A report commissioned by the Soil Association: National Pollen Research Unit* .

European Environment Agency. (2002). Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. report 28.

Fast, R. B. (2000). Manufacturing technology of ready-to-eat cereals. En R. B. Fast, & E. F. Caldwell (Edits.), *Breakfast Cereals and How They are Made*. American Association of Cereal Chemist.

Galeano, P., Martinez Debat, C., Ruibal, F., Franco Fraguas, L., & A. Galván, G. (2010). Cross-pollination between transgenic and non-transgenic maize crops in Uruguay. *Environmental Biosafety Research* , Sometido a evaluación.

Gallagher, S. R., & Desjardins, P. R. (2001). *Quantitation of DNA and RNA with Absorption and Fluorescence Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Inc.

GMDatabase. (2009). *AGBIOS*. Obtenido de Agriculture and Biotechnology Strategies Inc.: <http://www.agbios.com>

Griffiths, K., Partis, L., Croan, D., Wang, N., & Emslie, K. R. (2002). *Review of technologies for detecting genetically modified materials in commodities and food*. Australian Government Department of Agriculture Fisheries & Forestry.

Gugerli, F., Parducci, L., & J. Petit, R. (2005). Ancient plant DNA: review and prospects. *New Phytologist* , 166 (2), 409-418.

Hinsch, M. (Septiembre de 2009). Cornstarch Powder and Medical Gloves, a Dire Combination. *Staff Safety* , 94-98.

Holst-Jensen, A., Ronning, S., Lovseth, A., & Berdal, K. (2003). PCR technology for screening and quantification of genetically modified organisms (GMOs). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* , 375 (8), 985-993.

Hurst, C. D., Knight, A., & Bruce, I. (1999). PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Molecular Breeding* , 5, 579-586.

Ingram, J. (2000). *Report on the separation distances required to ensure cross-pollination is below specified limits in non-seed crops of sugar beet, maize and oilseed rape*. MAFF Project No. RG0123.

ISAAA. (2009). *Informe anual*.

J. Harrison, T., & R. Dake, G. (2005). An Expeditious, Hight-Yielding Construction of the Food Aroma Compounds 6-Acetyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine and 2-Acetyl-1pyrroline. *J. Org. Chem* , 70 (26), 10872-10874.

Jones, M. D., & Brooks, J. S. (1950). Effectiveness of distance and border rows in preventing outcrossing in maize. *Oklahoma Agric. Exp. Stn. Bull* , T-38.

- Kay, S., & Van den Eede, G. (2001). The limits of GMO detection. *Nature Biotechnology*, *19*, 405.
- Klein, E. K., Lavigne, C., Foueillassar, X., Gouyon, P.-H., & Larédo, C. (2003). Corn pollen dispersal: Quasi-mechanistic models and field experiments. *Ecological Monographs*, *73* (1), 131-150.
- Krings, M., Stone, A., Schmitz, R., Krainitzki, H., Stoneking, M., & Paabo, S. (1997). Neanderthal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, *90*, 19-30.
- Lipp, M., Brodmann, P., Pietsch, K., Pauwels, J., & Elke, A. (1999). IUPAC Collaborative Trial Study of a Method to Detect Genetically Modified Soy Beans and Maize in Dried Powder. *Journal of AOAC International*, *82*, 923-928.
- Lockley, A. K., & Bardsley, R. G. (2000). DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science & Technology*, *11* (2), 67-77.
- Lumley, I. (1996). *Food Authentication*. London: Blackie Academic & Professional-Chapman & Hall.
- M. Rodríguez, T. García, I. González, L. Asensio, P. Hernández, R. Martín. (1994). PCR Identification of Beef, Sheep, Goat, and Pork in Raw and Heat-Treated Meat Mixtures. *J. Food Protection*, *67*, 172-177.
- Marshall, A. (2009). 13.3 million farmers cultivate GM crops. *Nature biotechnology*, *27* (3), 221.
- Martínez, I., & Yman, M. (1998). Species identification in meat products by RAPD analysis. *Food Research International*, *31*, 459-466.
- Miraglia, M., Berdahl, K. G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E. J., y otros. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, *42*, 1157-1180.
- Monsanto. (1993). *Patente nº 5196525*. US.
- Monsanto. (2006). *CRL assessment on the validation of an event*. Biotechnology & GMOs Unit Institute for Health and Consumer Protection DG Joint Research Centre.
- Patel, T. (1994). Real juice, pure fraud. *New Scientist*, 26-30.
- Paterniani, E., & Stort, A. C. (1974). Effective maize pollen dispersal in the field. *Euphytica*, *23*, 129-134.
- Pleasants, J. M., Hellmich, R. L., & Lewis, L. C. (1999). Pollen deposition on milkweed leaves under natural conditions. *Monarch Butterfly Research Symposium*. Chicago.
- Pöpping, B. (2001). Methods for the detection of genetically modified organisms: Precision, pitfalls and proficiency. *Genetically Modified*, 70-80.
- Protection, Institute for Health & Consumer. (2007). *GMOs Methods Database Report*.

Rogstad H, S., Keane, B., Howes Keiffer, C., Hebard, F., & Sisco, P. (2001). DNA Extraction From Plants: The Use of Pectinase. *Plant Molecular Biology Reporter* , 19, 353-359.

Rossen, L., Norskov, P., Holmstom, K., & Rasmussen, O. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* , 17, 37-45.

SAGPyA & CONABIA. (2009). Marco regulatorio. *Secretaría de Ganadería, Agricultura y Pesca Argentina y Comisión Asesora de Biotecnología*.

Salamov, A. B. (1940). About isolation in corn. *Sel. I. Sem* , 3.

Sanguinetti, C. J., Días Neto, E., & Simpson, A. J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* , 17, 914-921.

Sears, M. K., & Stanley-Horn, D. (2000). Impact of Bt corn pollen on monarch butterfly populations. En C. Fairbairn, G. Scoles, & A. McHughen (Ed.), *6th International Symposium on The Biosafety of Genetically Modified Organisms*. Canada: University Extension Press.

Treu, R., & Emberlin, J. (2000). *Pollen dispersal in the crops Maize (Zea mays), Oil seed rape (Brassica napus ssp oleifera), Potatoes (Solanum tuberosum), Sugar beet (Beta vulgaris ssp vulgaris) and Wheat (Triticum aestivum)*. Soil Association.

Vallejo, B., González, A., Mazorra, M., & Rodríguez, R. (2005). Capillary electrophoresis for the analysis of meat authenticity. *J. Sep. Sci.* , 28, 826-836.

Weatherwax, P. (1955). *Structure and development of reproductive organs. In: Corn and corn improvement* (Vol. III). Sprague, G. F.

Wolf, C., Rentsch, J., & Hubner, P. (1999). PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: a reliable method for species identification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 47, 1350-1355.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Claudio por la confianza que depositó en mí desde el primer día de trabajo y por su paciencia inagotable.

A los compañeros de laboratorio, por haber formado tan buen grupo de colegas y amigos.

A mis padres y hermanos por motivarme y apoyarme siempre a hacer lo que me gusta.

A Chechus, mi esposa y amiga, por los mejores 9 años y medio de mi vida.