

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAGÍSTER EN
BIOTECNOLOGÍA
Programa de Posgrado en Biotecnología - Facultad de Ciencias
Universidad de la República



“Detección y cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados en cultivos de maíz y alimentos derivados, mediante análisis molecular”

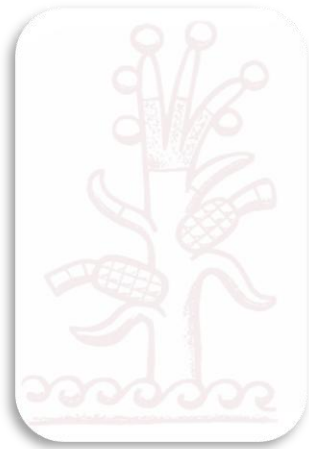
Lic. Mailén Arleo

Orientador: Dr. QF. Claudio Martínez Debat
Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria
Sección Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular

Tribunal:
Dra. Alexandra Castro
Dra. Clara Pritsch
Dr. Omar Borsani

Montevideo, 2015

Universidad de la República - Facultad de Ciencias
Programa de Posgrado en Biotecnología



TESIS DE MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

“Detección y cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados en cultivos de maíz y alimentos derivados, mediante análisis molecular”

Lic. Mailén Arleo

Orientador: Dr. QF. Claudio Martínez Debat

Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria
Sección Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular.

Montevideo, 2015



Agradecimientos

Quisiera agradecer:

∅ A las agencias financiadoras e instituciones que permitieron la realización de esta tesis: Posgrado en Biotecnología, Facultad de Ciencias, Unidad Laboratorio de Bromatología de la Intendencia de Montevideo, CSIC.

∅ Al tribunal por acceder a corregir la tesis, por sus opiniones y buena voluntad.

∅ A las *ladies* del Laboratorio 304, (las que están y las que no) por los consejos, la compañía y los miles de mates compartidos.

∅ A Claudio por permitirme entrar al mundo de LaTraMA, por la enseñanza, la paciencia y la comprensión.

∅ A los compañeros del Laboratorio de Bromatología por haberme recibido tan cálidamente, por la gran disposición y la amistad.

∅ A todos los integrantes de la Sección Bioquímica, por todos estos años compartidos, por su apoyo y gran preocupación.

∅ A la flia por siempre estar ahí... por su interés, por el orgullo y por el aguante durante tantos días y noches de estudio.

∅ A mis amigos del alma y de la Facultad, por siempre darme para adelante y por compartir esta linda etapa de la vida.



Índice

Abreviaturas	1
Lista de Figuras y Tablas	3
Resumen	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 El maíz	11
1.1.1 Origen	11
1.1.2 Taxonomía	12
1.1.3 Biología	13
1.1.4 Importancia	15
1.1.5 Diversidad	15
1.1.6 El maíz en Uruguay	16
1.2 Maíz transgénico	18
1.2.1 Resistencia a insectos	19
1.2.2 Tolerancia a herbicidas	20
1.2.3 Situación del maíz GM a nivel mundial	21
1.2.4 Situación del maíz GM en Uruguay	22
1.3 Marcos regulatorios e institucionales	25
1.3.1 Instrumentos y declaraciones internacionales	26
1.3.1.1 <i>Convenio de Diversidad Biológica</i>	26
1.3.1.2 <i>Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología</i>	26
1.3.1.3 <i>El Codex Alimentarius</i>	27
1.3.1.4 <i>Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales</i> ...	27
1.3.2 Política de Bioseguridad en Uruguay	27
1.3.2.1 <i>Análisis de Riesgos</i>	29
1.4 Flujo de transgenes en variedades de maíz	31
1.4.1 Coexistencia regulada	32
1.4.1.1 <i>Antecedentes en Uruguay</i>	34
1.5 Trazabilidad Alimentaria	35
1.5.1 Alimento transgénico	36
1.5.2 Etiquetado de OGM	36

1.5.2.1 <i>Etiquetado en la Unión Europea</i>	37
1.5.2.2 <i>Etiquetado en Estados Unidos</i>	38
1.5.2.3 <i>Etiquetado en Uruguay</i>	39
1.6 Técnicas de detección de OGM	40
1.6.1 Métodos cualitativos de detección de OGM por PCR	42
1.6.1.1 <i>Estrategia de rastreo (screening) de OGM</i>	43
1.6.1.2 <i>Estrategia específica de gen</i>	44
1.6.1.3 <i>Estrategia específica de construcción</i>	44
1.6.1.4 <i>Estrategia específica de evento</i>	44
1.6.2 Métodos de cuantificación de OGM por PCR en Tiempo Real.....	45
1.6.2.1 <i>Fundamentos de la qPCR</i>	45
1.6.2.2 <i>Sistema de detección por fluorescencia</i>	47
1.6.2.3 <i>Cuantificación de OGM en alimentos</i>	51
1.6.2.4 <i>Consideraciones para la cuantificación de OGM</i>	54
1.6.3 Métodos Validados.....	55
1.6.3.1 <i>Materiales de Referencia Certificados</i>	56
1.6.3.2 <i>Límites de Detección (LOD) y de Cuantificación (LOQ)</i>	57
1.6.4 Nuevos enfoques para la cuantificación de OGM	57
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	60
3. TRABAJOS EXPERIMENTALES	62
Trabajo experimental I: “Flujo de transgenes entre cultivos de maíz en Uruguay”	62
I. Introducción.....	63
II. Materiales y Métodos	64
III. Resultados y Discusión	75
Trabajo experimental II: “Detección de OGM en alimentos derivados de maíz”	88
I. Introducción.....	89
II. Materiales y Métodos	90
III. Resultados y Discusión	104
4. DISCUSIÓN GENERAL	129
4.1 Consideraciones previas al estudio de flujo génico entre cultivos de maíz	129
4.1.1 Detección de transgenes en la descendencia por PCR convencional	130
4.1.2 Estimación de la frecuencia de flujo génico	130
4.1.3 Extracción y amplificación de ADN de un grano de polen	131

4.2 Consideraciones previas a la detección de transgénicos en alimentos	132
4.2.1 Obtención de ADN	134
4.2.2 Puesta a punto del análisis de OGM por PCR en Tiempo Real (<i>SYBR® Green</i>)	134
4.2.2.1 <i>Screening de OGM</i>	134
4.2.2.2 <i>Identificación de eventos específicos de maíz</i>	135
4.2.2.3 <i>Cuantificación del Promotor CaMVp35S</i>	136
4.2.3 Análisis de <i>screening</i> , identificación y cuantificación de OGM en alimentos mediante qPCR – <i>SYBR® Green</i>	137
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	139
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
7. ANEXOS	156



Abreviaturas

Abs: Absorbancia

ADN: Ácido desoxirribonucleico

β -ME: Beta Mercaptoetanol

Bt: *Bacillus thuringiensis*

CaMVp35S: Promotor 35S del Virus del Mosaico del Coliflor

CAI: Comité de Articulación Institucional

CGR: Comisión para la Gestión de Riesgo

CIP: Control Interno Positivo

CIISB: Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología

CNFR: Comisión Nacional de Fomento Rural

CRL-GMFF: Laboratorio Comunitario de Referencia para Alimentos y Piensos Genéticamente Modificados

CSIC: Comisión Sectorial de Investigación Científica

c.s.p.: cantidad suficiente para

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

CUS: Cámara Uruguaya de Semillas

DIEA: Dirección de Estadísticas Agropecuarias

DGSSAA: Dirección General de Servicios Agrícolas

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

EDTA: ácido etildiaminotetraacético

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

ENGL: Red Europea de Laboratorios de OGM

EPSPS: enzima 5-enolpiruvil shikimato-3 fosfato sintetasa

ERB: Evaluación del Riesgo en Bioseguridad

EtOH: Alcohol etílico

FAO: Organización para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FRET: Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia

g (RCF): Fuerza centrífuga relativa

GM: Genéticamente Modificado

GNBio: Gabinete Nacional de Bioseguridad

H20mQ: Agua miliQ

IBPGR: Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos

INASE: Instituto Nacional de Semillas

IRM: Manejo de la Resistencia de Insectos

IRMM: Instituto de Materiales y Medidas de Referencia

ISAAA: Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas

JRC: Centro Común de Investigación de la Comisión Europea

KCl: Cloruro de Potasio
KOH: Hidróxido de potasio
LaTraMA: Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria
LATU: Laboratorio Tecnológico del Uruguay
LB-IM: Laboratorio de Bromatología, Intendencia de Montevideo
MGAP: Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
MGB: Unión al surco menor del ADN
MgCl₂: Cloruro de Magnesio
mM: milimolar (10^{-3} mol/L)
μM: micromolar (10^{-6} mol/L)
% m/m: Porcentaje masa-masa
MRC: Materiales de Referencia Certificados
NaCl: Cloruro de Sodio
ng: nanogramos (1ng= 10^{-9} gramos)
nm: nanometros (1nm= 10^{-9} metros)
no-GM: No Genéticamente Modificado
OECD: Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo
OGM: Organismo Genéticamente Modificado
OMC: Organización mundial del Comercio
ONG: Organización no Gubernamental
OVGM: Organismo Vivo Genéticamente Modificado
PAT: Enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa
p35S: promotor 35S
pb: pares de bases
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR: PCR en Tiempo Real
RNLD-OGM: Red Nacional de Laboratorios de Detección, Identificación y Cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados (México)
REDES-AT: REDES Amigos de la Tierra
RFU: Unidad relativa de fluorescencia
SDS: dodecilsulfato sódico
SNP: Polimorfismo de un único nucleótido
Taq: ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*
TE: Solución tampón compuesto por Tris y EDTA
t-Nos: Terminador de la *nopalina sintasa (nos)* de *Agrobacterium tumefaciens*
Tris-HCl: clorhidrato de tris (hidroximetil) aminometano
Tween-20: Polioxietilen 20 sorbitan monolaurato
U: Unidad de actividad
UdelaR: Universidad de la República
UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México
UPOV: Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales

Lista de Figuras

Figura 1. Gráfico de distribución del área sembrada con OVG, por cultivo.	8
Figura 2. Situación mundial de los cultivos transgénicos en el año 2013.....	9
Figura 3. Secuencia morfológica de la posible evolución de la mazorca del teocintle hacia la mazorca del maíz.....	12
Figura 4. Descripción biológica del maíz.	14
Figura 5. Tecnología Bt.....	20
Figura 6. Esquema de la inhibición de la enzima endógena EPSPS por el glifosato y ruta alternativa de la enzima EPSPS* transgénica.....	21
Figura 7. Representación de las construcciones de los eventos de maíz aprobados en Uruguay, MON810, Bt11, NK603, TC1507, GA21, MON89034 y Mir162.	24
Figura 8. Organigrama institucional de Bioseguridad de OGM en Uruguay.....	30
Figura 9. Proceso de detección de OGM en alimentos.....	42
Figura 10. Representación esquemática de un evento transgénico tipo	43
Figura 11. Esquema de las diferentes etapas de la detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real.....	46
Figura 12. Detección de productos de amplificación mediante agentes intercalantes fluorescentes (<i>SYBR® Green</i>).....	47
Figura 13. Curva de disociación (<i>Melt curve</i>).....	48
Figura 14. Sondas de hibridación. Principios de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET).....	49
Figura 15. Funcionamiento de las Sondas <i>TaqMan®</i>	50
Figura 16. Principios de las sondas unidas a MGB.	51
Figura 17. Aislamiento de granos de polen	72
Figura 18. Representación gráfica del caso 1 " <i>flujo de transgenes</i> ".....	78
Figura 19. Representación gráfica del caso 3 " <i>flujo de transgenes</i> "	79
Figura 20. Representación gráfica del caso 10 " <i>flujo de transgenes</i> ".....	80
Figura 21. Representación gráfica del caso 12 " <i>flujo de transgenes</i> ".....	81
Figura 22. Visualización de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación de una región del gen de la invertasa de maíz (225pb) sobre el ADN extraído de polen.....	85
Figura 23. Visualización de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del promotor 35S (82pb) y el evento específico MON810 (170p).....	86

Figura 24. Esquema metodológico utilizado para la detección, identificación y cuantificación de OGM en materias primas y alimentos.....	90
Figura 25. Captura de pantalla del Programa del equipo ABI 7500 PCR System (<i>Applied Biosystems</i>), para la amplificación de secuencias blanco utilizando <i>SYBR® Green</i>	96
Figura 26. Curvas de disociación obtenidas con los cebadores CaMVp35S F/R y t-Nos F/R.	105
Figura 27. Análisis de sensibilidad para la detección del promotor 35S y del terminador <i>t-Nos</i>	106
Figura 28. Curva de disociación obtenida tras la amplificación de eventos específicos utilizando los MRC (GM).	110
Figura 29. Porcentajes de los eventos específicos presentes en los alimentos estudiados.....	121

Lista de Tablas

Tabla 1. Área sembrada, producción y rendimiento del cultivo de maíz, por año agrícola (Datos del 2005 al 2012).....	17
Tabla 2. Exportaciones de maíz por año, en toneladas (Datos 2005 - 2012)	18
Tabla 3. Eventos de maíz GM autorizados para producción, uso comercial, consumo directo y procesamiento en Uruguay.....	23
Tabla 4. Cálculo del contenido de OGM de una muestra de alimento.....	53
Tabla 5. Cebadores utilizados para la detección del gen de maíz <i>hmga</i> , el promotor 35S y del terminador <i>nos</i> por PCR.....	68
Tabla 6. Cebadores utilizados para la identificación de los eventos de maíz MON810 y Bt11. .	69
Tabla 7. Cebadores utilizados para la detección de ADN de polen de maíz.....	71
Tabla 8. Condiciones generales de los cuatro protocolos descritos para la extracción de ADN de un grano de polen.	74
Tabla 9. Análisis de la progenie de los cultivos no-GM y estimación de la frecuencia de interpolinización mínima observada.....	77
Tabla 10. Cebadores utilizados para la detección del gen <i>hmga</i> de maíz.	93
Tabla 11. Secuencias génicas presentes en los eventos de maíz autorizados en Uruguay.	94
Tabla 12. Cebadores utilizados para la identificación de los eventos de maíz MON810, Bt11, GA21, TC1507, Bt176.	99
Tabla 13. Ensayo de especificidad y selectividad para el juego de cebadores CaMVp35S F/R y t-Nos F/R.	105

Tabla 14. Ensayo de sensibilidad y límite de detección para los cebadores CaMVp35S F/R y t-Nos F/R.....	107
Tabla 15. Ensayo de especificidad y selectividad para los cebadores utilizados en la detección de eventos específicos de maíz.....	109
Tabla 16. Ensayo de sensibilidad y límite de detección de la identificación evento específica..	111
Tabla 17. Eficiencias de las reacciones obtenidas para la cuantificación de OGM por qPCR...	112
Tabla 18. Resultados del análisis de <i>screening</i> de OGM y de la identificación de eventos específicos en muestras de alimentos derivados de maíz, mediante qPCR (<i>SYBR® Green</i>).	115
Tabla 19. Resultados del análisis de <i>screening</i> de OGM en muestras de alimentos, utilizando el kit comercial.....	118
Tabla 20. Resultado de la cuantificación de OGM mediante qPCR utilizando el kit comercial	123
Tabla 21. Resultado de la cuantificación de OGM en muestras de alimentos mediante qPCR utilizando el agente intercalante <i>SYBR® Green</i>	125
Tabla 22. Resultado del análisis de 51 muestras de alimentos elaborados a base de maíz.....	127



Resumen

En Uruguay, el uso de “organismos vivos y sus partes genéticamente modificadas (GM)” se encuentra regulado por normas específicas establecidas en el Decreto 353/08. El mismo promueve la política de coexistencia regulada entre variedades GM y no-GM, fijando distancias de aislamiento de al menos 250 metros entre los cultivos. A la vez, el Decreto nacional promueve acciones tendientes a la implementación voluntaria del etiquetado “GM” o “no GM” en los alimentos. Recientemente en Montevideo, comenzó a regir el Decreto Departamental Nº 34.901, el cual establece la obligatoriedad del etiquetado de los alimentos que contienen material transgénico en porcentajes mayores al 1%. Teniendo en cuenta la situación actual respecto al uso de los vegetales GM en Uruguay, resulta imprescindible contar con herramientas analíticas capaces de asegurar el cumplimiento de la reglamentación, ya sea a nivel de los cultivos en el campo, como a nivel de los alimentos en el mercado. En el presente trabajo se emplearon técnicas moleculares basadas en el estudio de ADN, para evaluar la ocurrencia y la frecuencia del flujo de transgenes entre los cultivos de maíz en Uruguay; y a la vez, se pusieron a punto técnicas novedosas de PCR en Tiempo Real (*SYBR® Green*) para detectar, identificar y cuantificar el contenido de material GM en alimentos derivados del maíz.

Los resultados de este trabajo mostraron que el flujo de transgenes entre cultivos de maíz GM y no-GM ocurre a distancias de 420 metros y en frecuencias de hasta 5%. Esta información podría contribuir a redefinir las distancias de aislamiento para asegurar umbrales de presencia accidental de transgenes, por debajo del 1% establecido para el etiquetado de OGM en productos derivados de maíz. Por otro lado, se logró estandarizar una metodología que permite rastrear e identificar a los eventos de maíz autorizados en Uruguay, y cuantificar de manera rápida y eficaz su contenido en los alimentos. Esta cuantificación basada en la detección del promotor *CaMVp35S* y su normalización con el gen de referencia *hmgA*, fue utilizada para analizar 51 productos de maíz del mercado local e internacional. A partir del análisis se encontró que 62,7% de los productos presentaron secuencias transgénicas, y 35,3% lo hizo en porcentajes mayores al límite umbral para el etiquetado “GM” en Montevideo. Este trabajo resulta innovador respecto al uso de metodologías de detección y cuantificación de OGM por qPCR en Uruguay, representando el primer estudio de cuantificación de OGM en alimentos del país.

Introducción

Los vegetales que hoy se cultivan en el mundo son distintos de sus antepasados silvestres, debido a que el hombre ha modificado y seleccionado sus características a lo largo de más de diez mil años. Inicialmente, el mejoramiento de los cultivos se realizaba de forma intuitiva basándose en la experiencia que dejaba año tras año, cada cosecha. Mediante la siembra y la selección de semillas el número de especies cultivadas se amplió considerablemente, logrando variedades adaptadas a las condiciones locales, a las necesidades y a las costumbres de cada zona y de cada pueblo. Con el tiempo, el desarrollo del conocimiento humano permitió perfeccionar y automatizar la agricultura. Actualmente, la ciencia moderna mediante el uso de la biotecnología, ofrece nuevos métodos para obtener un mayor número de variedades en menor tiempo y con resultados a corto plazo ^[1].

La **biotecnología** se define como toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos ^[2]. La misma, en su versión más moderna, utiliza técnicas de ingeniería genética para identificar, aislar, modificar y transferir genes de un organismo a otro, con el fin de conferirle a este último, alguna característica de interés. La aplicación de la ingeniería genética para el mejoramiento de los cultivos se conoce como biotecnología agrícola o **agrobiotecnología**. Sin duda el gran impacto de la agrobiotecnología y su consecuente repercusión social, se ha debido a la producción de plantas genéticamente modificadas (GM), o transgénicas. La tasa de aceptación de cultivos transgénicos es una de las más altas en cuanto a la adopción de nuevas tecnologías en el sector agropecuario, a nivel mundial ^[3].

Según el último informe del Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA), en el año 2013 más de 18 millones de agricultores en 27 países, plantaron cultivos transgénicos. Esto significó a nivel global, un incremento del 3% (5 millones de hectáreas) de la siembra de cultivos genéticamente modificados respecto al año anterior. Desde la introducción del primer Organismo Vegetal Genéticamente Modificado (OVGM) en el año 1996, la adopción de estos cultivos se ha

ampliado considerablemente pasando de 1,7 millones de hectáreas sembradas, a más de 175 millones de hectáreas en el año 2013 ^[4].

Del total de las 175 millones de hectáreas sembradas con cultivos GM, alrededor del 48% fueron cultivadas con variedades transgénicas de soja, 33% con maíz, 14% con algodón y 5% con canola (Figura 1, *Izquierda*). Estas áreas significaron elevados porcentajes del área total (GM y no-GM) para cada cultivo (Figura 1, *Derecha*). También se sembraron, aunque en áreas más pequeñas, variedades transgénicas de alfalfa, papaya, zapallo, álamo, clavel y remolacha azucarera ^[5].

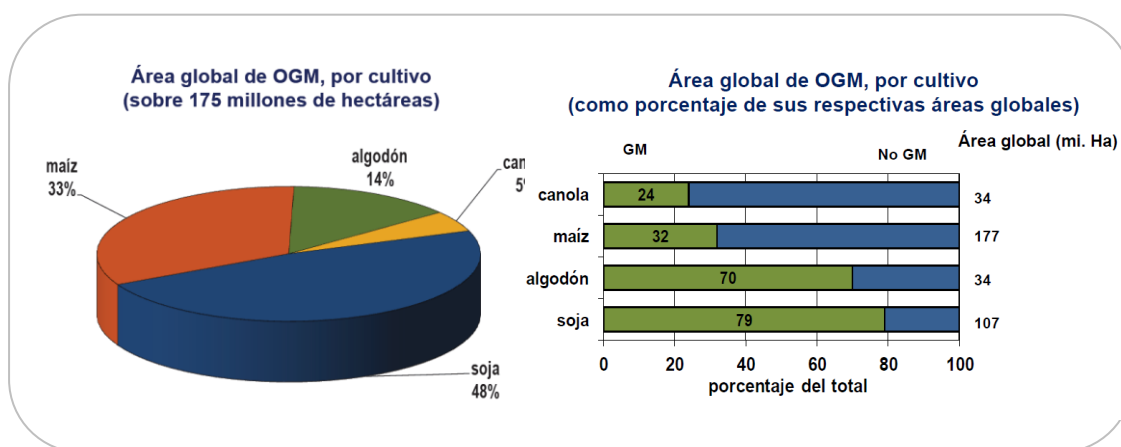


Figura 1. Gráfico de distribución del área sembrada con OVG, por cultivo. *Izquierda*: Área global sobre el total de hectáreas sembradas. El 48% de las hectáreas sembradas con OVG corresponden a soja, el 33% a maíz, el 14% a algodón y el 5% a canola. ***Derecha*:** Área global como porcentaje de sus áreas totales. A nivel mundial el 79% de la soja sembrada fue transgénica, lo mismo ocurrió con el 32% del maíz, el 70% del algodón y el 24% de la canola. Tomado y modificado de ^[5].

Los cinco países que lideraron el mercado de los cultivos transgénicos en el 2013, incluyeron a: EE.UU, con un área sembrada de transgénicos que alcanzó las 70 millones de hectáreas; seguido por Brasil con 40 millones de hectáreas, Argentina con 24,9 millones, India con 11 millones y Canadá con 10,8 millones de hectáreas. Mientras tanto, Uruguay se mantuvo como el décimo país productor de OVG, con un área sembrada de 1,5 millones de hectáreas de variedades de maíz y soja GM (Figura 2) ^[6].

El avance de la agrobiotecnología no se detiene y cada vez más, las compañías de semillas y las instituciones de investigación a nivel mundial, trabajan para ofrecer nuevas variedades con las promesas de producir cosechas de mayor rendimiento y alimentos de mejor calidad en el marco de una agricultura sostenible ^[7]. Pronto, se liberarán nuevas especies de plantas genéticamente modificadas y la sociedad deberá ser capaz de tomar

decisiones de manera objetiva y bien informada, sobre si adoptar o no estas nuevas tecnologías [8].

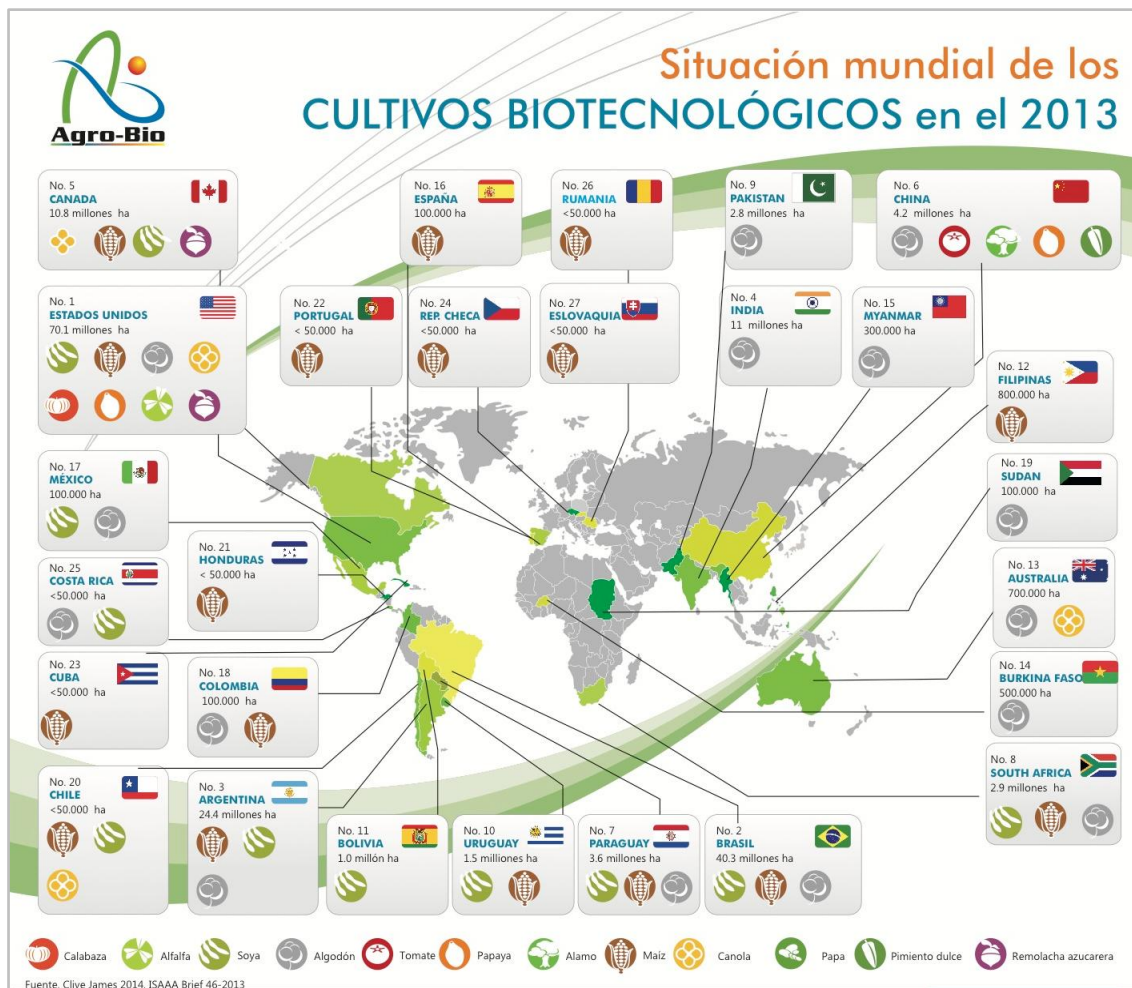


Figura 2. Situación mundial de los cultivos transgénicos en el año 2013. Los países que encabezan la producción de cultivos GM en el mundo, superando el millón de hectáreas sembradas incluyen a: EEUU, Brasil, Argentina, India, Canadá, China, Paraguay, Sudáfrica, Pakistán, Uruguay y Bolivia. Los cultivos genéticamente modificados corresponden a: Soja, maíz, algodón, canola, alfalfa, papaya, zapallo, álamo, clavel y remolacha azucarera. Tomado de [6].

En la actualidad, existen incertidumbres sobre los riesgos y beneficios asociados a la biotecnología agrícola. Resulta importante evaluar la probabilidad y las consecuencias de los riesgos que esta puede generar y compararlos con los beneficios potenciales y reales. El análisis de riesgos debe ser un proceso continuo para ésta y otras tecnologías, incluso para las que han estado implementándose desde hace décadas [9].

Se han expresado inquietudes acerca de los efectos potenciales de la introducción de transgénicos en la diversidad genética de las variedades de cultivos, ya que esta

diversidad se considera esencial para la seguridad alimentaria mundial. Los efectos directos sobre especies no blanco y la posibilidad de transferir involuntariamente características de importancia ecológica en las variedades criollas, también han sido fuentes de preocupación. El potencial flujo de transgenes entre los cultivos parece acarrear diferentes consecuencias ecológicas, económicas y políticas respecto al uso de esta tecnología ^[10]. Sin duda, se hace necesario el uso de la investigación para comprender cuáles podrían ser las consecuencias de estos fenómenos.

Con el fin de preservar el derecho a la elección del consumo de alimentos transgénicos y para responder al principio de precaución ante esta tecnología, ciertos países han promulgado medidas legales para regular el etiquetado de alimentos que contienen Organismos Genéticamente Modificados (OGM), o deriven de los mismos. Para garantizar el cumplimiento de las reglamentaciones, resulta necesario disponer de sistemas de trazabilidad que permitan detectar la presencia o ausencia de OGM, a lo largo de toda la cadena de producción y distribución ^[11]. No obstante, el seguimiento de los OGM desde la producción hasta la última etapa de elaboración del producto final, resulta difícil y muy costoso, por lo que se recurre a análisis de presencia/ausencia en los productos destinados a la venta. Para ello, se utilizan métodos biotecnológicos que permiten abordar en forma rápida y eficaz la detección, identificación y cuantificación de OGM.

El presente trabajo aborda dos temáticas distintas que se asocian al uso de la biotecnología agrícola del maíz en Uruguay: el flujo de genes entre cultivos genéticamente modificados (GM) y no-genéticamente modificados (no-GM), y el desarrollo de métodos para la detección de transgénicos en productos alimenticios de consumo masivo.

El trabajo experimental I, se centra en el estudio de la existencia de flujo génico entre cultivos de maíz GM y no-GM en Uruguay, por representar a una de las especies transgénicas mayormente cultivadas en el país.

El trabajo experimental II, se basa en la estandarización de un protocolo para detectar, identificar y cuantificar de manera sencilla y eficaz, la cantidad de maíz GM presente en matrices alimentarias complejas comercializadas en el mercado local e internacional.

1.1 El maíz

1.1.1 Origen

El maíz surgió aproximadamente entre los años 8000 y 6000 AC. en Mesoamérica, (México y Guatemala), probablemente a lo largo del acantilado occidental del Centro o Sur de México, a 500km de la Ciudad de México. El ecosistema que dio origen al maíz era estacional, inviernos secos alternados con veranos lluviosos, sobre una región montañosa de 1500 metros de altura respecto del nivel del mar, con pendientes pronunciadas de roca caliza ^[12].

Se han postulado varias hipótesis para explicar cómo se originó el maíz que se cultiva actualmente. La teoría más influyente durante años, fue la teoría tripartita postulada por Paul Mangelsdorf y R. Reeves en la década de 1930 ^[13,14]. La misma estableció que las razas modernas de maíz se originaron a partir de varias rondas de cruza entre distintos miembros ancestrales. Primeramente, un maíz silvestre extinto se cruzó con un miembro *Tripsacum* para dar origen al teocintle; luego, posteriores cruza del teocintle con el maíz silvestre extinto, dio origen a la raza moderna. Esta teoría fue desacreditada hacia finales de los años 80s, junto a la hipótesis de Beadle (1986) quien postuló que el maíz surgió de la descendencia del teocintle junto a la domesticación por selección del hombre ^[15]. Beadle observó que a pesar de las diferencias morfológicas entre el maíz y el teocintle, ambos podían tener progenie fértil y se cruzaban de forma natural en el campo. Siguiendo esta corriente, en el año 1990 John Doebley investigó sobre las relaciones filogenéticas de las especies del género *Zea*, logrando corroborar en base a estudios moleculares, la teoría del teocintle como ancestro del maíz ^[16-18]. Varios trabajos se han enfocado en el estudio de los mecanismos genéticos que podrían estar involucrados en la transformación específica del teocintle al maíz, entre los siete y nueve mil años en los que se estima que sucedió la domesticación ^[19,20]. Finalmente, luego de 70 años de confrontación e intercambio de ideas con relación al origen del maíz, se ha llegado al consenso de que el teocintle es el ancestro silvestre (Figura 3) ^[21].



Figura 3. Secuencia morfológica de la posible evolución de la mazorca del teocintle hacia la mazorca del maíz. El registro fósil de los restos más antiguos del maíz encontrados en diversas partes de México, demuestran un gran cambio morfológico desde la pequeña espiga femenina (“mazorquita”) del teocintle, con unos cuantos granos de fácil dispersión y la espiga femenina (mazorca) del maíz, con una gran cantidad de granos fuertemente adheridos al “olote” (raquis). Aunque hay una evidente discontinuidad entre la morfología de la espiga femenina del teocintle y el maíz, el análisis de estructuras intermedias que se producen en su progenie, sugieren diferentes interpretaciones del origen del maíz. Tomado de ^[21].

Se piensa que los principales factores involucrados en la evolución inicial del maíz, fueron probablemente un alto grado de mutaciones y una liberación parcial de la presión de selección natural, como consecuencia de la intervención del hombre. La domesticación del maíz a través de la selección, resultó en una especie totalmente dependiente del hombre, debido a que la transformación eliminó ciertas características ancestrales de sobrevivencia en la naturaleza, tales como los mecanismos de dispersión y latencia de las semillas, así como algunas de las estrategias de defensa contra enemigos naturales ^[22].

1.1.2 Taxonomía

Familia: Poaceae

Subfamilia: Panicoideae

Tribu: Maydeae

Genero: *Zea*

Especie: *Zea mays* L.

Subespecie: *mays*.

De acuerdo con la clasificación efectuada por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD), el maíz pertenece a la familia de las Poáceas (Gramíneas), tribu Maydeas, género *Zea*, especie *Zea mays* L., subespecie *mays*, y es la única especie cultivada de este género. Su pariente silvestre más cercano, el teocintle, pertenece a la especie *Zea mays*, subespecies *parviglumis* y *mexicana* ^[23].

Actualmente se considera que existen en el continente americano, aproximadamente 350 razas de maíz y miles de variedades adaptadas a los más diversos ambientes ecológicos y preferencias de sus cultivadores ^[24]. Entre los países con mayor número de razas de maíz se encuentra a Perú con 52, Argentina con 43, México con 41 y Bolivia con 40 ^[25]. La Colección de maíz de Uruguay alcanza las 10 razas (852 accesiones), que fueron clasificadas mediante taxonomía numérica en el año 1978, en el marco de un proyecto del *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR). Las mismas fueron clasificadas en: Cateto Sulino, Cateto Sulino Grosso, Cuarentino, Semidente Riograndense, Dente Riograndense, Dente Blanco, Camero de Ocho, Moroti, Cristal y Pisinpallo ^[26].

1.1.3 Biología

El maíz es una planta de porte robusto y de hábito anual; el tallo es simple, erecto, de elevada longitud (alcanza alturas de 2 a 6 m) y con pocas ramificaciones. Las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo, las raíces primarias son fibrosas presentando además raíces adventicias, que nacen en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo ^[27].

Es una especie monoica, que se caracteriza por tener la inflorescencia femenina (mazorca) y la masculina (espiga) separadas pero en la misma planta (Figura 4) ^[28,29]. Es de polinización abierta (alógama), pues la transferencia del polen ocurre desde la espiga, a los estigmas de la mazorca. Cerca del 95% de los óvulos de la mazorca son fecundados con polen de otra planta (polinización cruzada), ocurriendo solamente un 5% de autopolinización, lo que favorece a la diversidad genética de la especie ^[30]. Una planta de maíz puede producir cerca de 25 millones de granos de polen y estos son capaces de viajar por el viento a distancias mayores a 1000 metros ^[31]. Una vez ocurrida la fecundación, la inflorescencia femenina puede formar alrededor de 400 a 1000 granos arreglados en hileras de 8 a 24 por mazorca, dependiendo de la variedad del maíz ^[32].

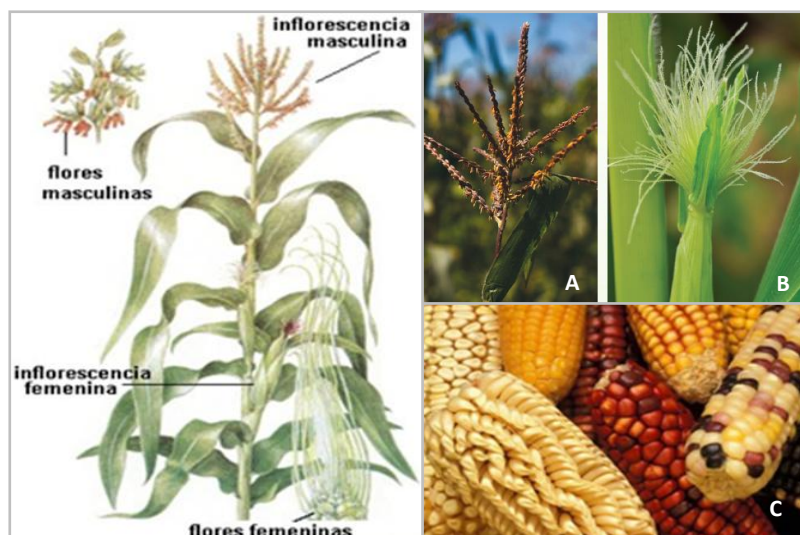


Figura 4. Descripción biológica del maíz. El maíz presenta flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta. La inflorescencia masculina es terminal y se conoce como espiga (imagen superior derecha, A). La misma está compuesta por florecillas estaminadas donde se desarrollan los granos de polen. La inflorescencia femenina conocida como mazorca, se localiza en las yemas axilares de las hojas, son de forma cilíndrica y están compuestas por flores pistiladas que se arreglan en hileras paralelas (imagen superior derecha, B). La inflorescencia femenina fecundada puede generar de 400 a 1000 granos en promedio de 8 a 24 hileras (imagen inferior derecha, C). Tomado y modificado de ^[28,29].

El genoma del maíz es relativamente complejo, se encuentra organizado en diez cromosomas ($2n=20$) de aproximadamente 2.4×10^9 pares de bases, presentando grandes cantidades de transposones ^[33]. Los elementos transponibles, comúnmente llamados “genes saltarines” o **transposones**, son secuencias de ADN que se mueven (o “saltan”) de una ubicación a otra en el genoma ^[34]. En el año 1940 Bárbara McClintok descubrió la existencia de los transposones en el maíz y sugirió que éstos jugaban un rol regulatorio en el genoma, controlando la activación de los genes ^[35]. Hoy se conoce que los transposones pueden insertarse en secuencias codificantes o entre secuencias regulatorias y provocar mutaciones en el genoma, contribuyendo así a la generación de diversidad del organismo ^[36, 37]. Asimismo, éstos son responsables de la expansión del genoma, dado que tienen la capacidad de duplicarse y distribuir sus copias a lo largo del mismo ^[38]. Se considera que entre el 60 y el 85% del tamaño del genoma del maíz está formado por transposones ^[39].

La diversidad genética del maíz es notable y es probable que cada gen contenga al menos un polimorfismo entre dos líneas puras, especialmente en las regiones no codificantes. De hecho, se ha observado que las tasas de polimorfismos alcanzan valores

de hasta un *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) cada 104 pares de bases, cuando se comparan dos individuos distintos ^[40].

1.1.4 Importancia

El maíz es el cereal mayormente distribuido a nivel mundial, ocupando la tercera posición en cuanto a su producción, detrás del arroz y del trigo. Actualmente es cultivado en más de 120 países, superando las 140 millones de hectáreas sembradas ^[41]. Alrededor del 67% de la producción total de maíz en el mundo proviene de los países en desarrollo, jugando un papel importante en el sustento de millones de agricultores. Es un cereal muy versátil, esencial para la alimentación humana y animal y como fuente de materias primas para la industria. Es usado para producir forraje, así como para la fabricación de una gran cantidad de alimentos y de productos farmacéuticos e industriales, tales como: concentrado balanceado para consumo animal, papel, refrescos, caramelos, tintas, pegamentos, plástico biodegradable, productos de panificación, productos lácteos, salsas, sopas, pinturas, helados, alcohol, aceite comestible, cosméticos, saborizantes, entre otros ^[42]. Aunque es un alimento altamente energético, la población mundial consume poco maíz en grano o procesado, siendo ingerido mayoritariamente como ingrediente en una infinidad de productos. El consumo animal es el principal uso del maíz, destinándose a la producción de piensos para vacunos, porcinos y aves. Por su alto contenido de almidón y baja presencia de fibra, el maíz constituye una fuente de energía concentrada, con alto contenido de nutrientes digestibles totales en relación con otros piensos de grano ^[43].

1.1.5 Diversidad

Como en el maíz predomina la polinización abierta, la generación de híbridos por entrecruzamientos es frecuente. Cada planta nueva tendrá parentales distintos, por lo que un gran número de genes se encontrarán en forma heterocigótica. La heterocigosis generada por la polinización cruzada, es uno de los mecanismos que mantienen la variabilidad y la productividad de las poblaciones de maíz. Pero la diversidad morfológica y genética del maíz no sólo es resultado de eventos biológicos, sino de la interacción durante cientos de generaciones, con poblaciones humanas ^[44]. El hombre acabó

interviniendo en la generación de diversidad a través del intercambio de semillas entre los agricultores. Varios estudios han sugerido que este intercambio pudo aumentar considerablemente la velocidad de dispersión y la variabilidad genética entre las diferentes líneas de maíz ^[45,46].

Un nuevo aspecto que ha cobrado notoriedad y que tiene implicancias en la conservación de la diversidad del maíz, es la introducción de transgenes en maíces criollos por interpolinización entre los cultivos ^[11]. Este es un tema que ha llevado a grandes controversias en el ámbito científico, político y público, debido a que podría atentar contra las políticas de “coexistencia regulada”, definidas para el uso de cultivos GM (ver más adelante).

1.1.6 El maíz en Uruguay

Uruguay es un país donde el 85% de territorio es productivo a nivel agropecuario; las estimaciones de las superficies cultivables establecen que entre el 30 y el 50% de la superficie es apta para el cultivo. El trigo y el arroz son los principales cereales cultivados para consumo humano, mientras que la soja, el maíz, el sorgo, la avena y la cebada, se emplean mayormente para la alimentación animal y la industria. En el año 2013 la soja se colocó como el cultivo más importante del Uruguay en términos de toneladas producidas ^[47].

La zona maicera es poco concentrada; los cultivos están dispersos por la totalidad del país, sin embargo la mayor producción corresponde a los departamentos del sur: Canelones, San José, Colonia, Paysandú y Florida. La producción se realiza en un sistema dual, con pequeños agricultores que lo producen para autoconsumo y con grandes agricultores que lo producen con fines comerciales. Los agricultores campesinos utilizan variedades criollas, mientras que los grandes agricultores comúnmente utilizan híbridos comerciales, producto del fitomejoramiento científico ^[48].

Por su aporte a la industria, el maíz representa una de las producciones agrícolas más valiosas en Uruguay. Se emplea para la producción de alcoholes, aceite, glucosa y almidón. Este último, también conocido como fécula de maíz, se añade a pastas y sémolas para sopas, mermeladas, confituras, maicena, gomas de mascar, como relleno de carnes, para la fabricación de salchichas, como espesante de jugos de frutas, refrescos, cervezas y

licores. Actualmente existen más de 300 productos comercializados en el mercado uruguayo, que incluyen derivados del maíz ^[49].

En Uruguay se cultivan tres tipos de maíz, que varían según su uso y destino; el maíz dulce, el maíz para silo y el maíz para grano. El **maíz dulce**, es la variedad mayormente destinada para consumo humano. Una parte de su producción se comercializa en ferias, almacenes y supermercados como “choclo dulce”, mientras que la otra parte es procesada y se vende congelada, desgranada o como crema de choclo. Como en Uruguay la producción comercial de semillas de maíz dulce es escasa, la mayoría se importa desde Argentina y Brasil. El otro tipo de maíz cultivado es el **maíz para silo**, destinado básicamente para alimentar al ganado vacuno. En este caso, además de cosechar la mazorca, se cosecha la planta entera para ensilar, picar y procesar por fermentación. Por último, la variedad mayormente cultivada en el territorio es el **maíz para grano**. Las mazorcas de maíz para grano son generalmente más anaranjadas que las del maíz para silo y contienen granos más duros, lo que los hace ideales para ser molidos y transformados, por ejemplo en harina de maíz. Del total de maíz para grano que se cultiva en Uruguay, solamente un 3 a 5% se industrializa para consumo humano (por ejemplo como polenta), mientras que su principal destino es la industria avícola ^[50].

El organismo encargado de realizar las estadísticas sobre los cultivos en Uruguay es el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), a través de la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA). Según los datos recolectados por la DIEA, tras la última década ha ocurrido un aumento gradual en la siembra de maíz y se han logrado cifras históricas en su producción. En la zafra 2012/2013, se consiguieron sembrar 123 mil hectáreas de maíz, alcanzando una producción de 693 mil toneladas y logrando un rendimiento de 5600 Kilos por hectárea (Tabla 1) ^[51].

Tabla 1. Área sembrada, producción y rendimiento del cultivo de maíz, por año agrícola (Datos del 2005 al 2012). ⁽¹⁾ Área sembrada en miles de hectáreas, ⁽²⁾ Producción en miles de toneladas. ⁽³⁾ Rendimiento en kilos por hectárea sembrada. Tomado de ^[51].

Zafra	2005/06	2006/07	2007/08	2008/09	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13
Área sembrada ⁽¹⁾	49,0	58,7	80,6	87,5	96,0	80,9	123,9	123,0
Producción ⁽²⁾	205,0	337,8	334,7	269,8	529,1	286,2	528,3	693,0
Rendimiento ⁽³⁾	4.184	5.757	4.155	3.085	5.510	3.574	4.264	5.648

A su vez, las exportaciones de maíz alcanzaron un récord histórico en el año 2013, sumando US\$ 71 millones, lo que significó un crecimiento del 39% respecto al año anterior. El volumen exportado ascendió a 272 mil toneladas, representando un aumento del 49% respecto al volumen vendido en los primeros 10 meses del año 2012 ^[52] (Tabla 2).

Tabla 2. Exportaciones de maíz por año, en toneladas (Datos 2005 - 2012). Tomado y modificado de ^[51]

Tipo de producto	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Productos de Maíz	0	0	0	19.578	27.728	237.588	0	201.943
Harina de maíz	5	5	5	10	3	6	6	9
Semillas de maíz	63	27	66	12	8	12	10	0

Según la Consultora en agronegocios Blasinia y Asocados ^[53], las causas por las cuales se alcanzaron cifras históricas en la zafra 2012, no sólo se traducen a un aumento del área sembrada. Los cambios tecnológicos que impactaron en el rendimiento y las nuevas regulaciones de conservación de suelos por parte del Ministerio de Ganadería, parecen haber tenido efectos positivos en la producción del maíz. De la misma forma, el sector privado ha tomado conciencia de que la siembra de trigo y soja necesita para lograr un mayor rendimiento, la complementariedad con cultivos de gramíneas como el maíz ^[53].

1.2 Maíz transgénico

El maíz genéticamente modificado es aquel al cual se le han realizado cambios genéticos, modificando o insertando uno o varios genes con características de interés, mediante el uso de tecnología de ADN recombinante. Hasta la fecha se han desarrollado en el mundo, 131 variedades (eventos) de maíz con distintas características agronómicas y/o de producción ^[54]. Un **evento de transformación** es una recombinación o inserción particular de ADN ocurrida en una célula vegetal, a partir de la cual se originó una planta transgénica. Se define como la inserción en el genoma, de forma estable y conjunta, de uno o más genes que forman parte de una construcción definida (*cassette* de expresión) ^[55]. Los eventos de transformación difieren unos de otros en los elementos y genes insertados, en los sitios de inserción en el genoma de la planta, en el número de copias del inserto y en los patrones y niveles de expresión de las proteínas de interés. Los eventos

pueden además acumularse por cruzamiento convencional, lo que da como resultado a una planta con varias características combinadas, que se conoce como **evento apilado** o **“stacked events”**.

Dentro de las variedades transgénicas de maíz, se encuentran aquellas con resistencia a insectos (coleópteros, lepidópteros), las tolerantes a herbicidas (glufosinato de amonio, glifosato, 2-4D, sulfonilurea), aquellas con genes para conferir un aumento de la producción de etanol, para conferir esterilidad masculina, para la restauración de la fertilidad y para la resistencia a antibióticos. Asimismo, a mediados del año 2013 comenzaron a cultivarse en Estados Unidos, los primeros maíces transgénicos de resistencia a sequías ^[5].

1.2.1 Resistencia a insectos

Dentro de las primeras variedades de maíz genéticamente modificadas, se encuentran aquellas desarrolladas para resistir al ataque de determinados insectos. Un ejemplo de estas es la línea Bt-11 (evento Bt11), que fue modificada específicamente para ser resistente contra el ataque del barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), una de las principales plagas del maíz en la agricultura ^[56]. Esta variedad produce la proteína insecticida *cry1Ab*, derivada de la bacteria *Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki*, cepa HD-1. La delta-endotoxina *cry1Ab* actúa uniéndose selectivamente a sitios específicos en el intestino de los insectos susceptibles, generando poros que interrumpen el flujo de iones, lo que causa parálisis y la muerte del insecto (Figura 5). La proteína *cry1Ab* tiene acción insecticida únicamente sobre lepidópteros y su especificidad de acción es atribuible a la presencia de sitios de unión específicos en los insectos blanco. Cabe destacar, que no existen sitios de unión para delta-endotoxinas de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de mamíferos, por lo tanto, los animales no serían susceptibles a estas proteínas ^[57].

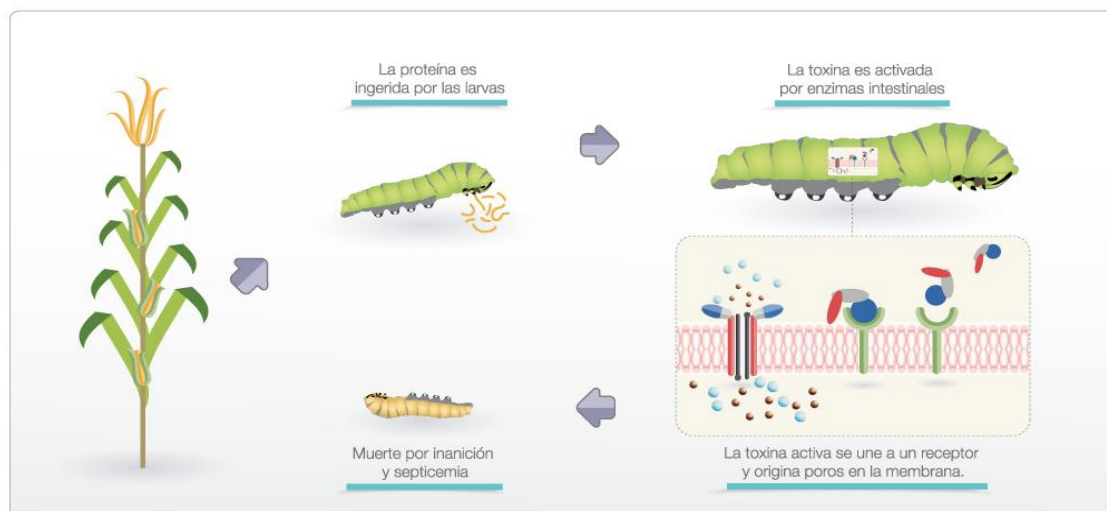


Figura 5. Tecnología Bt. Los cultivos Bt poseen una versión modificada de la proteína insecticida *cry* de *Bacillus thuringiensis*. Cuando los insectos lepidópteros se alimentan de los cultivos con esta tecnología, se libera una delta endotoxina, que se une a las células intestinales del insecto creando poros. Esto conduce a un desbalance de iones y a la parálisis del sistema digestivo que provoca la muerte de la larva en pocos días. Tomado de ^[56].

1.2.2 Tolerancia a herbicidas

Ciertas líneas de maíz han sido modificadas para tolerar el agregado de herbicidas de uso común en la agricultura moderna. El maíz Bt11 además de expresar la proteína *cry1Ab* para la resistencia a insectos, ha sido modificado para expresar el gen *pat* que codifica para la enzima fosfinotricina-N-acetiltransferasa (*PAT*) del actinomiceto del suelo *Streptomyces viridochromogenes*. La enzima *PAT* se utiliza para conferir resistencia al herbicida fosfinotricina, también conocido como glufosinato de amonio (ingrediente activo en los herbicidas *Basta*[®], *Rely*[®], *Finale*[®] y *Liberty*[®]). El glufosinato de amonio actúa inhibiendo a la enzima *glutamina sintetasa*, encargada de desintoxicar a la planta catalizando la transformación del amoníaco en glutamina. La inhibición de esta enzima conduce a una acumulación de amoníaco en los tejidos de la planta, provocando su muerte a pocas horas de la aplicación del herbicida. La enzima *PAT* transgénica cataliza la acetilación del glufosinato de amonio, convirtiéndolo en un compuesto inactivo que no ejerce efecto en el cultivo de maíz transgénico, pero que es eficaz para el control de malezas ^[57].

A su vez, se han desarrollado variedades “*Roundup Ready*” (ej. líneas NK603 y GA21), modificadas para ser tolerantes a la aplicación del herbicida comercial *Roundup*[®], cuyo

ingrediente activo es el glifosato (N-fosfometil glicina) ^[58]. El glifosato inhibe en plantas, bacterias, algas, hongos y parásitos, a la enzima *5-enolpiruvil shikimato-3 fosfato sintetasa* (EPSPS), clave para la síntesis de aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina y triptófano. La EPSPS es codificada en plantas por un gen nuclear cuyo producto activo se localiza en los cloroplastos. El glifosato actúa como un inhibidor competitivo del sustrato de la enzima, impidiendo la formación del complejo funcional y su posterior transporte al cloroplasto. Las variedades de maíz genéticamente modificadas con resistencia al herbicida, contienen el gen *epsps* proveniente de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (*epsps**). La enzima producida por el gen *epsps** tiene una menor afinidad por el glifosato y es catalíticamente activa en presencia del herbicida (Figura 6). De esta manera, las variedades transgénicas aún son capaces de sintetizar los aminoácidos esenciales y como consecuencia son capaces de sobrevivir a la aplicación del mismo ^[59].

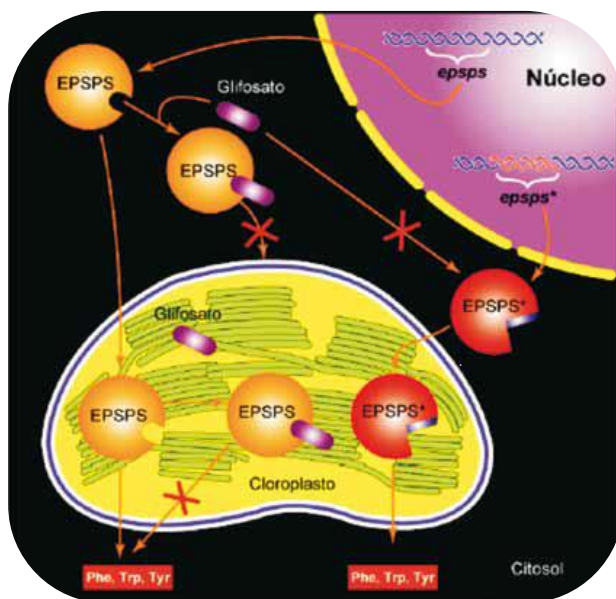


Figura 6. Esquema de la inhibición de la enzima endógena EPSPS por el glifosato y ruta alternativa de la enzima EPSPS* transgénica. El herbicida Roundup® bloquea el sitio activo de la enzima EPSPS original de las plantas, impidiendo la generación de los aminoácidos aromáticos. La producción de la variante enzimática EPSPS* presente en los cultivos Roundup Ready, confiere una vía alternativa de continuidad metabólica en las plantas mejoradas, logrando que las mismas sobrevivan al agregado de herbicidas. Tomado de ^[59].

1.2.3 Situación del maíz GM a nivel mundial

El cultivo de maíz genéticamente modificado se ha incrementado sustancialmente desde su introducción en el comercio en el año 2003. En el año 2013 se plantaron a nivel global, 56.64 millones de hectáreas de maíz GM, lo que representó un 32% de las 177 millones de hectáreas de maíz (GM y no-GM) cultivadas en el mundo ^[4].

Desde la implementación de la tecnología transgénica en este tipo de cultivo, la característica que ha dominado es la de resistencia a insectos (Bt), seguida de la tolerancia a herbicidas. No obstante, gracias al avance del conocimiento en el área de la biología vegetal, en un futuro cercano se comenzarán a desarrollar nuevas líneas de maíz (**transgénicos de segunda generación**), con características tan diversas como la tolerancia a estreses bióticos y abióticos, aumento de rendimiento, aumento de contenidos nutricionales, entre otras ^[43].

1.2.4 Situación del maíz GM en Uruguay

Como se ha mencionado, Uruguay se mantiene como el décimo país a nivel mundial con mayor área sembrada de cultivos genéticamente modificados, llegando a 1.5 millones de hectáreas en la zafra 2012/2013 ^[4]. Las mismas se repartieron entre variedades de soja y maíz transgénico. Según los datos de la Cámara Uruguaya de Semillas (CUS), la totalidad de la soja sembrada en esa zafra fue genéticamente modificada, mientras que el maíz GM representó el 90% del total del cultivo ^[60].

Hasta la fecha Uruguay tiene autorizados para producción y uso comercial, para consumo directo o procesamiento, una cantidad de diez eventos de maíz con características agronómicas de resistencia a insectos y/o tolerancia a herbicidas (Tabla 3, Figura 7) ^[61]. Asimismo, se encuentran en instancias de evaluación para la autorización con este mismo fin, tres eventos apilados que resultan de la combinación de alguno de los eventos ya autorizados en el país.

Los primeros eventos liberados y autorizados para consumo humano, fueron el maíz MON810 y Bt11 con resistencia a insectos lepidópteros, los cuales entraron en vigencia en el año 2003 y 2004 respectivamente. En el año 2006, se aprobó la suspensión del uso, producción y comercialización de semilla de maíz dulce genéticamente modificado y se estableció una moratoria para la introducción de nuevos eventos transgénicos al país, por un período de 18 meses ^[62]. Cumplido el plazo, se aprobaron ocho nuevos eventos con características agronómicas combinadas de resistencia insectos, tolerancia a herbicida glifosato y/o tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Finalmente en el año 2012 se autorizó la producción y la comercialización de maíz dulce GM.

Tabla 3. Eventos de maíz GM autorizados para producción, uso comercial, consumo directo y procesamiento en Uruguay. Para cada evento se detalla el año de autorización, la característica agronómica y el/los genes introducidos. Tomado y modificado de ^[61].

AÑO	EVENTO	EMPRESA	CARACTERÍSTICA	GEN INTRODUCIDO
2003	MON810	MONSANTO S.A.	Resistencia a insectos lepidópteros	<i>cry 1Ab</i>
2004	BT11	YALFIN S.A.	Resistencia a insectos lepidópteros	<i>cry 1Ab</i>
			Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	<i>Pat</i>
2011	TC1507	RUTILAN S.A. (Pioneer & Dow AS)	Resistencia a insectos lepidópteros	<i>cry 1F A2</i>
			Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	<i>Pat</i>
2011	GA21	YALFIN S.A.	Tolerancia al herbicida glifosato	<i>Mepsps</i>
2011	NK603	MONSANTO S.A.	Tolerancia al herbicida glifosato	<i>cp4epsps</i>
2011	GA21x BT11	YALFLIN S.A. (Syngenta Seeds)	Tolerancia al herbicida glifosato	<i>Mepsps</i>
			Resistencia a insectos lepidópteros	<i>cry 1Ab</i>
			Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	<i>Pat</i>
2011	MON810 x NK603	MONSANTO S.A.	Tolerancia al herbicida glifosato	<i>CP4 epsps</i>
			Resistencia a insectos lepidópteros	<i>cry 1Ab</i>
2012	TC1507 X NK603	DAS AGRO S.A. AGROSAN S.A.	Resistencia a lepidópteros	<i>cry 1F</i>
			Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	<i>Pat</i>
			Tolerancia al herbicida glifosato	<i>cp4 epsps</i>
2012	MON89034 X TC1507 X NK603	DAS AGRO S.A. (Monsanto, Dow AgroScience)	Resistencia a insectos lepidópteros	<i>cry1A.105, cry2ab, cry 1F</i>
			Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	<i>Pat</i>
			Tolerancia al herbicida glifosato	<i>cp4 epsps</i>
2012	Bt11 X GA21 X MIR162	YALFLIN S.A. (Syngenta Seeds)	Resistencia a lepidópteros	<i>cry 1Ab, Vip3Aa20</i>
			Tolerancia al herbicida glufosinato de amonio	<i>Pat</i>
			Tolerancia al herbicida glifosato	<i>Mepsps</i>

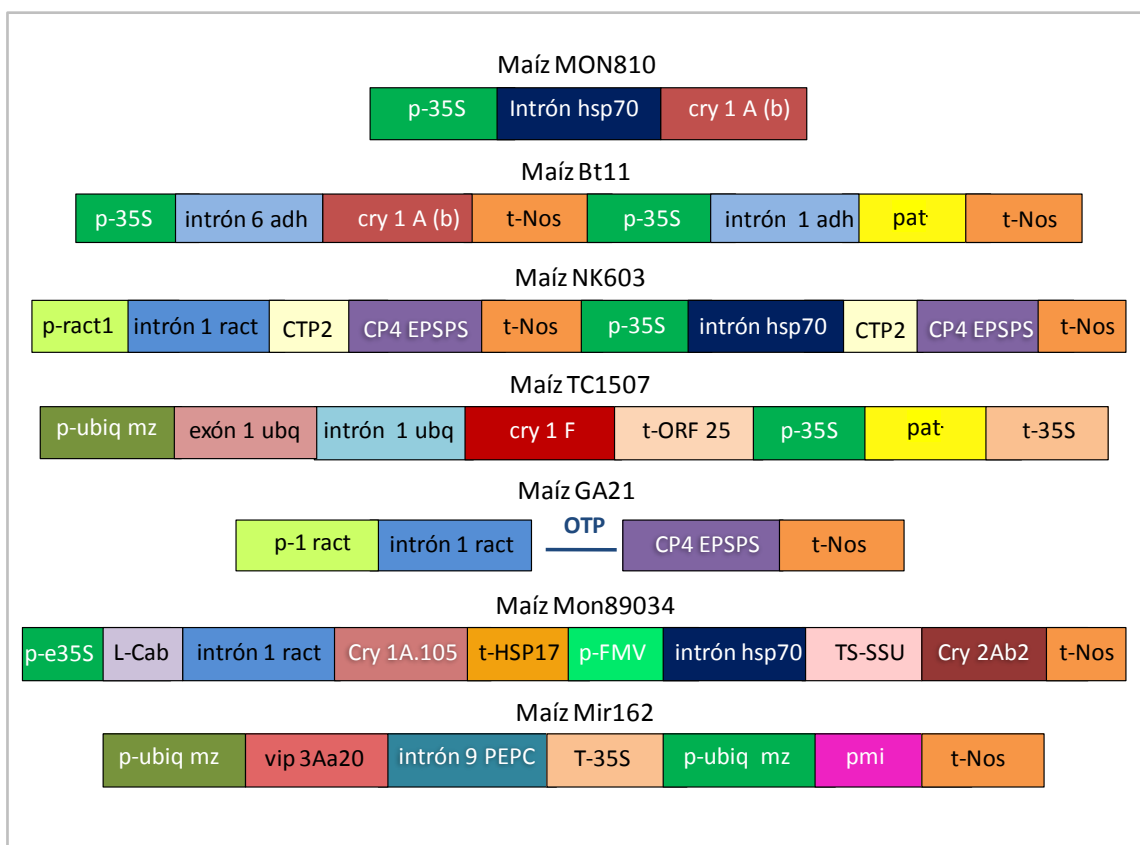


Figura 7. Representación de las construcciones de los eventos de maíz aprobados en Uruguay, MON810, Bt11, NK603, TC1507, GA21, MON89034 y Mir162. Los eventos apilados (*stacked events*) se conforman por el cruzamiento de dos o más de estas construcciones (p. ej., GA21 x Bt11). Referencias: **p35S**: promotor 35S del virus del mosaico del coliflor, **Hsp70**: intrón de la *heat-shock protein 70* de maíz, **intrón 6 adh**: intrón 6 del gen de la enzima *alcohol deshidrogenasa* de maíz, **cry 1 A(b)**: delta-endotoxina *cry1Ab* de *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, **intrón 1 adh**: primer intrón del gen de la enzima *alcohol deshidrogenasa* de maíz, **t-Nos**: terminador del gen *nopalina sintasa* de *Agrobacterium tumefaciens*, **pat**: gen de la enzima *fosfoinotricin-acetil transferasa (pat)* de *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu494, **p-ract 1**: promotor del gen de la *actina* de arroz, **intrón 1 ract**: intrón 1 del gen de la *actina* de arroz, **CTP2**: péptido de tránsito al cloroplasto de *A. thaliana*, **CP4 EPSPS**: codifica para la enzima *5-enolpiruvil-shiquimato 3-fosfato sintetasa* de *A. tumefaciens*, **p-ubiq**: promotor del gen de *ubiquitina* de maíz, **exón 1 ubq**: primer exón del gen de la *ubiquitina* de maíz, **intrón 1 ubiq**: primer intrón del gen de la *ubiquitina* de maíz, **cry 1 F**: delta-endotoxina *cry1F* de *B. thuringiensis*. **t-ORF25**: secuencia PolyA del *ORF25* de *A. tumefaciens*, **t-35s**: terminador del gen 35S del virus del mosaico del coliflor, **p-PEPC**: promotor del gen de la *fosfoenol-piruvato carboxilasa* de maíz, **intrón 9 PEPC**: intrón 9 del gen de la *fosfoenol-piruvato carboxilasa* de maíz, **p-CDPK**: promotor del gen de la proteína *kinasa dependiente de calcio* de maíz, **L-Cab**: región 5' no traducida de la proteína de unión a la clorofila a/b de trigo, **cry 1A.105**: delta-endotoxina artificial con los dominios I y II de *cry1Ab* o *cry1Ac* de *B. thuringiensis* subsp. *Kurstak*, **t-Hsp17**: secuencia 3' de terminación de la transcripción para la *heat-shock protein 17* del trigo, **p-FMV**: promotor del virus del mosaico del higo, **TS-SSU**: secuencia de acceso al cloroplasto de la subunidad pequeña de la *ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa* del maíz y primer intrón, **cry 2Ab2**: secuencia codificante de la proteína *cry2Ab2* de *B. thuringiensis*, **vip 3Aa20**: delta-endotoxina producida por *B. thuringiensis*, **pmi**: gen que codifica para la *fosfomanosa isomerasa* de *E. coli*. Realizado en base a información del ISAAA ^[54].

1.3 Marcos regulatorios e Institucionales

La creación de Organismos Genéticamente Modificados por la biotecnología moderna ha motivado un gran debate a nivel mundial. Si bien los mismos fueron elaborados con el fin de mejorar la calidad e incrementar la cantidad de los alimentos, se ha generado una gran preocupación respecto de los posibles efectos o riesgos que podrían representar para la salud humana y el medio ambiente. Esta discusión ha sido iniciada a nivel internacional especialmente desde la vigencia del Convenio de Diversidad Biológica y del Protocolo de Cartagena, que han fomentado el desarrollo de estudios cada vez más importantes respecto a los posibles impactos y efectos de estos organismos.

La preocupación deriva fundamentalmente de la falta de certeza en torno a los efectos que puede generar el uso masivo de esta tecnología. Algunos de los principales riesgos para la diversidad biológica, incluirían: el flujo génico, el impacto sobre organismos no-blancos, la posible aparición de malezas y plagas resistentes. En cuanto a los riesgos relacionados con la salud humana y la alimentación, se puede aludir a: la posibilidad de difusión de genes de resistencia a antibióticos, o la posibilidad de creación de proteínas con propiedades alergénicas o tóxicas para el consumidor. Por otro lado, debido a que el cultivo transgénico se relaciona con prácticas agrícolas basadas en el monocultivo, también se asocian riesgos como: el uso excesivo de agroquímicos (herbicidas, plaguicidas, fertilizantes), la erosión y la pérdida de productividad de los suelos, entre otros ^[63].

Al evaluar los riesgos y beneficios, debe incluirse el contexto económico y social en que se desenvuelve este tipo de tecnología. En efecto, la misma ha sido desarrollada fundamentalmente por empresas transnacionales, que han colocado exitosamente sus productos en el mercado generando importantes transformaciones. Esta tecnología trae de manera implícita la constitución de derechos de propiedad intelectual sobre las nuevas variedades creadas, lo que obliga a los agricultores a pagar por su uso y de esta manera, a depender de las empresas multinacionales ^[63].

Cabe destacar que, no es sólo la tecnología en sí misma la que sería capaz de generar los efectos adversos al ambiente o a la salud, sino además el manejo del paquete tecnológico asociado a este tipo de cultivos. Es por este impacto potencial que se hace necesario adoptar una actitud cautelosa y determinada para incluir al ambiente nuevos cultivos transgénicos, y es por ello, que se han establecido distintos instrumentos a nivel internacional para controlar su liberación ^[64].

“Detección y cuantificación de OGM en cultivos de maíz y en alimentos derivados mediante análisis molecular”

1.3.1 Instrumentos y declaraciones Internacionales

1.3.1.1 Convenio de Diversidad Biológica (Conferencia de Río de Janeiro 1992)

El Convenio enfoca la problemática del medio natural y apunta a la conservación de la diversidad biológica, a la utilización sostenible de sus componentes y a la participación justa y equitativa de los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos. En el mismo se define el término de Biotecnología como: *...“toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos.”* Asimismo, exige el establecimiento de sistemas legales para regular, administrar o controlar cualquier riesgo que pudiera surgir del uso y liberación al ambiente de organismos vivos modificados *...“que puedan afectar a la conservación y a la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana”* [2]. Forman parte de este Convenio un total de 187 países, exceptuando a Brunei, Irak, Tailandia y Estados Unidos [65].

1.3.1.2 Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología (2000)

El protocolo de Cartagena del año 2000, es un acuerdo suplementario al Convenio de Diversidad Biológica del año 1992. Se ocupa principalmente de los movimientos transfronterizos de Organismos Vivos Genéticamente Modificados. El Protocolo define a estos organismos como *“cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna”*. El objetivo del presente Protocolo se centra en *“contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la transferencia, manipulación y utilización de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología, que puedan tener efectos adversos para la conservación y la utilización sostenible de la diversidad biológica, teniendo también en cuenta los riesgos para la salud humana, y centrándose concretamente en los movimientos transfronterizos”*. Hasta la fecha, 159 países se han adherido a este instrumento internacional [65].

1.3.1.3 El Codex Alimentarius

El *Codex Alimentarius* es una colección reconocida de estándares, prácticas, guías y recomendaciones relativas a la producción y seguridad de los alimentos. Se encuentra regulado por la *Food and Agriculture Organization* (FAO) y la Organización mundial del Comercio (OMC), quienes tienen como cometido estandarizar y normalizar las prácticas referidas a los alimentos, a través de la coordinación de normas alimentarias entre todas las organizaciones y países.

En julio del año 2003 la comisión del *Codex Alimentarius* aprobó el proyecto de principios para el análisis de riesgos de alimentos obtenidos por medios biotecnológicos modernos, y el proyecto de directrices para la realización de la evaluación de la inocuidad de los alimentos derivados de plantas de ADN recombinante ^[66].

1.3.1.4 Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV)

La UPOV es una organización intergubernamental creada por el Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales del año 1961, para proteger el derecho de propiedad intelectual: el “derecho de obtentor”. Al solicitar el derecho de obtentor, una planta es presentada físicamente para su examen e inclusión en una lista nacional de variedades permitidas. Una vez incluida en la lista, la variedad será protegida y se requerirá de la autorización del obtentor para realizar los siguientes actos: (i) producción o reproducción (multiplicación) de la variedad, (ii) preparación a los fines de la reproducción o de la multiplicación, (iii) venta o cualquier otra forma de comercialización, (iv) la exportación o importación ^[67].

1.3.2 Política de Bioseguridad en Uruguay

El Gobierno Uruguayo aprobó formalmente el uso de la biotecnología en el año 1995, tras la creación de una comisión de evaluación de riesgos de los OVG. La primera autorización de cultivos biotecnológicos se produjo en el año 1996, cuando la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA) del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP) aprobó el uso de la soja RR (MON40-3-2) tolerante al herbicida glifosato. En el año

2000, mediante el Decreto 249/00, se creó la Comisión de Evaluación de Riesgo de los OVGМ y se estableció un marco normativo para autorizar la introducción, uso y manipulación de los OGM ^[68].

Entre los años 2003 y 2004, por resolución ministerial de los Ministerios de Ganadería, Agricultura y Pesca y el Ministerio de Economía y Finanzas, se introdujeron las primeras variedades de maíz genéticamente modificado. Junto a la introducción de estas variedades, se establecieron las condiciones para su uso; cada variedad debía poseer un registro que identificara al productor o importador, y al titular de la chacra en la que se sembrarían las semillas transgénicas. Asimismo, se implantó el concepto de área de refugio y zona de amortiguación. El **área de refugio** establece que, en cada predio en el que se cultive una variedad transgénica, debe existir un área del 10% sembrada con una variedad no genéticamente modificada. La **zona de amortiguación** dispone que se debe mantener al menos 250 metros de separación entre predios sembrados con cultivos transgénicos y no transgénicos ^[61].

En el año 2007, se aprobó el Decreto 37/07, el cual suspendió el tratamiento de nuevas solicitudes de autorización para introducir eventos transgénicos, por un período de dieciocho meses ^[69]. Durante esta moratoria, un grupo compuesto por representantes de diferentes Ministerios (Agricultura, Salud, Economía y Medio Ambiente) volvió a evaluar y fortalecer las políticas de bioseguridad. La moratoria se levantó en julio del año 2008 con la derogación del Decreto 249/00 y la creación de un nuevo marco regulatorio, dispuesto en el **Decreto 353/08**. El mismo estableció que, *“la introducción, uso y manipulación de OGM, sólo podrán efectuarse previa autorización, concedida caso a caso por las autoridades competentes, teniendo en cuenta los resultados de las correspondientes etapas de la evaluación y gestión del riesgo de esa aplicación sobre el ambiente, la diversidad biológica, la salud humana, la sanidad animal y vegetal y aspectos socioeconómicos”* ^[70]. Asimismo, se estableció una política de **“coexistencia regulada”**, reconociendo que los diferentes sistemas productivos: convencional, orgánico, o transgénico, tienen roles definidos en la agricultura y por tanto, es deseable promover el desarrollo de esos diferentes sistemas productivos ^[70].

Para poder controlar el uso de OGM, se creó una nueva estructura orgánica encargada de la bioseguridad de vegetales y sus partes genéticamente modificadas, conocida como **Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNBio)**. El mismo se encuentra integrado por los Ministros de Ganadería, Agricultura y Pesca; Salud Pública; Economía y

Finanzas; Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente; Relaciones exteriores; Industria, Energía y Minería y es quien se encarga de autorizar las solicitudes vinculadas a los OVGGM que ingresan al país.

En el año 2011, Uruguay ratificó el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad, por lo que se comprometió a establecer un marco nacional de biotecnología y/o bioseguridad respecto a los OGM, desarrollar capacidades en análisis, gestión y comunicación del riesgo y a participar del Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología (CIISB). El CIISB es un mecanismo de intercambio de información establecido por el Protocolo de Cartagena para asistir a las partes a implementar el Protocolo, facilitar el intercambio de información y experiencia científica, técnica, ambiental y legal sobre los OGM^[71].

Finalmente en el año 2012 el Gabinete Nacional de Bioseguridad resolvió que el área de refugio no era requisito exigible para la producción y uso comercial, para consumo directo o procesamiento de los eventos Bt11, MON810, TC1507, Ga21xBt11, MON810xNK603^[72]. Sin embargo, para proseguir con las recomendaciones de la Comisión para la Gestión de Riesgo (CGR), la Cámara Uruguaya de Semillas (CUS) creó el programa de Manejo de la Resistencia de Insectos (IRM), el cual promueve el establecimiento de áreas de refugio para el uso responsable de la tecnología Bt en los cultivos de maíz^[56]. En este programa participan todas las empresas semilleras que comercializan eventos transgénicos y el Instituto Nacional de Semillas (INASE).

1.3.2.1 Análisis de Riesgos

El análisis de riesgos es la herramienta metodológica utilizada internacionalmente para evaluar, medir y prevenir sucesos no deseados relacionados con una nueva tecnología, que afecten a personas y el medio ambiente^[73]. El mismo incluye: la identificación de los potenciales efectos adversos al ambiente y/o a la salud; la estimación de la probabilidad de que dichos efectos ocurran; la evaluación de las consecuencias de estos efectos; la consideración de las estrategias apropiadas para la gestión del riesgo; y la estimación del impacto global de la nueva tecnología.

La estructura encargada de gestionar el análisis de riesgos en Uruguay se integra por el Gabinete Nacional de Bioseguridad (**GNBio**), la Comisión para la Gestión del Riesgo (**CGR**), la instancia de Evaluación del Riesgo en Bioseguridad (**ERB**) y el Comité de

“Detección y cuantificación de OGM en cultivos de maíz y en alimentos derivados mediante análisis molecular”

Articulación Institucional (**CAI**). El GNBio y la CGR conforman el proceso de Gestión de Riesgos, mientras que la ERB y el CAI comprenden el proceso de Evaluación de Riesgos (Figura 8) ^[65].

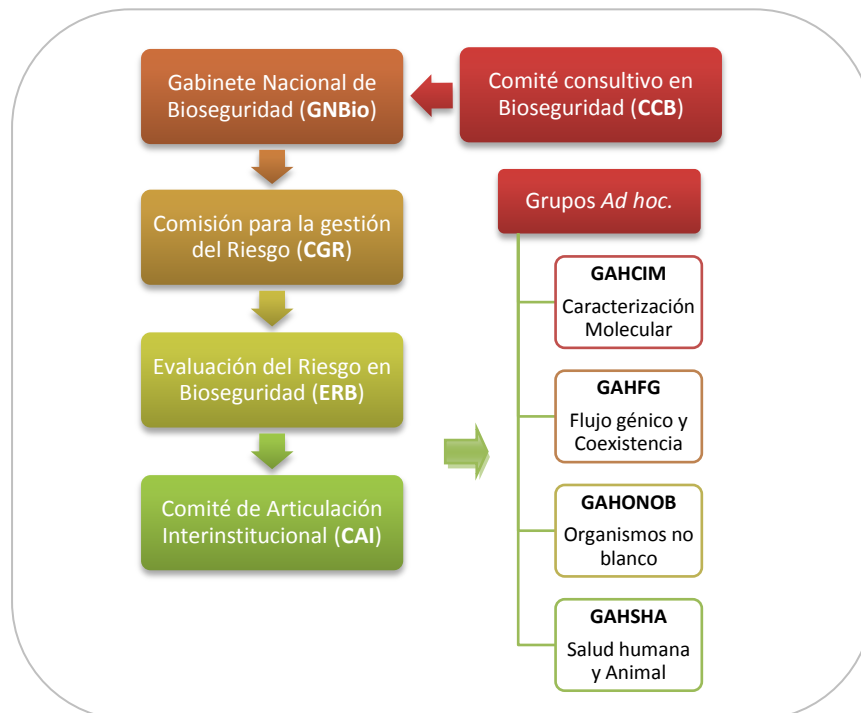


Figura 8. Organigrama institucional de Bioseguridad de OGM en Uruguay. Tomado de ^[61].

El GNBio tiene como cometido autorizar o no, las solicitudes presentadas para la liberación de nuevos eventos transgénicos. Asimismo es el encargado de definir los lineamientos de la política nacional en bioseguridad de OGM, tomando en cuenta los antecedentes de países tales como Argentina, Brasil, Canadá y la Unión Europea. Cada uno de los Ministros que integran al GNBio, nombra a un delegado para conformar la Comisión para la Gestión del Riesgo (CGR). La misma gestiona el proceso de Análisis de Riesgos *caso a caso* y emite una recomendación al GNBio. La CGR también gestiona la consulta pública y realiza el seguimiento y monitoreo de los eventos autorizados, asegurando el cumplimiento de las condiciones de bioseguridad establecidas. La instancia técnico-científica de evaluación del riesgo se lleva a cabo por la comisión de la Evaluación del Riesgo en Bioseguridad (ERB), quien se encuentra integrada por un número reducido de expertos especialistas en las distintas áreas de la evaluación del riesgo. La ERB coordina con capacidades nacionales, regionales e internacionales para elevar a la CGR, un informe respecto a la seguridad ambiental e inocuidad alimentaria de los nuevos eventos solicitados. La misma debe asegurar el análisis *caso a caso* de la evaluación del riesgo

sobre bases científicas objetivas, según los términos de referencia pautados por la CGR y debe proveer de información a las instancias de consulta.

El Comité de Articulación Institucional (CAI) es una instancia auxiliar básica del proceso de evaluación del riesgo para facilitar el compromiso de las instituciones a un trabajo en red, ante las consultas que surjan del análisis de riesgos. Se encuentra integrado por representantes de un amplio número de instituciones del sector público y académico, vinculadas con el proceso de evaluación del riesgo: MGAP, MVOTMA, MSP, INIA, INASE, IIBCE, Inst. Pasteur y LATU. La UdelaR integraba el CAI en el comienzo, pero se retiró en el año 2012. El CAI se divide en cuatro grupos *Ad-Hoc* para realizar la evaluación de riesgos: el grupo de Caracterización Molecular, Flujo génico y coexistencia, Organismos no blanco y el grupo de Inocuidad alimentaria.

Una vez concluida la etapa de evaluación científica, y previo a la presentación al GNBio para la toma de decisión, se realiza una fase de consulta a la ciudadanía a través de una puesta de manifiesto, audiencia pública u otra alternativa que la CGR considere pertinente.

Las autorizaciones de un OGM pueden concederse para diferentes aplicaciones: (i) **liberación bajo uso contenido** (a escala de laboratorio o invernadero); (ii) **liberación a escala de campo en condiciones controladas** (pruebas y ensayos para investigación, evaluación de cultivares, liberaciones pre-comerciales, liberación para producción de semillas para importación); (iii) **Producción y uso comercial, para consumo directo o procesamiento**^[61].

1.4 Flujo de transgenes en variedades de maíz

Numerosos estudios sobre la dispersión del polen han demostrado que, a pesar de que el polen de maíz es relativamente grande y pesado, el mismo puede viajar a largas distancias por el aire cuando las condiciones meteorológicas son las adecuadas^[74]. Esto hace que la polinización cruzada ocurra con frecuencia entre cultivos lejanos. La tasa de polinización depende de diversos factores que incluyen: la viabilidad del polen y su longevidad; la fertilidad masculina o esterilidad de la planta; la sincronía de la floración entre las anteras de la planta donante de polen y la floración femenina de la planta receptora; la dirección y velocidad del viento y las condiciones climáticas^[75,76]. En los

“Detección y cuantificación de OGM en cultivos de maíz y en alimentos derivados mediante análisis molecular”

programas tradicionales de mejoramiento de plantas, las distancias de separación recomendadas en campos mayores a 2 hectáreas, ronda entre los 200 metros y 300 metros ^[11,77]. Se ha observado que el potencial impacto de la polinización, aumenta con el tamaño y el número de campos sembrados y que el porcentaje de cruzamiento está relacionado con la profundidad del campo en dirección de la fuente de contaminación. Asimismo, se ha visto que las primeras filas adyacentes a la fuente de contaminación funcionan como una barrera para la dispersión del polen ^[78].

Desde la liberación al ambiente del primer evento transgénico en maíz, se ha generado una creciente preocupación por la posibilidad de que el flujo de transgenes se interponga a la preservación de la identidad genética de las variedades convencionales. El conocimiento de los efectos directos sobre las especies de insectos no blanco, así como la posibilidad de transferir involuntariamente rasgos de importancia ecológica en las variedades criollas, han llevado al desarrollo de varios estudios científicos.

En el año 2001, Quist y Chapela revelaron la introducción de ADN transgénico en variedades nativas de maíz, en Oaxaca México ^[11]. A partir de la publicación de este artículo, se originó un fuerte debate en torno a la existencia del flujo de transgenes entre cultivos GM y no-GM ^[79-82]. En el año 2009, un nuevo estudio dirigido por Pyñeiro-Nelson, confirmó la existencia de transgenes en las variedades nativas de Oaxaca, indicando la persistencia o la reintroducción de los mismos en esa zona de México ^[83].

Aunque todavía no existen datos precisos de la magnitud y la difusión de la contaminación actual por el flujo de transgenes, se cree que por las prácticas culturales y dinámicas del maíz, la ampliación de la contaminación se potenciará rápidamente. La coexistencia sin contaminación entre las variedades transgénicas y no transgénicas parece ser poco practicable. Ciertos autores plantean que el flujo de transgenes podría estar acompañado de riesgos, como la posibilidad de que los agricultores sean procesados legalmente por tener en sus parcelas una tecnología por la cual no pagaron los derechos de uso, aunque la misma haya llegado por el aire ^[83].

1.4.1 Coexistencia regulada

Como se comentó anteriormente, una de las principales preocupaciones en relación con la adopción de los cultivos GM en los sistemas agrícolas, es la posibilidad de que estos transgénicos se integren en los sistemas de producción de cultivos tradicionales. La

presencia adventicia de material GM en las cadenas agrícolas puede provenir de diversas fuentes, ya sea a través de impurezas de las semillas, a partir del re-sembrado con semillas de una cosecha GM anterior, a través de la fertilización cruzada por el polen de cultivos GM, o a partir de la dispersión de semillas por la maquinaria de siembra, en la cosecha y/o en el transporte ^[84].

El término “**coexistencia**” incluye la capacidad de los agricultores de escoger libremente entre los cultivos agrícolas que deseen plantar, se trate de cultivos genéticamente modificados, convencionales u orgánicos. Asimismo, se refiere a las posibles consecuencias económicas que podría desencadenar la presencia accidental de material procedente de un cultivo en el otro. La presencia de OGM por encima del umbral de tolerancia establecido en la legislación llevará a la necesidad de etiquetar el producto que los contiene, pudiendo generar una pérdida de ingresos al productor, ya sea por influir en el precio en el mercado, o por dificultar su venta. Podrían implicar costos adicionales por adoptar sistemas de seguimiento y medidas de reducción de la contaminación ^[85].

Por otro lado, el término de coexistencia se ha definido para proporcionar a los consumidores una verdadera elección entre consumir alimentos GM y no-GM. Para que esto sea posible, no sólo debe existir un sistema de trazabilidad y etiquetado que funcione correctamente, sino también un sector agrario que pueda suministrar los diferentes tipos de bienes. La capacidad de la industria de alimentos para ofrecer una alta variedad de productos, va de la mano con la capacidad del sector agrícola para mantener diferentes sistemas de producción. Aunque algunos oponentes de los cultivos GM argumenten que la tolerancia en la presencia de material GM en plantas no-GM debe ser cero, en la práctica no existen métodos analíticos capaces de probar el contenido nulo de OGM. El límite de los análisis de rutina para la cuantificación de material GM está considerado en 0,1%, lo que equivale a 1 semilla genéticamente modificada en 1000 semillas no-GM. Aunque este nivel de resolución analítica es posible en un contexto de laboratorio, resulta difícil quedarse debajo de este umbral en la práctica agrícola, en donde los transgénicos se cultivan en una agricultura generalizada ^[86].

Varios países a nivel mundial han definido sus propias políticas para garantizar la coexistencia entre los distintos sistemas de producción. En setiembre del año 2010, la Comisión Europea aprobó nuevas directrices sobre el cultivo de OGM para dar a sus Estados miembros una mayor flexibilidad en su gestión. El nuevo informe del Consejo de Agricultura de la Unión Europea (UE), estableció que cada país puede hacer cumplir sus

“Detección y cuantificación de OGM en cultivos de maíz y en alimentos derivados mediante análisis molecular”

propias normas y prohibir el cultivo de plantas GM en su territorio, sin la necesidad de establecer acuerdos voluntarios entre los miembros. Asimismo, recomendó minimizar la mezcla de maíz GM y no-GM mediante el almacenamiento separado de las semillas y el establecimiento de las distancias mínimas de aislamiento entre los cultivos^[87]. La distancia mínima recomendada para cumplir con el umbral de etiquetado del 0,9% dispuesto en la reglamentación europea, es de 15 a 50 metros. Para restringir el contenido de OGM a menos del 0,2 % se recomienda establecer distancias mínimas de aislamiento de entre 85 y 150 metros. Otra medida recomendada por la Comisión Europea para lograr la coexistencia entre los cultivos, consiste en crecer maíz GM y maíz convencional en diferentes momentos de siembra^[88].

1.4.1.1 Antecedentes en Uruguay

En Uruguay el flujo de transgenes desde maíces GM a maíces no-GM, resulta ser un punto crítico en el marco de la política de coexistencia vigente en la actualidad. Como se comentó anteriormente, el país adoptó el concepto de “coexistencia regulada” para promover el desarrollo de los diferentes sistemas productivos (orgánico, GM o no-GM). Para hacer cumplir con esta política, la Comisión de Evaluación de Riesgos estableció como condición para la introducción del cultivo de maíz GM en el territorio, la implementación de una zona de amortiguación de 250 metros entre los cultivos transgénicos y no transgénicos^[61]. No obstante, en la actualidad esta distancia no siempre es respetada.

Se conoce que la interpolinización entre los cultivos decrece con la distancia, pero se ha encontrado que existe flujo de transgenes desde cultivos de maíz GM a cultivos no-GM, aún en situaciones en las que se respetan las distancias establecidas por la reglamentación^[89]. Este aspecto resulta de interés en Uruguay, para la conservación *in situ* de recursos genéticos locales, para la producción orgánica y para la producción de semilla de maíz de alta calidad. A pesar de la importancia del tema, existe una gran falta de publicaciones a nivel nacional sobre el grado de contaminación entre cultivos GM y no-GM.

En el año 2009, se llevó a cabo el primer estudio sobre flujo génico entre cultivos de maíz GM y no-GM en el país, desarrollado por la Facultad de Química y Agronomía en colaboración con el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de la Facultad de Ciencias (LaTraMA) y la Organización no gubernamental (ONG) REDES Amigos de la Tierra (REDES-AT). Los resultados de este estudio mostraron que, varias chacras de maíz no GM

“Detección y cuantificación de OGM en cultivos de maíz y en alimentos derivados mediante análisis molecular”

se encontraban bajo un potencial riesgo de contaminación cruzada por maíces transgénicos; ya sea por encontrarse próximas a las chacras con cultivos GM, o por haberse sembrado en fechas cercanas. En algunos casos, el análisis de la progenie de las chacras confirmó la presencia de transgenes, indicando una contaminación con polen de los cultivos GM vecinos. Al analizar las distancias entre los cultivos, se observó que dos de las chacras se encontraban a 40 y 100 metros de la plantación de maíz GM más cercana y que una se encontraba a distancias superiores a los 300 metros ^[89].

Dado el interés que suscitó este estudio en distintos actores vinculados al sector productivo, entre ellos la Comisión Nacional de Fomento Rural (CNFR), se creyó pertinente realizar una extensión del mismo, incrementando el número de casos y el área geográfica de muestreo. Con este fin, en el año 2011 comenzó a efectuarse el Proyecto financiado por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) “Flujo de transgenes entre cultivos comerciales de maíz en el Uruguay”, con la participación de investigadores de las Facultades de Química, Agronomía y Ciencias de la Universidad de la República (UdelaR) ^[90]. Como parte del proyecto, LaTraMA propuso utilizar técnicas moleculares basadas en el estudio del ADN, para detectar la presencia de transgenes en los cultivos no-GM, y de esta forma contribuir a la evaluación de la frecuencia con la que ocurre este fenómeno en Uruguay. En el marco de este proyecto, se realizó el presente trabajo de tesis.

1.5 Trazabilidad alimentaria

El *Codex Alimentarius* define a la **trazabilidad alimentaria** como la capacidad de rastrear un alimento desde su origen hasta el consumidor, dando lugar a una identificación fiable de sus ingredientes, un control sanitario y un seguimiento del alimento durante toda la cadena de producción ^[67]. Es por tanto, una herramienta fundamental al servicio de la calidad alimentaria; todos aquellos compuestos que forman parte de un alimento serán en consecuencia, susceptibles de ser sometidos a un proceso de trazabilidad. El seguimiento de los ingredientes desde la producción hasta la última etapa de elaboración del alimento, puede resultar difícil y muy costoso, por lo que suele recurrirse al análisis del producto pronto para consumir. Para lograr este fin, se han desarrollado varios métodos biotecnológicos que permiten detectar e identificar, de manera rápida y sencilla, los distintos componentes de una mezcla compleja ^[91].

“Detección y cuantificación de OGM en cultivos de maíz y en alimentos derivados mediante análisis molecular”

1.5.1 Alimento transgénico

El término “**alimento transgénico**” hace referencia a aquel que deriva de un organismo transgénico o genéticamente modificado. En su sentido más amplio, un alimento puede ser transgénico porque está formado en gran parte por materiales derivados de un OGM (por ejemplo polenta de maíz GM), o bien porque en su fabricación se emplearon microorganismos GM (levaduras, bacterias ácido-lácticas), o ingredientes que provienen de OGM (aceites, aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas, jarabes, almidón, lecitina, entre otras) ^[5].

La creciente toma de conciencia sobre la importancia de la dieta en la salud, junto con el reconocimiento de que la agricultura y la producción alimentaria tienen un impacto significativo en el medio ambiente, han estimulado la inquietud pública por la evaluación rigurosa de este tipo de alimentos. Los consumidores deben contar con información equilibrada de lo que representan estos productos, cuáles son sus beneficios y cuáles los riesgos potenciales. Las instancias científicas juegan un papel clave en la generación de conocimiento respecto a la utilización de los OGM y en la difusión de esta información. Cabe destacar que no existen, por el momento, datos científicos concluyentes sobre los efectos negativos del uso de los OGM en la salud humana, sin embargo los alimentos derivados de esta tecnología son más estudiados que los obtenidos por mejora tradicional ^[92]. Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, la evaluación científica de los nuevos alimentos transgénicos debe contemplar aspectos tales como: las características de los genes insertados y expresados, las consecuencias potenciales de la modificación génica, la inocuidad, toxicidad y alergenicidad de las nuevas proteínas expresadas, el valor nutricional del alimento y los cambios potenciales en la ingesta a corto, mediano y largo plazo, además de la presencia de restos de productos agrotóxicos ^[93].

1.5.2 Etiquetado de OGM

La información que debe ser suministrada al consumidor se encuentra regida por ley en la mayoría de los países, de manera que los ingredientes de los alimentos deben coincidir exactamente con lo descrito en las etiquetas. Cualquier etiquetado tiene como objetivo ofrecer información sobre el producto, que de otro modo no sería posible

identificar a simple vista. El motivo principal del etiquetado reside en poder “informar a los consumidores y permitirles ejercer su elección” [94].

En más de 60 países se ha introducido una legislación específica para el control de la producción de los OGM y de los alimentos que los contienen. No obstante, las disposiciones respecto al etiquetado de los mismos difieren considerablemente. En algunos países el etiquetado de OGM es de carácter obligatorio (p. ej., en la Unión Europea), mientras que en otros es simplemente voluntario, o no constituye un requisito exigible (p. ej., en EE.UU.) [95]. Estas posiciones se basan en dos aspectos diferentes que incluyen al “principio precautorio” y a la “equivalencia sustancial” (ver más adelante).

1.5.2.1 Etiquetado en la Unión Europea

En la Unión Europea, todos los países han desarrollado reglamentaciones para controlar la seguridad alimentaria. En particular, los alimentos derivados de OGM se encuentran regulados por el Reglamento (CE) N° 1829/2003 sobre “Alimentos y piensos modificados genéticamente” [96] y por el Reglamento (CE) N° 1830/2003 relativo a la “Trazabilidad y el etiquetado de los Organismos Genéticamente Modificados” [97]. En ellos se establece que los alimentos genéticamente modificados deben etiquetarse si difieren de sus respectivos no-GM, en características tales como la composición, valor nutritivo o uso propuesto. Un nuevo alimento o ingrediente GM ya no se considera como equivalente a otro existente no-GM, si la proteína o el ADN transgénico puede ser detectado. Los mismos disponen que todos los productos que contengan OGM, consistan en OGM o estén producidos a partir de OGM, deben ir etiquetados como tales. No obstante, no se exige el etiquetado a los alimentos que incluyan OGM en una proporción no superior al 0,9% (de los ingredientes individualmente considerados), límite asumido para que una presencia sea accidental o técnicamente inevitable. Asimismo, la UE ha establecido un umbral de 0,5% para aquellos OGM que cuentan con una evaluación de riesgo favorable, pero que todavía no han recibido la autorización administrativa correspondiente en la UE. Estos umbrales fueron establecidos teniendo en cuenta la realidad de los mercados, la globalización de los intercambios comerciales, las obligaciones logísticas, la diseminación en el medio ambiente, el flujo génico, entre otros aspectos. Se considera que en la cadena alimentaria pueden llegar a introducirse OGM involuntariamente, durante el cultivo de las semillas, en la recolección, el transporte, el almacenamiento o en la transformación de las

“Detección y cuantificación de OGM en cultivos de maíz y en alimentos derivados mediante análisis molecular”

mismas en el producto de consumo. Las trazas de ADN o de proteína derivada de un OGM, únicamente son tolerables si se puede demostrar que se han hecho todos los esfuerzos posibles para excluirlos de la preparación de los ingredientes y de las comidas ^[96, 97].

Actualmente en la Unión Europea, los productos GM se examinan más rigurosamente que aquellos procedentes de otros métodos de generación de nuevas variedades. Esto no se debe necesariamente a que presentan riesgos mayores, sino que se trata de un **plan de precaución** hasta que se haya ganado mayor experiencia en el uso de la tecnología ^[92].

1.5.2.2 Etiquetado en Estados Unidos

En los EEUU las reglamentaciones no requieren actualmente el etiquetado obligatorio ni la separación de cultivos y productos modificados genéticamente. La organización responsable de la reglamentación de la seguridad alimentaria, incluida la seguridad alimentaria de las nuevas variedades de plantas, aditivos alimentarios y agentes de procesado, es la *Food and Drug Administration* (FDA). Ésta tiene en cuenta el etiquetado de los alimentos derivados de nuevas variedades de plantas, pero no tiene requisitos de etiquetado especiales para los alimentos GM. Se considera que estos últimos no son diferentes de otros alimentos (son **“sustancialmente equivalentes”**) y por lo tanto, no presentan algún motivo de preocupación distinto o mayor, que los alimentos desarrollados mediante la mejora vegetal tradicional ^[98]. Los requisitos de etiquetado que se aplican a los alimentos en general, se aplican también a los alimentos GM. Bajo esta legislación, la introducción de un transgén en un cultivo no daría lugar a la necesidad de evaluar el alimento, a no ser que el gen introducido en la variedad codifique para un producto que nunca antes había sido componente de otro alimento. Si el alimento fuera modificado de esa manera, constituiría un alimento nuevo y requeriría permiso reglamentario.

La principal diferencia entre la reglamentación europea y la estadounidense se encuentra en el enfoque del etiquetado. En Estados Unidos, el etiquetado se exige de manera legal para dar información suficiente que alerte e instruya al consumidor; se considera que la información adicional e innecesaria, entra en conflicto con el derecho de realizar una elección informada y reduce la efectividad del etiquetado. En la UE, el etiquetado se percibe como una ayuda para que los consumidores hagan una elección

informada, al indicar el uso de OGM o la presencia de ingredientes derivados de OGM. Asimismo, intenta cumplir con los requisitos de seguridad y nutrición para el correcto etiquetado de los ingredientes ^[92].

1.5.2.3 Etiquetado en Uruguay

En el año 2008, a raíz del Decreto N° 353/008 sobre “Normas relativas a Bioseguridad de vegetales y sus partes genéticamente modificadas”, Uruguay adopta el 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 ^[70].

En los años subsiguientes, varias organizaciones no gubernamentales del país (REDES-AT, *SlowFood*, PROCON) se preocuparon en generar una nueva legislación al respecto. A mediados del año 2013, comenzó a redactarse un proyecto de ley para exigir el etiquetado obligatorio de los alimentos compuestos, o derivados de organismos genéticamente modificados ^[99]. Las exigencias específicas de esta propuesta se enmarcaron dentro de normas vigentes en el país, como la ley N° 17.250 de Defensa al consumidor ^[100] y las Normas generales de etiquetado aplicables a los productos destinados al consumo humano, comprendidas en el reglamento técnico del MERCOSUR ^[101]. Cabe destacar, que esta propuesta se basa en las normas sobre seguridad alimentaria de la Unión Europea y proclama que el Estado debe ser responsable de las medidas de inspección y control de los productos, incluido el control por muestreo y los análisis cualitativos y cuantitativos de los alimentos.

Si bien el proyecto de ley aún no ha sido aprobado en el país, a fines del año 2013, la Junta Departamental de Montevideo aprobó el **Decreto N° 34.901**, que establece la obligatoriedad del etiquetado de los alimentos genéticamente modificados que se comercializan en la capital. Este decreto ya se encuentra reglamentado, y se destaca en particular la reglamentación del artículo D.1774.83 del Capítulo XXIX.I, del Título II, del Volumen VI, del Digesto Departamental, según la Resolución N° 4178/14. Esta normativa establece que *“los alimentos que han sido manipulados genéticamente o que contienen uno o más ingredientes provenientes de éstos que superen el 1% de los componentes individualmente considerados, deberán ser etiquetados”* ^[102]. El decreto comenzó a aplicarse en Montevideo en enero del corriente año (2015). El umbral de 1% fue

“Detección y cuantificación de OGM en cultivos de maíz y en alimentos derivados mediante análisis molecular”

establecido para facilitar el comercio internacional con países que tienen una política vigente de etiquetado de alimentos GM, tales como Brasil (etiquetado a partir del 1% de material GM) y la Unión Europea (etiquetado a partir del 0,9% de material GM). A la vez, este umbral contempla una posible contaminación por cruzamiento de polen entre los cultivos GM y no-GM o por una mezcla de semillas durante las etapas de transporte, almacenamiento y procesamiento de los productos agrícolas.

El Laboratorio de Bromatología de la División Salud de la Intendencia de Montevideo, es el ente encargado de hacer cumplir con el nuevo Decreto departamental. Para lograr este objetivo, la Unidad de Bromatología consolidó en el año 2012, un convenio con la Facultad de Ciencias, en particular con el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de la Sección Bioquímica. En este marco, se estableció una cooperación mutua y la transferencia tecnológica desde Facultad, para llevar a cabo la ejecución de tareas de identificación de especies animales y vegetales, incluyendo a los Organismos Genéticamente Modificados en alimentos de consumo masivo del mercado uruguayo ^[103].

Teniendo en cuenta que los organismos estatales deben ser capaces de hacer cumplir con la nueva legislación referente al etiquetado de OGM, resulta imprescindible contar con herramientas analíticas de uso rápido y sencillo en los laboratorios de control. Es por ello que en el marco del convenio vigente, LaTraMA se ha propuesto desarrollar y validar técnicas moleculares para detectar, identificar y cuantificar componentes GM en semillas, piensos y finalmente en los alimentos de consumo masivo. En base a este objetivo se ha realizado el segundo trabajo experimental de esta tesis.

1.6 Técnicas de detección de OGM

La base de todas las técnicas descritas para la detección de OGM consiste en evidenciar las diferencias entre la variedad no modificada y la variedad modificada, en este caso concreto, la introducción de nuevas características en las plantas transgénicas. Esto puede realizarse detectando el ADN transgénico insertado, detectando la nueva proteína expresada, o en el caso de que la proteína actúe como enzima, utilizando el análisis químico para detectar el producto de la acción enzimática ^[104].

Existen dos métodos comúnmente utilizados para detectar modificaciones genéticas en plantas; uno de ellos es el conocido **ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA)**, con el que se estudia la presencia de proteínas específicas, explotando la especificidad de la unión entre el antígeno expresado y un anticuerpo diana; el otro mayormente utilizado es la reacción en **cadena de la polimerasa (PCR)** ^[105], basada en la detección de secuencias de ADN insertadas en el genoma de la planta. Estos métodos indican si hay o no, presencia de OGM en la muestra y también pueden dar una estimación de su contenido ^[106].

El uso de la técnica de ELISA para la detección de OGM muchas veces se encuentra limitado por el bajo contenido de proteínas expresadas por el transgén, o por la degradación de las mismas durante el procesado del alimento. Sin embargo, los métodos basados en ADN resultan ser más específicos y sensibles. La PCR permite la amplificación selectiva de segmentos específicos de ADN presentes con baja frecuencia, en una mezcla conteniendo otras secuencias de ADN. Mientras que los alimentos crudos pueden identificarse fácilmente como GM, la detección es más difícil cuando éstos se encuentran procesados; los alimentos procesados contienen ADN degradado y sustancias que interfieren incluso con la reacción de PCR. Aunque la PCR funciona con trozos relativamente pequeños de ADN, cuanto más procesado esté el alimento, más difícil será la detección del transgén ^[107].

Es posible diferenciar tres etapas en el proceso de detección de OGM en alimentos. La primera etapa consiste en la detección cualitativa o **rastreo de OGM** (*screening* de OGM), cuyo fin es evidenciar la presencia o ausencia de material GM en una muestra. Para ello, se buscan secuencias comunes entre distintos eventos transgénicos, de modo de abarcar la mayor cantidad de los OGM liberados. La segunda etapa es la de **identificación**, cuyo objetivo es determinar específicamente cuál o cuáles son los eventos que están presentes, de modo de descifrar si se trata de eventos aprobados o no aprobados. La tercera etapa consiste en la **cuantificación**, cuyo propósito es determinar el contenido porcentual de OGM en el alimento, para evaluar si requiere o no el etiquetado ^[108, 109] (Figura 9).

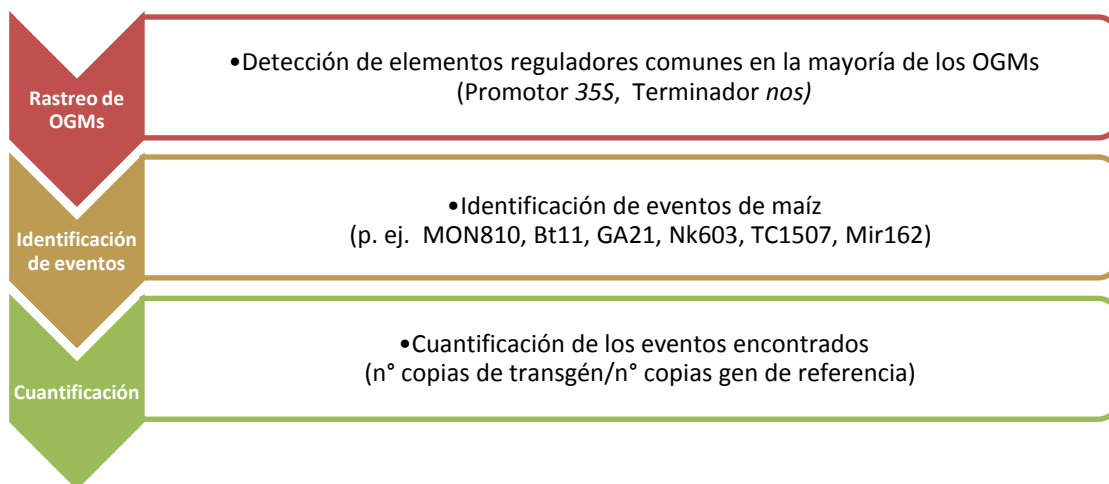


Figura 9. Proceso de detección de OGM en alimentos. El procedimiento general para la detección de OGM consiste en tres etapas fundamentales: 1. *Rastreo* de OGM: se detecta la presencia de OGM, dirigiendo la búsqueda hacia secuencias comunes presentes en distintos eventos. 2. *Identificación* de eventos específicos. 3. *Cuantificación* de los OGM encontrados.

1.6.1 Métodos cualitativos de detección de OGM por PCR

Existen varios niveles de especificidad para el análisis de detección de transgenes por PCR, dependiendo del blanco al cual están dirigidos los cebadores (Figura 10). En grado creciente de especificidad se encuentran las siguientes estrategias de detección: **rastreo de OGM** (*screening*), detección **específica de gen**, detección **específica de construcción** y detección **específica de evento**. La diferencia entre ellas reside en la secuencia diana a la cual se unen los cebadores dentro de la construcción del transgén (o *cassette* de expresión). Estas pueden ser: el *promotor*, un *gen introducido*, el *terminador*, o la unión entre dos de estos elementos. El elemento *promotor* sirve como una señal de comienzo para la expresión génica y por consiguiente, para la producción de la proteína de interés. En más del 90% de las variedades de plantas GM liberadas, se utiliza el promotor *35S* del Virus del Mosaico del Coliflor (CaMV) ^[57]. El *gen introducido* codifica para una proteína nueva que confiere a la planta cierta característica de interés (p. ej. el gen de la proteína *cry1AB* para la resistencia a insectos). Los genes introducidos pueden existir naturalmente o pueden ser totalmente sintéticos. La *secuencia terminadora* es la señal de finalización para la expresión de la proteína de interés. Aproximadamente el 70% de las plantas transgénicas liberadas, tienen en su construcción al terminador del gen de la enzima *nopalina sintasa (nos)* de *Agrobacterium tumefaciens* ^[57]. A su vez, otros elementos pueden estar presentes en una construcción transgénica. Por lo general, su propósito es

controlar y estabilizar la función del gen para asegurar la presencia de la construcción en el OGM, o para facilitar la combinación de los diversos elementos en el constructo ^[110]. Debe tenerse en cuenta que estos elementos pueden originarse a partir de organismos de tipo salvaje, pueden estar presentes en más de una copia y en más de un evento transgénico; Incluso pueden ser combinados de una manera similar en más de un OGM. De este modo, la elección del método debe ajustarse a la finalidad del análisis ^[111].

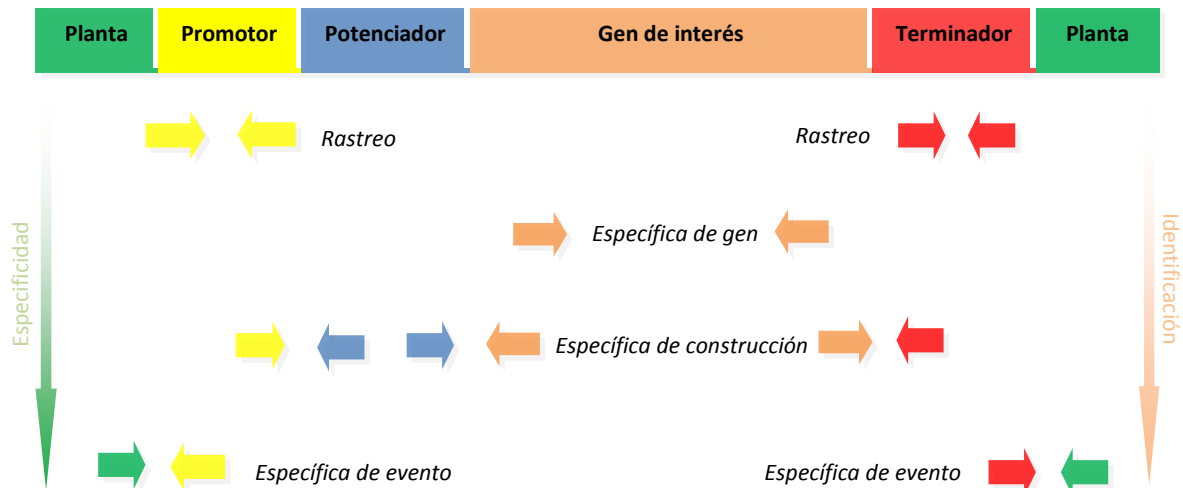


Figura 10. Representación esquemática de un evento transgénico tipo. De arriba hacia abajo se muestran las estrategias de detección e identificación por PCR en grado creciente de especificidad. Las flechas horizontales indican la ubicación de los cebadores. Tomado y modificado de ^[110].

1.6.1.1 Estrategia de rastreo (*screening*) de OGM

En el primer nivel de especificidad, se encuentra el rastreo o *screening de OGM*, que es capaz de detectar a la mayoría de los eventos transgénicos autorizados actualmente. El mismo se basa en la detección de las secuencias de control, como promotores y terminadores, que flanquean al gen que se introducirá en la planta. Dentro de las secuencias reguladoras más utilizadas, se encuentra el *promotor CaMVp35S* y el *terminador nos*. Este tipo de aproximación no sirve para determinar específicamente los eventos transgénicos, sino que establece en primera instancia, si la muestra contiene o no rastros de material genéticamente modificado. Si bien tienen la ventaja de poder detectar la presencia de varios eventos en un solo ensayo, no existe un único rastreo que detecte a todos los OGM, debido a que existen eventos que poseen promotores y terminadores

distintos a los mencionados (p. ej., Promotor FMV del virus del mosaico del higo y el terminador t-HSP17 de la proteína de *heat shock* del trigo). Son métodos cualitativos, cuya sensibilidad suele estar en el entorno del 0,01% de material GM ^[109].

1.6.1.2 Estrategia específica de gen

En el segundo nivel de especificidad tenemos a la estrategia *específica de gen* o de característica (*trait-specific*). Estas toman como blanco a los genes activos del transgén, como el gen *cry1Ab* de los eventos de maíz MON810 y Bt11, o el *pat* del evento Bt11. Las mismas dan información sobre las características fenotípicas de un OGM, o la posible presencia de un grupo de eventos con cierta característica en una muestra. Sin embargo, no son aptas para identificar cuál es el evento específico presente, ya que el gen buscado puede haber sido utilizado en varios OGM diferentes (p. ej., el gen de resistencia a lepidópteros en los eventos de maíz MON810 y Bt11).

1.6.1.3 Estrategia específica de construcción

En el tercer nivel de especificidad se encuentran las estrategias de detección *específicas de construcción*. Este tipo de aproximación toma como blanco a secuencias de unión dentro de la construcción del transgén, por ejemplo al borde entre el promotor y el gen, o entre el gen y el terminador. Mediante esta estrategia se acotan las posibilidades de encontrar numerosos eventos, pero sigue siendo menos específica que el método de identificación *evento específico* ya que existen varios OGM que comparten las mismas construcciones.

1.6.1.4 Estrategia específica de evento

Por último, la estrategia *evento específica* permite identificar un único evento de transformación. Son las que logran mayor especificidad ya que tienen como blanco de detección a la secuencia comprendida en el sitio de unión entre el ADN transgénico y el genoma del huésped, que es único para cada evento de transformación ^[108].

A pesar de la especificidad, estos métodos tienen algunas limitaciones. Existen cruzamientos entre líneas de plantas GM diseñadas para generar eventos apilados

(*stacked*) en la descendencia, que se consideran como nuevos eventos transgénicos. Estos métodos son incapaces de distinguir entre un evento apilado, por ejemplo el evento MON810 x NK603, y la mezcla de los OGM parentales MON810 y NK603 ^[112].

1.6.2 Métodos de cuantificación de OGM por PCR en Tiempo Real

1.6.2.1 Fundamentos de la qPCR

De acuerdo con las regulaciones actuales la cuantificación resulta ser esencial para el etiquetado de OGM en alimentos. La técnica de PCR en Tiempo Real (qPCR) representa una metodología práctica, rápida y confiable para ser utilizada con este fin ^[10]. La amplia mayoría de los trabajos publicados para detectar OGM en matrices complejas, se respaldan en esta técnica ^[113-121]. A diferencia de la PCR en punto final, los sistemas de PCR en tiempo real monitorizan la cantidad de producto a medida que la reacción tiene lugar. En este tipo de sistema, la PCR se acopla a la emisión de una señal fluorescente proporcional a la cantidad de producto generado en cada ciclo sucesivo de reacción. El primer incremento significativo de la fluorescencia se correlaciona con la cantidad inicial del molde de ADN diana ^[122]. A medida que progresa la reacción de PCR, se recogen los datos de fluorescencia (valores Rn) y se construye un gráfico respecto al tiempo de reacción (número de ciclos) (Figura 11).

La cuantificación se efectúa en la fase de crecimiento exponencial de la cantidad de ADN amplificado. El número de ciclo en el cual la emisión de la intensidad de fluorescencia se eleva por encima del ruido de fondo, se conoce como **ciclo umbral**, o **Ct** ^[123]. Cuanto mayor es la cantidad inicial de ADN genómico, antes se detecta el producto acumulado y más bajo resulta el valor de Ct. La cuantificación se realiza comparando el número de ciclo, Ct, en el cual la muestra problema alcanza un mismo nivel de fluorescencia que una muestra patrón, cuya concentración inicial o número de copias de ADN es conocida ^[124]. Si en cada ciclo de PCR se duplica el número de moléculas (asumiendo una eficiencia de la reacción del 100%), el valor de Ct debe ser proporcional al número de copias de ADN inicial en la muestra.

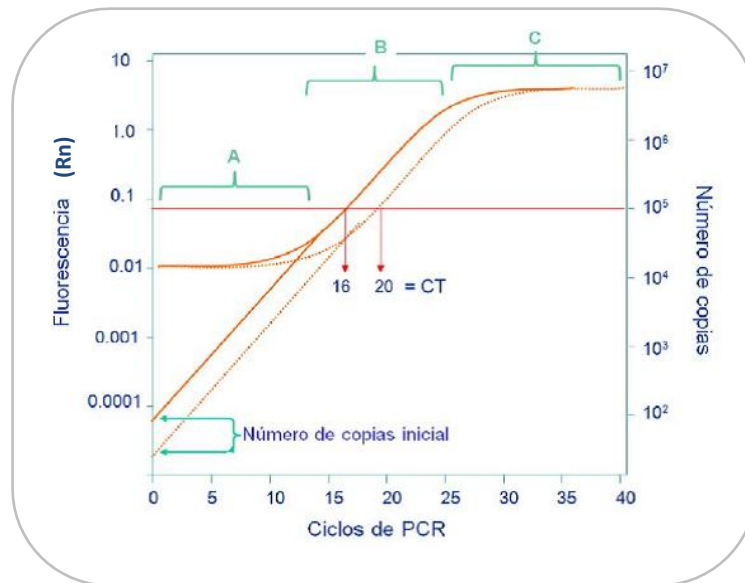


Figura 11. Esquema de las diferentes etapas de la detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real. En “A” sólo se detecta fluorescencia de fondo. En los ciclos incluidos en “B” se observa incremento exponencial de fluorescencia y es posible realizar medidas tanto cualitativas como cuantitativas. En “C” la reacción ha llegado a saturación o agotamiento de los reactivos, el nivel de fluorescencia se iguala independientemente de la cantidad de DNA de partida y la medida sólo es relevante como dato cualitativo (tiempo final). El Ct de cada muestra representa el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el nivel de referencia (umbral), y es proporcional al número de copias de DNA iniciales en la reacción. Tomado y modificado de ^[123].

El **número de copias de ADN** cuando se alcanza el nivel de fluorescencia de referencia, N_{Ct} , será proporcional al número de copias diana inicial, N_i , según la ecuación:

$$N_{Ct} = N_i \times 2^{Ct}$$

Dado que experimentalmente, la cantidad de ADN producida en cada ciclo puede no ser exactamente el doble de la presente en el ciclo previo, se puede proponer una forma más general de la ecuación anterior:

$$N_{Ct} = N_i \times (1 + E)^{Ct}$$

en la que **E es la eficiencia de la reacción** de PCR, es decir, el número medio de copias de producto de reacción por ciclo de PCR ^[123]. La eficiencia puede ser calculada experimentalmente, tomando el valor de la pendiente de una curva de calibración

realizada con diluciones seriadas de un estándar de ADN de concentración conocida (Ct vs log [ADN]). E se calcula de acuerdo a la fórmula:

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

El cálculo de la eficiencia de PCR es importante en los métodos de cuantificación, ya que permite realizar comparaciones entre datos obtenidos a partir de amplificaciones independientes.

1.6.2.2 Sistemas de detección por fluorescencia

La especificidad del método de PCR en Tiempo Real depende del reactivo fluorescente utilizado para generar la señal de amplificación y del instrumento empleado para monitorearla. Los sistemas de detección por fluorescencia utilizan actualmente dos tipos de reactivos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos [125].

Los **agentes intercalantes** son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el *SYBR[®] Green*. A medida que la reacción de PCR avanza, el producto amplificado se acumula, una mayor proporción de moléculas de *SYBR[®] Green* se unen a las dobles hebras de ADN generadas, lo que resulta en un aumento de la señal de fluorescencia (Figura 12) [126].

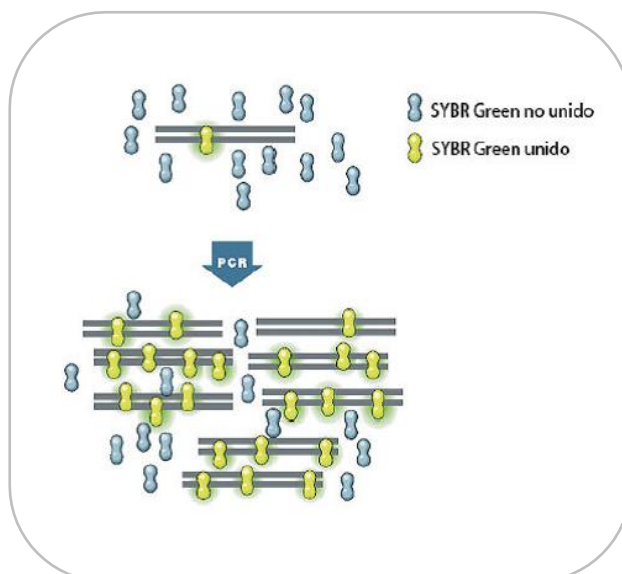


Figura 12. Detección de productos de amplificación mediante agentes intercalantes fluorescentes (*SYBR[®] Green*). El colorante se une al surco menor del ADN bicatenario, pero no al ADN monocatenario. Como consecuencia de esta unión, se produce un incremento de la señal fluorescente (representado en color verde). Debido al aumento de la cantidad de ADN recién sintetizado tras cada ciclo del PCR, la emisión de fluorescencia aumenta en proporción al número de moléculas del DNA bicatenario presentes en la mezcla. Tomado de [126].

La ventaja de la utilización del *SYBR® Green* es su simplicidad y capacidad de detectar concentraciones bajas de ADN de doble cadena, además de ser más económico que las sondas específicas. La principal desventaja es su falta de especificidad. El *SYBR® Green* se intercalará a cualquier secuencia de doble cadena, dificultando la distinción entre el ADN diana y la amplificación de secuencias no objetivo o de dímeros de cebadores. Por esta razón, resulta prudente verificar si se está amplificando la secuencia diana u otro artefacto, para lo cual se implementa el análisis de la curva de disociación (*melt curve*)^[127].

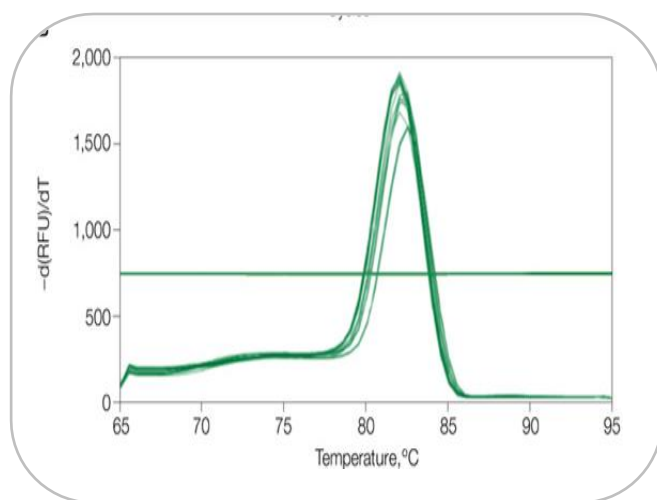


Figura 13. Curva de disociación (Melt curve). Curva de disociación típica generada a partir de los datos recolectados del análisis de qPCR utilizando el colorante *SYBR® Green*. Mediante la comparación de las temperaturas de *melting* de los productos de PCR de cada muestra, se puede detectar la presencia de la secuencia diana, la presencia de un amplicón no objetivo adicional, o la formación de dímeros de cebadores. Tomado de^[126]

El principio del análisis de la **curva de disociación** reside en aumentar la temperatura para que todas las hebras de ADN que se encuentren en doble cadena, se disocian a simple hebra. De esta forma, las moléculas de *SYBR® Green* que se encontraban unidas al ADN de doble cadena se liberan, lo que se observa como una disminución de la fluorescencia. En una curva de disociación típica, se representa la intensidad de fluorescencia frente a la temperatura y se traza la primera derivada negativa ($-d(RFU)/dT$) (Figura 13). Esta derivada representará un pico característico a cada amplicón, conocido como temperatura de disociación (*melting temperature*). La **temperatura de melting** o ***T_m***, es la temperatura a la cual el 50% de los pares de bases de un dúplex de ADN se separan. La misma dependerá del tamaño del ADN de doble cadena y de su composición en bases nitrogenadas. Cuanto mayor sea el contenido de GC y más grande sea el tamaño de amplicón, más alta será la temperatura de disociación. Mediante la comparación de las *T_m* de los amplicones conocidos, se puede detectar fácilmente la presencia de un amplicón no objetivo adicional, o de la formación de dímeros de cebadores^[128].

Respecto a las sondas específicas, las más utilizadas para PCR en Tiempo Real son las sondas de hibridación (FRET) y las sondas de hidrólisis (principio *TaqMan*[®]) [128]. Las **sondas FRET** son oligonucleótidos especialmente diseñados para reconocer e hibridar con una secuencia de ADN específica, y que tienen acoplado químicamente en uno de sus extremos, un colorante fluorescente. Para que la reacción funcione deben diseñarse dos sondas, una marcada con un fluorocromo donante (por ejemplo, 3'-fluoresceína) y la otra con un aceptor (por ejemplo, 5'-Red). Una vez que las sondas hibridan juntas en la secuencia de ADN diana, la energía emitida por el oligonucleótido marcado en 3' se transfiere mediante la llamada transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), al oligonucleótido marcado en 5'. De esta forma el colorante en 5' emite luz a una longitud de onda más larga. A medida que ocurre la reacción de PCR, la enzima ADN polimerasa hidroliza a las sondas de hibridación, lo que genera una pérdida de la fluorescencia que se analiza en un perfil de fusión (Figura 14). El diseño de las sondas es crucial para el rendimiento óptimo, ya que ambos deben hibridar a una distancia muy próxima del otro (de uno a cinco nucleótidos) en la secuencia de ADN [129].

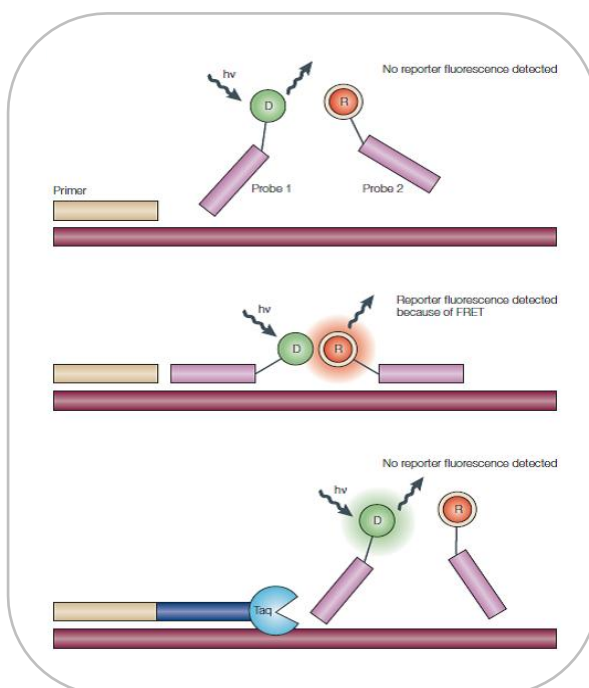


Figura 14. Sondas de hibridación. Principios de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). La secuencia de ADN diana se detecta con dos sondas de hibridación marcadas con fluorocromos, un colorante donante (D) y otro aceptor (R). Cuando ambos se hibridan muy próximos, la excitación del colorante donante conduce a la emisión de fluorescencia por el colorante indicador (R). A medida que ocurre la reacción de PCR, la ADN polimerasa corta a las sondas de hibridación, generando una pérdida de la fluorescencia que se analiza en un perfil de fusión [130].

Las **sondas de hidrólisis *TaqMan*[®]**, aprovechan la actividad exonucleasa 5'-3' de la enzima ADN polimerasa para generar fluorescencia durante la reacción de PCR. La sonda de hidrólisis suele ser un oligonucleótido de 20-30 bases de longitud, que contiene un

colorante fluorescente en el extremo 5' y un colorante inhibidor en el 3' (*quencher*). Durante la PCR, la sonda se hibrida específicamente a la secuencia diana entre los sitios de los cebadores directo y reverso. Cuando la sonda está intacta, la proximidad del colorante fluorescente al *quencher* produce la supresión de la fluorescencia. A medida que transcurre la reacción, la actividad exonucleasa 5'-3' de la ADN polimerasa degrada la sonda entre el fluoróforo y el *quencher*, únicamente si la sonda se hibrida con el ADN diana (Figura 15). De esta manera, la fluorescencia aumenta a medida que progresa la amplificación. La acumulación de producto de la PCR se detecta monitorizando el incremento de la fluorescencia del colorante fluorescente. Este proceso tiene lugar en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto ^[131].

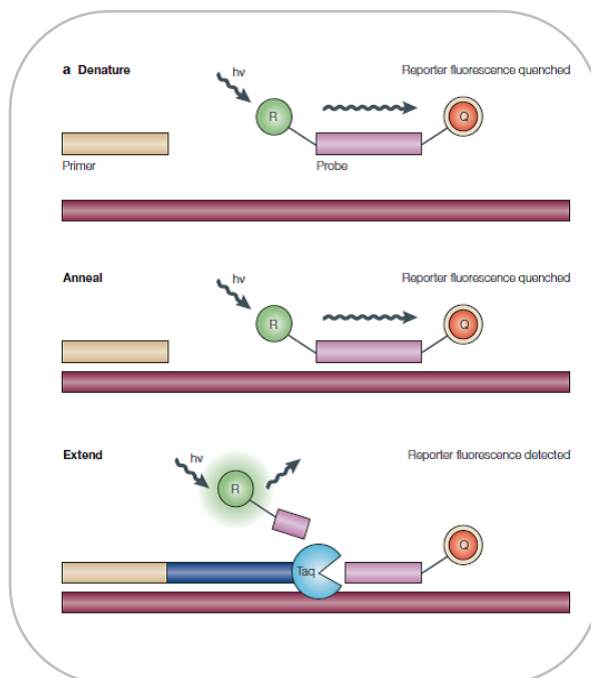


Figura 15. Funcionamiento de las Sondas TaqMan®. La actividad nucleasa de 5' de la ADN polimerasa, corta a la sonda de hidrólisis durante la etapa de extensión del amplicón, lo que produce una emisión de fluorescencia en cada ciclo de PCR. Esta emisión es proporcional a la cantidad de producto formado. Tomado de ^[130].

A diferencia de las sondas FRET, las sondas de degradación *TaqMan*®, liberan fluorocromos en cada ciclo de reacción y como consecuencia la señal de fluorescencia se potencia. A su vez el ensayo *TaqMan*® utiliza condiciones de PCR y parámetros de ciclos térmicos universales, lo que facilita la estandarización de los ensayos de detección.

Por último, las sondas *TaqMan*® pueden sintetizarse acopladas a una pequeña molécula que se une al surco menor del ADN bicatenario, conocida como MGB del inglés *minor groove binder-DNA* ^[132]. El grupo MGB se encuentra unido al extremo 3' de la sonda *TaqMan*® junto al *quencher*. Cuando la sonda se hibrida a la secuencia diana, el MGB

estabiliza la unión incorporándose al surco menor del ADN bicatenario (Figura 16). Esta unión aumenta la estabilidad de la sonda permitiendo un diseño más corto de la misma (normalmente de 13 a 20 bases), en comparación con las sondas *TaqMan*[®] estándar (de 18 a 40 bases). Las sondas *TaqMan*[®]-MGB presentan ventajas para la PCR cuantitativa, especialmente para los ensayos en *múltiplex*. El aumento de especificidad en la hibridación permite la discriminación más precisa de las secuencias diana. Además, al ser una sonda más pequeña facilita el diseño de ensayos y permite una mayor precisión.

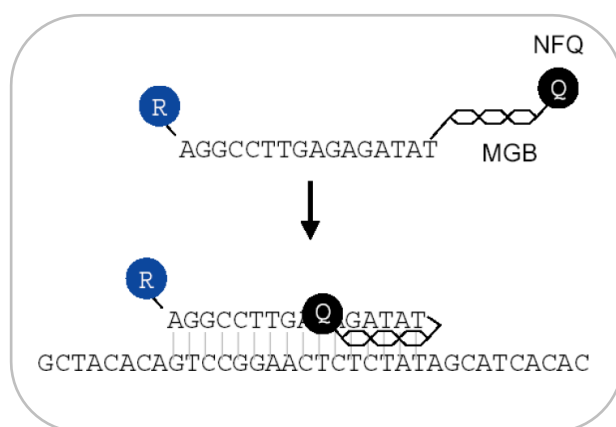


Figura 16. Principios de las sondas unidas a MGB. Cuando la sonda se hibrida a la secuencia diana, el MGB estabiliza la unión incorporándose al surco menor del ADN bicatenario. R: Fluoróforo, MGB: *minor groove binder-DNA*, Q: *quencher*. Tomado de ^[104]

1.6.2.3 Cuantificación de OGM en alimentos

El contenido de OGM de un alimento se expresa por ingrediente, calculando la cantidad relativa de material GM en el total de material que compone al alimento. Cabe destacar, que todos los ingredientes de un alimento (p. ej. harina, sémola, aceite), derivados de una misma especie (p. ej. maíz), se consideran colectivamente un solo ingrediente, por lo que se analiza por separado de los demás componentes del alimento.

Siguiendo la normativa de Uruguay (Montevideo), un alimento a base de maíz que contenga más del 1% de maíz GM, deberá ser etiquetado como “*alimento genéticamente modificado*” o, “*producido a partir de maíz genéticamente modificado*”. Por el contrario, si contiene menos de un 1% de material GM, no será obligatorio el etiquetado del mismo.

Por otra parte, si un alimento además de contener maíz GM, contiene soja GM, el porcentaje de material genéticamente modificado deberá expresarse para cada ingrediente (especie) individualmente, sin realizar la suma de los porcentajes ^[104]. Si por ejemplo, un alimento contiene 0,5% de maíz GM y 1,2% de soja GM, deberá ser etiquetado únicamente para el ingrediente soja.

Para determinar el porcentaje de OGM en un sistema basado en la PCR en Tiempo Real, es necesario medir el número de secuencias de ADN específicas del OGM y normalizarlo con el número de secuencias de un gen de referencia endógeno de la especie correspondiente. El **porcentaje de OGM** se calcula de la siguiente manera ^[133]:

$$\text{OGM (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de copias GM}}{\text{n}^{\circ} \text{ de copias de referencia}} \times 100$$

El **gen de referencia endógeno** debe escogerse de manera que sea específico de la especie, esté presente en una sola copia por genoma haploide, se encuentre estable en líneas diferentes de la misma especie y sea fácil de amplificar. Algunos ejemplos de genes de referencia endógenos corresponden a: lectina (*Le*) en el caso de la soja; invertasa (*ivr*), zeína (*zeine*), alcohol deshidrogenasa (*adh1*), o proteínas del grupo de alta movilidad (*hmg*) en el maíz ^[134].

Aunque en ocasiones se indica como cuantificación absoluta un resultado obtenido en unidades de masa de ADN, en sentido estricto mediante PCR en tiempo real, sólo es posible cuantificar el número de copias de ADN presente al inicio de la reacción. Por tanto, la cuantificación debe expresarse en número de copias del ADN diana ^[123].

Existen dos enfoques generales para la cuantificación de OGM en alimentos mediante PCR Tiempo Real: el método de las **curvas patrón** (cuantificación absoluta) y el método de **comparación de Ct** (cuantificación relativa o ΔCt) ^[104]. En el primer método, se procede a realizar dos curvas patrón utilizando materiales de referencia; una para el sistema de cuantificación específico del OGM y la otra para la cuantificación del gen de referencia. Para cada muestra, se determinan mediante interpolación con las curvas patrón, las cantidades correspondientes a la diana GM y al gen de referencia. Luego se calcula el porcentaje GM según la fórmula anterior. Para utilizar las curvas de calibración es necesario comprobar que las eficiencias de amplificación del ADN estándar y el de la muestra son comparables. El diseño de las curvas de calibración, su preparación, la determinación exacta de las concentraciones de los estándares, su estabilidad a largo plazo y su almacenamiento, son factores que pueden afectar a los resultados, ya que la cuantificación del ADN en el PCR en Tiempo Real depende especialmente de la precisión de los estándares empleados ^[123].

Por otro lado, en el método de comparación de Ct no se utilizan cantidades conocidas de patrones sino que se comparan los valores de ΔCt (Ct gen de referencia - Ct OGM) obtenidos para la muestra, respecto a los valores de ΔCt obtenidos para un control de referencia de la forma:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ referencia muestra} - Ct \text{ OGM muestra}) - (Ct \text{ referencia control} - Ct \text{ OGM control}).$$

Para realizar esta aproximación no es necesario conocer las cantidades absolutas de ninguno de los ADN que se analizan. Las rectas de calibración se utilizan para establecer las eficiencias de amplificación de los dos genes que se comparan, pero no se utilizan para extrapolar las cantidades de ADN en la muestra. Para que este método dé buenos resultados, es preciso que las eficiencias de amplificación del OGM y del gen de referencia sean similares. De esta forma se puede calcular el porcentaje de OGM, mediante la ecuación ^[123]:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100$$

El siguiente ejemplo ilustra cómo debe realizarse el cálculo del porcentaje de OGM de una muestra mediante el método de comparación de Ct (Tabla 4).

Tabla 4. Cálculo del contenido de OGM de una muestra de alimento. La cantidad de OGM (Ct OGM) se normaliza con la del gen de referencia (Ct referencia) para luego comparar los niveles relativos entre la muestra y el control. Tomado y modificado de ^[125]

MUESTRA	Ct (referencia)	Ct (OGM)	ΔCt Ct (referencia) - Ct (OGM)	Nº copias de OGM / copias totales de ADN de planta $2^{-\Delta Ct}$	Relación Snack/Control $2^{-\Delta\Delta Ct}$
<i>Snack</i>	21	26	5	0.031 o 3.1%	3.1/0.2 15 veces
<i>Control</i>	20	29	9	0.002 o 0.2%	

Comparando los valores de Ct en la tabla, se obtiene que la muestra de *snack* contiene 3.2% de material GM, mientras que la muestra control contiene 0.2%. Se deduce que la muestra de *snack* tiene 15 veces más material GM que la muestra control ^[126].

Otra manera de emplear el método de comparación de Ct, es construyendo una curva patrón con los valores obtenidos de ΔCt (Ct gen de referencia - Ct OGM) para varios estándares de cantidades conocidas de OGM. Luego, se calcula el ΔCt de la muestra problema, se interpola en la curva obtenida y se estima el valor de OGM ^[123].

1.6.2.4 Consideraciones para la cuantificación de OGM

Para poder llevar a cabo el cálculo del porcentaje de OGM en una muestra de alimento, es necesario contemplar algunos parámetros importantes que incluyen: (i) la **ploidía** del evento de transformación, (ii) la **cigosidad** del evento y (iii) el **número de inserciones** de la construcción génica. Es posible que la modificación génica tenga una ploidía diferente de la línea isogénica convencional (p. ej., ser tetraploide en vez de diploide), asimismo puede ser que el carácter GM difiera entre una forma homocigota, heterocigota o hemicigota y que la construcción génica se inserte en una única copia o en varias copias por genoma haploide. Los dos primeros puntos se resuelven empíricamente utilizando materiales de referencia homogéneos y similares a la muestra (p. ej. material de referencia de harina de maíz para cuantificar alimentos producidos a partir de harina de maíz). Alternativamente, pueden utilizarse materiales de referencia en formato de plásmidos con secuencias de ADN clonadas, a fin de corregir las discrepancias moleculares en la cuantificación. Una manera de abordar los problemas relacionados con la ploidía y la cigosidad, es expresar el porcentaje de OGM en términos de genomas haploides. Finalmente, el último punto puede obviarse si se diseña un sistema cebador-sonda en la frontera de la inserción de la construcción genética en el genoma de la planta (método *evento específico*). Como estas secuencias de unión son únicas para cada evento, el sistema presentará la doble ventaja de ser específico del evento y excluir de la cuantificación a las inserciones múltiples de la misma construcción genética. En cualquier caso, al desarrollar los métodos de detección es preciso tener en cuenta estos aspectos, dado que el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se ven influidos por el número real de copias que se detectan ^[104].

La manera adecuada y recomendada por las normas internacionales para realizar la cuantificación de OGM en productos alimenticios, es a partir del uso de métodos *evento específico*. Primeramente se debe identificar cada evento presente en la muestra, luego se lo cuantifica y por último se realiza la suma de los porcentajes. No obstante, la tarea de detectar a todos los eventos que pueden encontrarse en un alimento procesado, resulta casi impracticable, dificultosa y muy costosa para un laboratorio de rutina. Si ponemos como ejemplo a un alimento que contiene maíz, el análisis implicaría la búsqueda de cada uno de los eventos autorizados para consumo humano en el mundo. Según la base de datos de la ISAAA esta cifra se eleva a 130 eventos ^[54] de maíz, de manera que tendrían

que realizarse cientos de análisis por muestra. Para superar esta dificultad, varios laboratorios se han enfocado en detectar y cuantificar elementos comunes a la mayoría de los eventos liberados, como lo es el Promotor *CaMVp35S* ^[135]. Este método ya ha sido validado en laboratorios de referencia y se encuentra contemplado en las normas estándares (ISO) referentes a los OGM ^[136-140].

La ventaja del método de cuantificación del *CaMVp35S* radica en la reducción significativa del costo del análisis. La adopción generalizada de un procedimiento de este tipo podría conducir a una mayor coherencia de las pruebas de los alimentos, reduciendo el número de análisis y de disputas comerciales. Sin embargo, el mismo presenta algunas desventajas significativas. Como se comentó anteriormente, no todos los eventos de maíz GM contienen el promotor 35S, por lo que los mismos quedarían excluidos de la cuantificación. A su vez, algunos eventos contienen más de una copia del promotor, por lo que el porcentaje obtenido podría estar sobreestimado. Este punto podría resultar problemático en el caso de que el contenido de OGM se encuentre cercano al umbral normativo para el etiquetado de OGM ^[135].

Por otro lado, debe considerarse que los métodos de detección y cuantificación de OGM utilizando cualquiera de las estrategias mencionadas, ya sea mediante la búsqueda de secuencias comunes o mediante el enfoque evento específico, no son capaces de distinguir entre un evento “apilado” y la mezcla de los eventos independientes. El desarrollo de los métodos para determinar eventos apilados, continúa siendo un desafío para los organismos de control a nivel mundial ^[112].

1.6.3 Métodos validados

Contar con métodos estandarizados y validados para la detección de OGM, resulta esencial para garantizar la calidad de los resultados en los laboratorios de control. En el año 2003, la Unión Europea creó el Laboratorio Comunitario de Referencia para Alimentos y Piensos Genéticamente Modificados (CRL-GMFF), conocido como Centro Común de Investigación de la Comisión Europea o *European Commission's Joint Research Centre* (JRC). El objetivo de este centro es proporcionar una lista de Métodos de Referencia para el análisis de OGM. El CRL-GMFF en colaboración con la Red Europea de Laboratorios de OGM (ENGL), ha creado la base de datos “*GMOMETHODS*”, en donde se encuentran publicados 118 métodos de PCR (cualitativos y cuantitativos), para la detección de 51

eventos distintos y 18 genes endógenos para las especies de maíz, soja, algodón, canola, papa, arroz y remolacha azucarera ^[141]. También se describen ensayos de rastreo para la detección de 8 elementos genéticos diferentes de uso común en el desarrollo de los OGM. Todos estos métodos se encuentran reunidos en un Compendio conocido como “*Compendium of reference Methods for GMO analysis*” ^[142]. Además, los métodos descritos han sido validados mediante ensayos de colaboración de acuerdo a los principios y recomendaciones de las normas estándares ISO 5725 e ISO 1725 ^[143, 144].

1.6.3.1 Materiales de Referencia Certificados

Los laboratorios de control que centran sus estudios en la búsqueda de OGM, se enfrentan al reto de tener que validar sus resultados y asegurar la calidad de los métodos de análisis. Los principales requisitos para lograr la armonización de los distintos métodos, se basan en el uso de **materiales de referencia certificados (MRC)** ^[145]. Los MRC son elementos con propiedades estables y uniformes, autenticadas por una institución reconocida y especializada. El Instituto de Materiales y Medidas de Referencia del Centro Común de Investigación en Geel, Bélgica (IRMM), ofrece un conjunto de MRC para distintas variedades de maíz GM ^[146]. El material de referencia para OGM, se presenta en dos formatos, como harina de semillas o como ADN liofilizado (plásmidos conteniendo la secuencia transgénica diana); ambas modalidades vienen en porcentajes de pureza definidos y certificados. Cada variedad transgénica, tiene un juego de materiales de referencia que incluyen distintos porcentajes GM y sus respectivos blanco no-GM. La Comisión Europea recomienda que los resultados de las medidas de OGM, se expresen en función del número de copias de ADN. Si para calibrar las medidas se utilizan materiales de referencia basadas en la fracción másica GM (% m/m, definido como la masa de soluto por cada 100 unidades de masa de disolvente), el resultado final puede convertirse a número de copias, sabiendo que estos MRC se producen con maíz GM heterocigótico para el transgén ^[145]. El número de copias de ADN contenido en una muestra de maíz puede ser calculado dividiendo la masa de ADN obtenida, por el valor 1C calculado para el genoma de esa especie (2.725 pg) ^[147]. Por ejemplo, se calcula que una muestra de 100 ng de ADN genómico de maíz, contiene alrededor de 36697 copias de genoma haploide para esa especie. Por lo tanto, 100ng de un material de referencia de maíz 0,1% GM (m/m), tendrá 36 copias de genoma transgénico.

1.6.3.2 Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

La sensibilidad de los métodos de PCR se pueden expresar en términos de límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ). Como se comentó anteriormente, estos dos parámetros de validación dependen de la cantidad de ADN genómico utilizado para la PCR, del tamaño del genoma de las especies y del número de transgenes insertado por genoma. El **límite de detección** para esta metodología se define como la menor concentración de ADN transgénico (LOD relativo en % m/m, LOD absoluto en número de copias), que puede ser detectada en un 95% de las determinaciones. El **límite de cuantificación** se define como la menor concentración de ADN transgénico que puede determinarse cuantitativamente, con un nivel aceptable de precisión y exactitud ^[138]. El número mínimo de copias que se puede cuantificar depende del error analítico aceptado y de la sensibilidad del método de detección de PCR. Para el análisis de los alimentos transgénicos, el límite de detección de los métodos de PCR se encuentra en el intervalo de 1-10 copias de la secuencia diana o 0,01% m/m de OGM, mientras que el límite de cuantificación se encuentra en 10-100 copias o 0,1% m/m de OGM ^[104].

1.6.4 Nuevos enfoques para la detección de OGM

El análisis de OGM en alimentos enfrenta grandes desafíos y se prevé que la situación sea más complicada en un futuro. Cada año se liberan nuevas variedades al mercado mundial con secuencias génicas diversas, lo que cuestiona el sistema de trazabilidad establecido para la detección de los OGM. Para abordar estos desafíos será necesario continuar con el desarrollo de nuevas técnicas para la detección, identificación y cuantificación de los mismos ^[148]. El primer enfoque para la mejora del diagnóstico de los OGM es la detección de varios blancos simultáneos por la técnica de **PCR multiplex**. La detección múltiple de varias secuencias en un solo tubo, permite aumentar el poder de análisis, reduce los tiempos y los costos del ensayo, pero requiere del diseño cuidadoso de los cebadores y de los sistemas de detección. El diseño debe asegurar la selectividad y la especificidad del ensayo, por lo que la validación requiere parámetros adicionales respecto a la detección simple. Para la detección múltiple por qPCR, pueden utilizarse tanto agentes intercalantes (p. ej., *SYBR® Green*) como sondas específicas de hibridación o de hidrólisis. La principal desventaja de los primeros, reside en que tienen una gran afinidad por el ADN

doble cadena y no discriminan entre las secuencias. Sin embargo, si se diseñan cebadores específicos y las secuencias amplificadas difieren en tamaño, estas pueden ser distinguidas mediante el análisis de las temperaturas de *melting*. El primer ensayo *multiplex* por qPCR-*SYBR*[®] *Green* fue desarrollado por Barbau-Piednoir y colaboradores en el año 2010, para el *screening* simultáneo del *p35S* y *t-Nos*^[117]. Recientemente en el año 2014, Barbau-piednor desarrolló un nuevo método para la detección simultánea por qPCR-*SYBR*[®] *Green*, de los blancos, *p35S*, *t-Nos*, *PAT*, *bar*, *cry1AB*, y *CP4EPSPS*^[121]. Pese a ello, los métodos de PCR *multiplex* mayormente utilizados son los que emplean sondas *TaqMan*[®], capaces de detectar de manera específica hasta 6 elementos de OGM diferentes en una sola reacción^[149-151]. Sin embargo, la cuantificación simultánea de varios eventos mediante esta tecnología todavía no se ha puesto a punto.

Otro tipo de enfoque utilizado para la detección e identificación simultánea de eventos específicos por qPCR, es la llamada “placa lista para uso” desarrolladas por el JRC^[152]. Cada placa contiene 96 pocillos con cebadores y sondas *TaqMan*[®] liofilizadas, especialmente diseñadas para detectar un total de 39 OGM distintos de forma individual. El rendimiento del sistema (especificidad, eficiencia y LOD) ha sido probado y validado exitosamente por el EU-RL GMFF. El límite de detección se ha determinado en 0,045% de material GM. No obstante, la limitante del sistema es la cantidad de ADN que se necesita por muestra para cubrir toda la placa y el costo de todos los cebadores y las sondas fluorescentes.

Actualmente un enfoque prometedor para la detección simultánea de OGM, es la tecnología de microarreglos de ADN (*chips* de ADN). Los microarreglos son plataformas de alto rendimiento que permiten la detección simultánea de numerosos objetivos en un solo “chip”. El sistema consiste en un paso de amplificación de secuencias de ADN blanco, seguido de la hibridación con sondas específicas en los pocillos del chip y una etapa final de detección. Debido a que las sondas de marcaje de ADN disponibles no revelan el aumento de señal de fluorescencia requerido, la tecnología de microarreglos todavía se utiliza como un método de detección simple y no ofrece información cuantitativa^[153]. A su vez, su uso en los laboratorios de rutina se encuentra restringido debido al gran costo del equipamiento^[154]. Para el análisis de alimentos, este sistema parece no ser lo suficientemente robusto debido a que no ofrece resultados fiables y reproducibles en matrices complejas^[10].

Finalmente, la técnica más novedosa utilizada para la detección y cuantificación de eventos transgénicos han sido la PCR digital ^[155, 156]. En la PCR digital (dPCR) la muestra a analizar se separa en un gran número de particiones y cada una de ellas se amplifica mediante una reacción de PCR. Esta separación permite recolectar más datos por muestra aumentando la sensibilidad de la detección y de la cuantificación. La principal ventaja de la PCR digital es que permite la medición del número absoluto de copias de ADN de un transgén, sin necesidad de realizar la comparación relativa con la secuencia endógena de la especie.

No obstante, el gran desafío que enfrentan los métodos de análisis de OGM en los alimentos, es la detección e identificación de los eventos apilados (*stacked events*) en una mezcla compleja. Ninguna técnica actual es capaz de diferenciar entre la presencia de varios OGM individuales (por ejemplo, Ga21 y Bt11) y el evento apilado (GA21 x BT11). El análisis de una muestra conteniendo apilados puede resultar en una sobrestimación del contenido GM, dado a que el porcentaje total se calcula a partir de la suma de los porcentajes de los eventos individuales. Como ejemplo, el análisis de una muestra de maíz que contiene 0,8% del evento apilado GA21 x BT11, dará como resultado un porcentaje de 1,6% de material GM, obtenido de la suma de los dos eventos individuales (0,8% del evento GA21 y 0,8% del BT11).

Se ha sugerido que la manera de superar estos desafíos es a través de la tecnología de la secuenciación masiva. La secuenciación se ha vuelto más y más eficiente, mucho más rápida y económica, presentando ventajas adicionales sobre los métodos basados en el ADN para la detección de OGM. La misma permite detectar e identificar nuevos eventos o eventos no autorizados, sin necesidad de conocer previamente la secuencia génica de los mismos. El único prerrequisito necesario para utilizar esta aproximación como identificador de OGM, es conocer la secuencia completa del organismo investigado. En la actualidad se encuentran en marcha varios proyectos que tienen como fin la secuenciación completa del genoma de las especies vegetales (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj>). No obstante, la utilización de la secuenciación para la identificación de OGM tiene algunas limitantes relacionadas con el costo del equipamiento y del análisis. Además, este tipo de aproximación produce un número inmenso de datos crudos para analizar. Este análisis requiere de un fuerte sistema bioinformático y de técnicos especialmente calificados ^[154].

2

Justificación y Objetivos

A casi veinte años de la introducción de los transgénicos en la agricultura, siguen surgiendo interrogantes acerca de los efectos potenciales que este tipo de tecnología puede generar sobre la diversidad genética de los cultivos y sobre la seguridad alimentaria. La posibilidad de que estos nuevos cultivos transfieran involuntariamente rasgos de importancia ecológica en las variedades criollas, ha sido objeto de varios estudios a nivel nacional e internacional. Uruguay ha ido profundizando en esta temática y ha logrado conformar un grupo interdisciplinario de investigadores de las Facultades de Química, Agronomía y Ciencias de la UdelaR, dedicado al estudio del flujo de transgenes entre variedades de maíz GM y no-GM en el país. Como parte de este grupo de investigación, el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de Facultad de Ciencias se ha centrado en el desarrollo de técnicas moleculares basadas en el estudio del ADN para detectar, identificar y cuantificar OGM en diversas matrices como: granos de polen, semillas, tejido foliar y alimentos que contienen o derivan de especies GM.

En el marco de esta temática, el trabajo experimental I de esta tesis “*Flujo de transgenes entre cultivos de maíz en Uruguay*” se propuso como **objetivo general**:

Emplear técnicas moleculares de detección de OGM - basadas en el análisis de ADN - para evaluar la frecuencia con la que ocurre el flujo de transgenes entre cultivos de maíz GM y no-GM en Uruguay.

Para llevar a cabo este fin, se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Utilizar métodos de *rastreo* de OGM por PCR, para detectar la presencia de transgenes en la descendencia de los cultivos de maíz no-GM expuestos a la interpolinización con cultivos GM.
2. Analizar las progenies transgénicas mediante estrategias de PCR *evento específicas*, con el fin de identificar el o los eventos de transformación involucrados en cada caso.
3. Comparar la identidad de los eventos encontrados en las progenies de los cultivos no-GM, con la de los cultivos GM vecinos de modo de confirmar la interpolinización.

4. Poner a punto un método de extracción de ADN y amplificación por PCR, para detectar e identificar transgénicos a partir de granos de polen de maíz.

Por otra parte, y en vistas del comienzo de la fiscalización del etiquetado de los alimentos que contienen o derivan de organismos genéticamente modificados, resulta necesario e indispensable disponer de sistemas de trazabilidad que faciliten y fortalezcan los sistemas de control.

En este contexto, el trabajo experimental II de esta tesis “*Detección de OGM en alimentos derivados de maíz*” tuvo como **objetivo general**:

Estandarizar una metodología basada en la técnica de PCR en Tiempo Real, para detectar, identificar y cuantificar de manera sencilla y eficaz, la presencia de maíz GM en alimentos procesados; y dotar a los organismos de contralor con herramientas analíticas que garanticen el cumplimiento de las normativas vigentes.

Evaluar mediante la misma, la situación actual de los productos de maíz que se comercializan en Uruguay.

Para lograr este fin se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Realizar la puesta a punto de la técnica de PCR en Tiempo Real (*SYBR[®] Green*), para detectar, identificar y cuantificar OGM en muestras de alimentos que contienen maíz.
2. Comparar el uso de la química *SYBR[®] Green* y la tecnología *TaqMan[®]* para detectar y cuantificar el contenido GM en los alimentos. Estudiar las ventajas y aplicaciones de cada sistema.
3. Determinar la presencia de maíz GM en muestras comercializadas en el mercado local e internacional, mediante el método de *screening* de OGM.
4. Identificar mediante estrategias *evento específicas* las variedades de maíz transgénico involucradas en los alimentos, para evaluar si se encuentran o no autorizadas para consumo en el país.
5. Cuantificar el contenido de maíz GM y evaluar si los valores se encuentran por debajo o por encima del umbral de 1% establecido para el etiquetado de OGM en los alimentos que se comercializan en Montevideo.

3

Trabajos Experimentales

TRABAJO EXPERIMENTAL I.

“Flujo de transgenes entre cultivos de
maíz en Uruguay”



I. Introducción

Varios estudios han demostrado que el polen de maíz puede viajar a grandes distancias bajo circunstancias climáticas particulares ^[74], favoreciendo la polinización cruzada entre los cultivos. Asimismo, se ha visto que la interpolinización depende de diversos factores que incluyen: el área sembrada del cultivo, la orientación, la distancia y la sincronía en las fechas de siembra entre el cultivo dador y el receptor ^[75,76]. Se conoce que en condiciones reales de coexistencia, la polinización cruzada trae como consecuencia la presencia accidental de transgénicos en cultivos no-GM ^[11, 83, 85]. Dado que la legislación nacional adoptó en el año 2008 la política de coexistencia regulada entre los distintos cultivos de maíz en el territorio (orgánico, GM y no-GM) ^[70], resulta indispensable poner a punto las metodologías que permitan detectar una posible contaminación por flujo génico.

Las condiciones para cultivar variedades de maíz GM en Uruguay establecen que se guarde una distancia de aislamiento de al menos 250 metros desde otros cultivos no transgénicos ^[61]. La polinización decrece con la distancia pero se ha encontrado que existe flujo de transgenes desde cultivos de maíz GM a cultivos no-GM, aún en situaciones en las que se respetan las distancias recomendadas. Estos resultados fueron evidenciados en el año 2008, en un primer estudio de flujo génico realizado por un grupo interdisciplinario de Facultad de Agronomía, Química y Ciencias ^[89]. Dado el interés que suscitó el anterior trabajo en distintos actores vinculados al sector productivo, entre ellos la Comisión Nacional de Fomento Rural (CNFR), se creyó pertinente ampliar el mismo, el cual fue acotado en el número de casos y en el área geográfica por la disponibilidad de recursos.

El presente trabajo tuvo como principal objetivo emplear técnicas moleculares de detección de OGM, para evaluar la ocurrencia y frecuencia con la que ocurren los fenómenos de interpolinización entre cultivos cercanos, teniendo en cuenta que actualmente el área cultivada con maíz GM es muy superior a la sembrada con maíz no-GM ^[60]. Se entiende que los resultados de esta evaluación ayudarán a definir las distancias de aislamiento necesarias para evitar la contaminación entre los cultivos de maíz GM y no-GM en el país.

II. Materiales y Métodos

Estrategia experimental

Para llevar a cabo el estudio de flujo génico en cultivos de maíz, durante las zafras 2010-2011 y 2011-2012 los investigadores de la contraparte del proyecto por Facultad de Agronomía y Química, recorrieron zonas de producción buscando identificar situaciones en las que se encontraran chacras de maíz GM y no-GM con potencial riesgo de interpolinización. Una vez identificados los casos, se realizó un muestreo de espigas en diferentes sitios de los cultivos no-GM, con el fin de producir las progenies respectivas. Se muestreó una espiga por planta y junto con cada espiga se tomó una muestra de tejido foliar para realizar el análisis confirmatorio de la identidad no-GM de la planta madre. Se intentó producir un número elevado de plantines por sitio de muestreo, a fin de poder detectar frecuencias de transgenes $> 0,01$, con un nivel de confianza de 95% [83].

La progenie fue analizada en primera instancia mediante la técnica de DAS-ELISA en la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Química (responsable Lic. Pablo Galeano). Posteriormente las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria, en donde se realizó el análisis por PCR en punto final para confirmar la presencia de transgenes e identificar los eventos involucrados.

Por otra parte, en el marco de este proyecto se tomaron muestras de granos de polen de diferentes tipos de maíz (GM y no-GM), en distintas épocas de floración y en distintas zonas de producción, con el fin de estudiar la viabilidad de los granos y los distintos factores de incidencia en la tasa de interpolinización. La recolección del polen estuvo a cargo de la Dra. Gabriela Speroni de Facultad de Agronomía y de la Dra. Angeles Beri de la Facultad de Ciencias. Estas muestras de polen fueron utilizadas como parte de la tesis, para desarrollar un método sencillo de extracción de ADN y amplificación por PCR que permitiera facilitar el análisis de su identidad GM o no-GM.

Identificación de casos

Durante los meses de marzo y abril del año 2011 se realizaron seis salidas de campo, en las que se visitaron 30 chacras de maíz en los departamentos de San José, Colonia,

Soriano y Rocha, buscando identificar situaciones de riesgo de interpolinización entre cultivos GM y no-GM. Esta situación admitía una distancia máxima de 1500 metros entre los bordes más cercanos de ambas chacras y no más de dos semana de diferencia en las fechas de siembra de los cultivos. Para la identificación de estos casos se recurrió a información aportada por técnicos y productores de la Comisión Nacional de Fomento Rural (CNFR) y de la Facultad de Agronomía. En todos los casos se registraron las coordenadas geográficas de las chacras visitadas y se determinó la distancia entre los cultivos utilizando programas de análisis de imágenes satelitales.

En el período de enero a marzo del año 2012, se realizaron cinco salidas de campo, en donde se visitaron un total de 23 chacras de maíz en los departamentos de Colonia, Soriano, Lavalleja y Rocha.

Análisis confirmatorio de la identidad GM y no-GM de los cultivos

En los casos que se identificó un potencial riesgo de interpolinización entre los cultivos de maíz, se tomaron hojas de las plantas para confirmar la identidad GM o no-GM de las mismas, y para establecer si se estaba ante un caso de interés para este estudio. En varias situaciones el productor no tenía certeza sobre la identidad de su cultivo, por lo que se procedió a confirmar la misma mediante análisis moleculares. Todas las muestras de hojas de cultivos de maíz GM y no-GM colectadas, fueron analizadas por DAS-ELISA para la detección de la proteína transgénica *cry1Ab*. Los resultados se confirmaron por PCR en punto final mediante estrategias de *rastreo* de OGM (detección del promotor *CaMVp35S* y del terminador *t-Nos*) y mediante estrategias de PCR *evento específicas* para la identificación de los eventos de maíz MON810 y Bt11.

Muestreo y producción de plantines

Para todos los cultivos no-GM identificados en ambas zafras se definieron distintos sitios de muestreo dentro de la chacra, según las hectáreas sembradas y la proximidad al cultivo GM vecino. De cada sitio se tomaron espigas para la producción de la progenie, intentando producir un total de 300 plantines por sitio. Las muestras fueron colectadas cuando el cultivo alcanzó un grado de desarrollo tal que presentó granos maduros en las espigas.

Análisis de la progenie por DAS-ELISA

Los plantines producidos fueron organizados en grupos (*bulks*) de aproximadamente 60 plantas, generando un total de 5 *bulks* por sitio de muestreo. De las plantas de cada *bulk* se tomaron hojas (60 hojas), las cuales fueron guardadas en sobres claramente identificados para ser analizados por DAS-ELISA (detección de la proteína *cry1AB*). Este análisis fue realizado en la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Química por el Lic. Pablo Galeano. Los *bulks* que resultaron positivos para el análisis de DAS-ELISA fueron abiertos en seis sub-muestras de 10 individuos, para evaluar la posibilidad de que hubiera más de un individuo positivo por *bulk* para la presencia de transgenes.

Las muestras procesadas en la Facultad de Química, fueron transportadas a la Facultad de Ciencias para ser analizadas por PCR en punto final.

Análisis de la progenie por PCR en punto final

Todos los análisis de detección de transgenes por PCR en punto final se llevaron a cabo en el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria. Cada sobre conteniendo las 60 hojas de la progenie (*bulk*), fue analizado por separado para confirmar la presencia de ADN de maíz (detección de el gen endógeno *hmga* que codifica para una proteína del grupo de alta movilidad del maíz) y para detectar la presencia de OGM mediante el método de *screening* del promotor *CaMVp35S* y del terminador *nos*. Las muestras que resultaron positivas fueron analizadas por el método *evento específico*, para identificar a los eventos específicos MON810 y Bt11.

1. Extracción de ADN

Para extraer el ADN genómico de las hojas de maíz, se eligió como guía el protocolo descrito por Doyle & Doyle (1987) ^[158]. Este método es el más utilizado para extraer ADN de compuestos vegetales que contienen altos contenidos de polisacáridos (por ejemplo, celulosa, almidón). El mismo utiliza una solución de lisis con detergente CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) para destruir membranas, desnaturalizar proteínas, y ayudar a

disociarlas del ADN. De esta manera, se logra obtener un ADN de buena calidad para utilizar en ensayos posteriores de PCR.

Las hojas de la progenie fueron colocadas en un mortero limpio para su pulverización con Nitrógeno líquido. Una vez pulverizadas fueron disueltas en 1ml de solución de extracción con CTAB, previamente calentado a $65 \pm 1^\circ\text{C}$ (ver **Anexo I**). El preparado se homogeneizó vigorosamente y se transfirió a un tubo de 2.2ml para su incubación a $65 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 1 hora \pm 5 minutos. Luego de la incubación, se agregó a la mezcla, 1ml de cloroformo-octanol (24:1), se invirtió el tubo unas 100 veces y se centrifugó a 12.000g por 5 minutos. Luego, se tomaron 500 μl aproximados del sobrenadante, a los cuales se les incorporó 0.8 volúmenes de isopropanol frío y centrifugó a máxima velocidad (12.000g) por 5 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregó 1ml de etanol 70%, para centrifugar una vez más por 1 minuto a 12.000g. Por último, se descartó el etanol remanente, se secó el precipitado y se resuspendió en 100 μl de H₂O miliQ. Luego se prosiguió con la cuantificación del ADN resultante.

La concentración del ADN extraído fue calculada a partir de lecturas de absorbancia a 260nm, en un espectrofotómetro de microvolúmenes (*NanoDrop*, Thermo Scientific, EE.UU). La pureza se estimó mediante la relación de absorbancia a 260nm/280nm. Se consideraron puras aquellas muestras de ADN cuya relación $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$ se situó entre 1,6 y 1,8^[159].

Cada muestra de ADN fue diluida en H₂OmQ hasta una concentración final de 100ng/ μl , para ser utilizada en los ensayos de PCR en punto final. Las mismas fueron almacenadas en *freezer* a -20°C .

2. Rastreo (*screening*) de OGM

La estrategia de *screening* de OGM permite evaluar de manera rápida la presencia o la ausencia de organismos genéticamente modificados en una muestra. Para ello, se utilizan cebadores dirigidos a secuencias génicas comunes a la mayoría de los transgénicos, como promotores y terminadores de la transcripción. En este trabajo, se optó por detectar al promotor 35S del virus del mosaico del coliflor y al terminador *nos* de *A. tumefaciens*. El promotor 35S se encuentra presente en la construcción génica del evento de maíz Bt11 y del evento MON810, mientras que el terminador *nos*, se encuentra únicamente en el evento Bt11. Para detectar estos dos elementos, se utilizaron los

cebadores descritos en el Compendio de métodos de referencia para el análisis de OGM de la UE (método SC/ELE/012) ^[142]. Las secuencias de los mismos y el tamaño de los amplicones resultantes, se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la detección del gen endógeno de maíz *hmga*, el promotor *35S* y el terminador *nos* por PCR. Reportados por el *Joint Research Centre* (JRC) de la Unión Europea ^[142].

Secuencia Diana	CEBADOR	Secuencia 5' - 3'	Tm °C	Tamaño amplicón	Temp. trabajo	METODO Ref.
HMGA	HMGA-F	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	58.9	60°C	79 pb	QT/ZM/020
	HMGA-R	GCTACATAGGGAGCCTTGCTCT	69.1			
p35S	CAMVp35S-F	GCCTCTGCCGACAGTGGT	60	82 pb	60°C	SC/ELE/012
	CAMVp35S-R	AAGGCGTGGTTGGAACGTCTT	60.3			
t-Nos	t-Nos F	CATGTAATGCATGACGTTATTTAT	59.3	84 pb	60°C	SC/ELE/012
	t-Nos R	TTGTTTTCTATCGCGTATTAATGT	64.4			

Las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen total de 25µl, conteniendo: ADN molde (100ng/µl), Cebador directo (10µM), Cebador reverso (10µM), *dNTPs* (10mM), *Immolase DNA polymerase* (1U), *Buffer* 10X, MgCl₂ (50mM), H₂O c.s.p. 25µl. El ciclado se realizó en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer), el cual fue programado para realizar 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 30 segundos a 72°C. Por último un ciclo para la extensión final de 7 minutos a 72°C.

La visualización de los productos de PCR se realizó a través de una electroforesis en acrilamida al 12%, utilizando para el revelado, la técnica de tinción en plata (ver **Anexo II**). Paralelamente al análisis de las muestras se corrió un control negativo o blanco de PCR (sin ADN molde), y un control positivo conteniendo la secuencia de ADN blanco.

3. Identificación de los eventos de maíz Bt11 y MON810

Luego de detectar la presencia de material transgénico en las hojas de los plantines, se prosiguió con la identificación de los eventos específicos MON810 y Bt11. Para identificar dichos eventos se utilizaron los cebadores reportados en el Compendio de métodos de referencia para el análisis de OGM de la UE (métodos QT/ZM/004 y QT/ZM/006 respectivamente) ^[142]. Las secuencias de los cebadores utilizados y el tamaño de los amplicones resultantes, se resumen en la Tabla 6. Cada evento se detectó en

reacciones de PCR separadas, pero utilizando las mismas condiciones de ciclado e iguales concentraciones de reactivos.

Tabla 6. Cebadores utilizados para la identificación de los eventos de maíz MON810 y Bt11. Reportados por el *Joint Research Centre* (JRC) de la Unión Europea ^[142].

EVENTO	CEBADOR	Secuencia 5' - 3'	Tm °C	Tamaño amplicón	Temp. Trabajo	METODO Ref.
MON810	MON810-IVS-HSP-F	GATGCCTTCTCCCTAGTGTGA	60.3	113 pb	60°C	QT/ZM/004
	MON810-CRY 1A(B)-R	GGATGCACTCGTTGATGTTG	57.9			
Bt11	Bt11-INS-F	GCGGAACCCCTATTTGTTTA	55.3	70 pb	60°C	QT/ZM/006
	Bt11-3'JUN-R	TCCAAGAATCCCTCCATGAG	57.3			

Las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen total de 25µl, conteniendo: ADN molde (100ng/µl), Cebador directo (10µM), Cebador reverso (10µM), dNTPs (10mM), *Immolase DNA polymerase* (1U), *Buffer* 10X, MgCl₂ (50mM), H₂O c.s.p. 25µl. El ciclado se realizó en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer), el cual fue programado para realizar 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 35 ciclos de: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C y 30 segundos a 72°C. Por último un ciclo para la extensión final de 7 minutos a 72°C.

La visualización de los productos de PCR se realizó a través de una electroforesis en acrilamida al 12%, utilizando para el revelado, la técnica de tinción en plata (ver **Anexo II**). Paralelamente al análisis de las muestras se corrió un control negativo o blanco de PCR (sin ADN molde), y un control positivo conteniendo el evento de transformación adecuado.

Análisis de Datos

La frecuencia con que se detectó la presencia de transgenes en la progenie de los cultivos no-GM se expresó según dos criterios:

- (i) como el número de individuos que expresaron el transgén (la proteína *cry1Ab*) sobre el total de individuos analizados para cada sitio.
- (ii) como la frecuencia (p) para la cual, dado el tamaño de la muestra para cada sitio, la probabilidad de detección (Pd) es de un 95%.

Se define la probabilidad de detección, Pd como la probabilidad de detectar al menos un individuo positivo en una población de *n* individuos, según la fórmula:

$$Pd = 1 - (1-p)^S$$

donde S es el número de individuos analizados (n) por sitio, asumiendo que los individuos positivos se encuentran distribuidos con una frecuencia uniforme p [83]. Se considera a S como n, dado que se asume que las plantas madres no portan el transgén. Para una muestra de n individuos, hay una Pd del 95% para una $p=1-nv0.05$. En los casos en los que no se detectó ningún positivo, se puede afirmar con un 95% de confianza que la frecuencia de interpolinización con el transgén es $p < 1- nv0.05$.

Extracción y amplificación de ADN de un grano de polen de maíz

Las técnicas de amplificación y genotipado de un solo grano de polen, han abierto nuevas oportunidades en diversas áreas de investigación como la ecología de la polinización, la investigación evolutiva y la genómica. Las mismas tienen el potencial de facilitar la estimación de la ocurrencia del flujo de polen, a través del seguimiento directo del movimiento de los granos individuales [160]. Además permiten evaluar ciertos productos como la miel, determinando si contiene o no material genéticamente modificado.

Para lograr la extracción y amplificación del ADN de un único polen, se probaron tres protocolos distintos: el propuesto por Suyama y colaboradores en el año 1996 [160], el de Chen del año 2008 [161] y el de Isagi y colaboradores descrito en el año 2011 [162].

Para evitar la pérdida de polen, todas las extracciones de ADN se realizaron en el tubo en donde se llevó a cabo la amplificación por PCR. Las reacciones de PCR se efectuaron con distintos cebadores, para detectar distintas secuencias blanco: un gen endógeno de la especie maíz, el promotor *CaMVp35S* y el evento específico de maíz MON810. Para la detección específica de la especie maíz, se utilizaron los cebadores HMGA-F/HMGA-R dirigidos hacia el gen endógeno *hmga* y los cebadores IVR1-IVR2, dirigidos hacia el gen de la invertasa de maíz. Para amplificar al promotor 35S, se utilizaron los cebadores *CaMVp35S F/R*, y para amplificar el evento MON810, se utilizaron los cebadores VW01-VW03. Todos los cebadores utilizados en este estudio se encuentran descritos en el Compendio de métodos de referencia para el análisis de OGM de la UE [142], y se muestran en la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7. Cebadores utilizados para la detección de ADN de polen de maíz. Reportados por el *Joint Research Centre (JRC)* de la Unión Europea ^[142].

BLANCO	CEBADOR	Secuencia 5' - 3'	Tm °C	Temp. trabajo	Tamaño amplicón	METODO Ref.
HMGA	HMGA-F	TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA	58.9	60°C	79 pb	QT/ZM/020
	HMGA-R	GCTACATAGGGAGCCTTGTCT	69.1			
IVR	IVR1	CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC	69.5	60°C	225 pb	SC/CON/003
	IVR2	GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC	69.5			
p35S	CaMVp35S-F	GCCTCTGCCGACAGTGGT	60	60°C	82 pb	SC/ELE/012
	CaMVp35S-R	AAGGCGTGGTTGGAACGTCTT	60.3			
MON810	Vwo1	TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG	64.55	60°C	170 pb	SC/EV/001
	Vwo3	TCCATCTTTGGGACCACTGTCTG	64.54			

En paralelo al análisis de un polen, se llevaron a cabo extracciones de ADN de 3, 5 y 10 granos de polen por tubo. Todas las extracciones se realizaron por duplicado. A cada duplicado, se le agregó un control interno positivo (CIP) para controlar la inhibición de la PCR ^[163]. El mismo consistió en un ADN de manzana, detectable con un juego de cebadores descritos por Taberlet y colaboradores (1991) ^[164]. La visualización de los productos de PCR se realizó a través de una electroforesis en acrilamida al 12%, utilizando para el revelado, la técnica de tinción en plata (ver **Anexo II**).

1. Material de partida

El polen utilizado para realizar los ensayos de extracción y amplificación de ADN por PCR, fue obtenido a partir de una panoja de maíz híbrido, transgénico de la variedad MON810. Los granos de polen fueron colectados en tubos estériles, conteniendo 100µl de H₂OmQ.

2. Aislamiento del polen

Los granos de polen fueron identificados morfológicamente bajo lupa, según la descripción de Suyama y colaboradores ^[160]. Varias gotas de la solución de H₂OmQ y polen fueron colocadas en el portaobjetos y los granos fueron separados por movimiento desde una gota de agua a la siguiente utilizando una micropipeta (Figura 17). Una vez aislados,

cada grano fue transferido a un tubo de PCR estéril, tratando de no arrastrar más de 0.2 μ l de H₂OmQ.

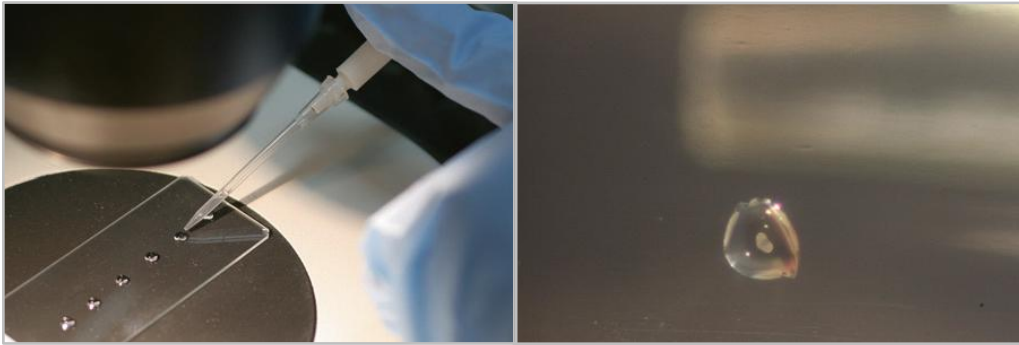


Figura 17. Aislamiento de granos de polen. Los granos de polen se lavan con H₂OmQ y se transfieren a un portaobjetos para identificarlos y aislarlos bajo lupa. Una vez aislados, se transfieren a un tubo estéril de PCR (0,2ml) para su posterior análisis. Tomado de ^[160]

3. Extracción de ADN - Protocolo Suyama *et al.*, 1996 ^[160]

Diez microlitros de la solución *de extracción* conteniendo 10mM Tris-HCl pH=8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.01% Proteínasa K y 0.01% SDS, fueron agregados al tubo de PCR con el grano de polen aislado. Posteriormente, el tubo fue incubado a 37 \pm 2°C durante 60 \pm 5 minutos, seguido de 10 \pm 1 minutos a 95 \pm 2°C. Diez microlitros de dicha solución se emplearon como molde para la reacción de PCR.

Para llevar a cabo la reacción de PCR se introdujeron dentro del tubo, 90 μ l de una solución de reacción conteniendo: 10mM Tris-HCl pH=8.3, 1.5 mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1mM de cada dNTP, 0.25 μ M de cada cebador, y 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa (100 μ l finales). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer), bajo las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización inicial de 94°C por 5min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 15 segundos a 62°C (temperatura óptima para los cebadores utilizados), 25 segundos a 72°C y una extensión final de 5 minutos a 72°C.

4. Extracción de ADN - Protocolo Chen y colaboradores, 2008 ^[161]

El procedimiento de alto rendimiento para la extracción de ADN de un solo polen se resume de la siguiente manera: al tubo conteniendo el polen aislado, se le colocó 1 μ l de la

solución de extracción constituida por: KOH 0.1M, Tween-20 y H₂OmQ. Luego, se mezcló y centrifugó por un minuto a 1500g. La muestra se incubó a 95 ± 2°C por 17 ± 2 minutos. Posteriormente se agregó 1μl de solución TE (100mM Tris-HCl, 2mM EDTA pH=8) y se centrifugó durante 5 minutos a 1500g. Por último, se agregaron 18μl del Mix de PCR conteniendo: 10mM de Tris-HCl pH=8.3, 3.0mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.2mM de cada dNTP, 0.25μM de cada cebador, y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (20μl finales); y se centrifugó por 5 minutos a una velocidad de 1500g.

El protocolo de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 95°C por 5min para la desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de 93°C por 55 segundos, 10 segundos a 60°C, 40 segundos a 72°C y una extensión final de 10 minutos a 72°C.

5. Extracción de ADN - Protocolo Isagi y colaboradores, 2011^[162]

La extracción se realizó en un tubo conteniendo el grano de polen aislado, al cual se le agregaron 2μl de solución de extracción conteniendo: 0.01% SDS, 0.1mg/mL de proteinasa K, 0.01M de Tris-HCl pH=7.8 y 0.01M de EDTA. A continuación, la mezcla se incubó a 56 ± 2°C por 60 ± 5 minutos y luego a 95± 2°C por 10 ± 2 minutos. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se prosiguió a observar bajo lupa, la integridad del grano de polen en la solución de extracción. Aquellos granos de polen que resultaron intactos luego del tratamiento por calor, fueron fracturados mecánicamente mediante la utilización de una punta de plástico.

Para llevar a cabo la amplificación por PCR, se agregaron a los 2μl de la mezcla, 23μl del Mix de PCR conteniendo: 10mM Tris-HCl pH=8.3, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.2mM de cada dNTP, 0.25μM de cada cebador, y 1 unidad de Taq DNA polimerasa (25μl finales). El protocolo de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 30 segundos a 62°C, 30 segundos a 72°C y una extensión final por 7 minutos a 72°C.

6. Extracción de ADN– Protocolo modificado de Chen, 2008

Se llevó a cabo una modificación en el protocolo descrito por Chen, el cual se detalla a continuación: al tubo conteniendo el polen aislado, se les agregaron 2μl de una solución de KOH 0,1M. La mezcla se incubó a 65 ± 2 °C por 15 ± 2 minutos. Posteriormente se

agregaron 4µl de una solución de Tris-HCl pH=8.3 100mM, se incubó a $95 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 ± 1 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 1500g.

Las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen total de 25µl, conteniendo: 5 µl de la extracción de ADN, 10µM de cada cebador, 10mM de dNTPs, 1 Unidad de *Taq DNA polymerase*, *Buffer* 10X, H₂OmQ c.s.p. 25µl. El protocolo de PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: 95°C por 5min, seguido de 40 ciclos de 93°C por 55 segundos, 10 segundos a 60°C, 40 segundos a 72°C y una extensión final por 10 minutos a 72°C.

En la siguiente Tabla (Tabla 8), se resumen las condiciones generales de los cuatro protocolos descritos para la extracción de ADN de polen.

Tabla 8. Condiciones generales de los cuatro protocolos descritos para la extracción de ADN de un grano de polen. Reportado en ^[160-162].

PROTOCOLO	COMPONENTES	Tiempos de incubación	Centrifugación	Volumen de PCR
Suyama 2008	Tris-HCl pH=8.3 (10mM), MgCl ₂ (1.5mM), KCl (50mM), Proteinasa K (0.01%), SDS (0.01%)	60 minutos a 37 °C 10 minutos a 95°C	No	100µl
Chen 2008	KOH (0.1M), Tween-20, Tris-HCl (100mM), EDTA (2mM)	17 minutos a 95 °C	5 minutos a 1.500g	20µl
Isagi 2011	Tris-HCl pH=7.8 (0.01M), proteinasa K (0.1g/l), EDTA (0.01M), SDS (0.01%)	60 minutos a 56 °C 10 minutos a 95 °C	No	25µl
Chen modificado	KOH (0,1M), Tris-HCl (100mM)	15 minutos a 65 °C	5 minutos a 1.500g	25µl
		10 minutos a 95 °C		

III. Resultados y Discusión

Identificación de casos

Un total de 53 chacras comprendidas en los departamentos de Lavalleja, San José, Colonia, Canelones, Soriano y Rocha, fueron visitadas por los investigadores de las Facultades de Agronomía y Química durante las dos zafras que abarcó el proyecto CSIC (I+D) *“Flujo de transgenes entre cultivos comerciales de maíz en el Uruguay”* (Responsable Dra. ML Franco-Fraguas). En la zafra 2010-2011 se identificaron siete (7) casos con riesgo de interpolinización entre cultivos GM y no-GM, mientras que en la zafra 2011-2012 se identificaron cinco (5) casos de interés. En ambas zafras se presentaron dificultades para encontrar cultivos de maíz que reunieran las condiciones de riesgo de interpolinización; Esto ocurrió porque la oferta de semillas de maíces híbridos no-GM disminuyó considerablemente, y casi no se encontraron productores que sembraran maíces no transgénicos. A su vez, en la zafra 2010-2011 ocurrió una sequía que afectó a los cultivos, de modo que los productores decidieron usarlo como forraje para ganado, pastoreando o cortando las plantas cuando todavía se encontraban en crecimiento y aún no habían cuajado las espigas para realizar el muestreo. En la zafra 2011-2012 los problemas de sequía fueron más leves pero igualmente afectaron varias zonas de producción, desde mediados de diciembre a mediados de febrero.

Análisis confirmatorio de la identidad GM y no-GM de los cultivos

Luego de determinar la identidad GM y no-GM de los cultivos de los 12 casos, se observó que algunas plantas madres sembradas como no-GM, dieron positivas para la presencia de transgénicos. Estos casos no fueron incluidos en el estudio. En el resto de los casos los resultados de los análisis por DAS-ELISA y por PCR confirmaron la identidad GM y no-GM de los cultivos, lo que fue consistente con la información suministrada por el productor o el técnico responsable del cultivo.

En resumen, de los 12 casos identificados originalmente, nueve (9) fueron considerados de mayor interés a los fines de este estudio. De estos nueve cultivos no-GM se tomaron granos de las espigas, se produjeron los plantines correspondientes y se analizaron las progenies para estudiar la presencia/ausencia de material GM.

Muestreo y producción de plantines

De los siete casos identificados en año 2011, se colectaron un total de 261 espigas de 13 sitios diferentes. En total, se produjeron 4892 plantines correspondientes a la progenie de las chacras no-GM muestreadas. Por otro lado, de los cinco casos que se identificaron en el año 2012, se colectaron 691 espigas en 28 sitios diferentes. En total se produjeron 8418 plantines correspondientes a la progenie de las cinco chacras no-GM muestreadas ^[143].

Presencia de transgenes en la progenie no-GM

El resultado de los análisis de las progenies correspondientes a todos los casos identificados, se presentan en la Tabla 9. Para cada caso se especifica él o los sitios muestreados, el número de plantines y *bulks* generados por sitio, la cantidad de *bulks* que resultaron positivos para la presencia de proteína transgénica *cry1Ab* (DAS-ELISA), la confirmación de la presencia de transgenes por PCR (presencia de *CaMVp35S* y *t-nos*), la identidad de los eventos involucrados en cada caso (MON810 o Bt11), y la frecuencia con la que se observó la presencia de material GM en cada sitio.

A partir del análisis se encontró que cuatro de los nueve casos estudiados, Casos 1, 3, 10 y 12, presentaron transgenes en la descendencia. Los eventos identificados en las progenies coincidieron con los declarados para los cultivos GM más cercanos. Esto hace pensar que efectivamente ocurrió un flujo de transgenes desde los cultivos GM, a los cultivos no-GM vecinos. A continuación se detalla el análisis realizado para cada uno de los cuatro casos positivos.

Tabla 9. Análisis de la progenie de los cultivos no-GM y estimación de la frecuencia de inter-polinización mínima observada. ^(a) Sitio: área de muestreo dentro de la chacra de maíz no-GM. En los casos 10 y 12, se presentan varios sitios juntos por encontrarse equidistantes al cultivo GM. ^(b) Número de *bulks* positivos (presencia de proteína *cry1Ab*) en el total de *bulks* analizados por sitio. ^(c) Frecuencia mínima estimada, asumiendo que hay un único individuo transgénico por *bulk*, cuando la muestra da positiva para el test de DAS-ELISA. ^(d) Análisis de PCR para la detección del gen endógeno de maíz *hmga*, el promotor *35S*, terminador *nos*, evento MON810 y evento Bt11. (+) indica presencia de la secuencia transgénica blanco, (-) indica la ausencia de la secuencia buscada. ^(e) Días: valores negativos indican que el cultivo GM fue sembrado antes que el no-GM. Los casos 2, 8, 9, 11 no fueron analizados por PCR. Complemento de ^[157]

Caso	Cultivo no-GM		DAS-ELISA			PCR ^d					Cultivo GM cercano			
	Área (ha)	Sitio ^a	Nº de Bulks positivos ^b	Nº de plantines	Frecuencia Observada ^c	hmga	p35S	t-Nos	MON 810	Bt11	Área (ha)	Distancia (m)	Dif. Siembra (días) ^e	Evento
1	0.3	1.1	3/7	325	≥ 0.92%	+	+	-	+	-	47.5	420	-14	MON810 /Bt11
2	13.0	2.1	0/5	259	0						30.0	1400	-15	MON810
		2.2	0/5	279	0							1170		
3	2.5	3.1	14/20	259	≥ 5.41%	+	+	-	+	-	0.7	0	1	MON810
		3.2	3/20	218	≥ 1.38%	+	+	-	+	-		20		
4	1.3	4.1	0/5	294	0	+	-	-	-	-	0.8	500	-7	MON810
		4.2	0/5	305	0	+	-	-	-	-		550		
		4.3	0/5	296	0	+	-	-	-	-		600		
8	5.8	8.1	0/5	322	0						7.9	810	15	MON810
		8.2	0/5	290	0							830		
		8.3	0/5	312	0							860		
9	1.7	9.1	0/5	296	0						1.1	2480	12	MON810
		9.2	0/5	314	0							2520		
		9.3	0/5	309	0							2430		
		9.4	0/5	306	0							2470		
10	1.4	10.1	4/5	300	≥ 1.33%	+	+	-	+	-	1.1	24	2	MON810
		10.2	2/5	303	≥ 0.66%	+	+	-	+	-		24		
		10.3/4	0/5	300/300	0	+	-	-	-	-		44		
		10.5/6	0/5	304/303	0	+	-	-	-	-		74		
		10.7/8	0/5	304/301	0	+	-	-	-	-		124		
11	0.1	11.1	0/2	82	0						7.9	1030	15	MON810
12	10	12.1	0/5	311	0	+	-	-	-	-	11.5	260	5	MON810
		12.2	3/5	311	≥ 0.96%	+	+	-	+	-		260		
		12.3	2/5	321	≥ 0.62%	+	+	-	+	-		260		
		12.4	0/5	309	0	+	-	-	-	-		280		
		12.5	1/5	305	≥ 0.33%	+	+	-	+	-		280		
		12.6	0/5	319	0	+	-	-	-	-		280		
		12.7-9	0/5	286/304/306	0	+	-	-	-	-		310		
		12.10-12	0/5	308/304/304	0	+	-	-	-	-		360		

El **caso 1** era un cultivo de maíz criollo de aproximadamente 3.000m², producido para autoconsumo y alimentación de animales. En las cercanías de este cultivo se encontraba un cultivo comercial de maíz GM de 47.5 ha, cuyo borde más cercano se encontraba a 420 m en dirección SW del cultivo de maíz criollo. El cultivo GM portaba mayoritariamente el evento Bt11, sin embargo, en el sector más cercano al maíz criollo se encontraba una parcela con maíz transgénico evento MON810. Debido a la reducida superficie de esta chacra, se muestreó un único sitio. Se colectaron ocho marlos de los cuales se produjeron 325 plantines organizados en siete *bulks*. De estos siete *bulks*, tres resultaron positivos en el test por DAS-ELISA y por PCR, por lo que al menos tres de los 325 plantines analizados presentaron transgenes. El análisis de identificación de eventos por PCR confirmó que los mismos correspondieron a la variedad MON810 (Figura 18).

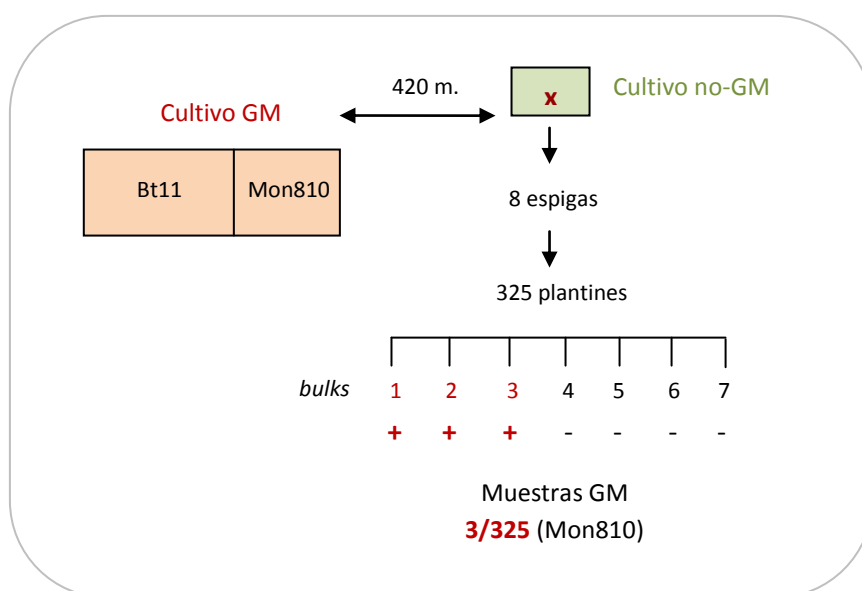


Figura 18. Representación gráfica del caso 1 “flujo de transgenes”. El diseño es únicamente ilustrativo. “x” representa el sitio de muestreo dentro de la chacra no-GM. La flecha en doble dirección representa la distancia entre el cultivo GM y no-GM. El análisis de la progenie se realizó por *bulk* (conjunto de plantines) y por sitio, mediante las técnicas de DAS-ELISA y PCR. La presencia de transgenes se representa con el símbolo (+), la ausencia de los mismos se representa con el símbolo (-).

En el **Caso 3** el productor sembró un cultivo de maíz “Blanco Cangüé” de unas 2.5ha, y junto al borde SE del mismo sembró 0.7ha de un maíz transgénico evento MON810. Se muestrearon dos sitios en la chacra no-GM, uno en el borde junto al maíz GM y otro a 20 metros hacia el interior del cultivo. Del primer sitio se colectaron 11 espigas, a partir de las cuales se produjeron 259 plantines. Estos se organizaron en cuatro *bulks* para analizar por DAS-ELISA y PCR. Cada *bulk*, fue “abierto” en cinco grupos obteniéndose un total de 20 sub-muestras compuestas, de las cuales 14 dieron positivas para la presencia de transgenes. Por lo tanto, al menos 14 de los 259 individuos analizados portaron transgenes. En el segundo sitio se colectaron 12 espigas, a partir de las cuales se produjeron 218 plantines. Estos se organizaron en cuatro *bulks*, y se analizaron por DAS-ELISA y por PCR. Tres de estos *bulks*, resultaron positivos para la presencia de transgenes. Los mismos se abrieron en 5 grupos, dando lugar a 20 sub-muestras, que se analizaron nuevamente. De estas 20 sub-muestras, tres resultaron positivas, por lo que al menos tres individuos de los 218 resultaron GM. Por PCR se confirmó que el evento presente en las muestras positivas fue el MON810 (Figura 19).

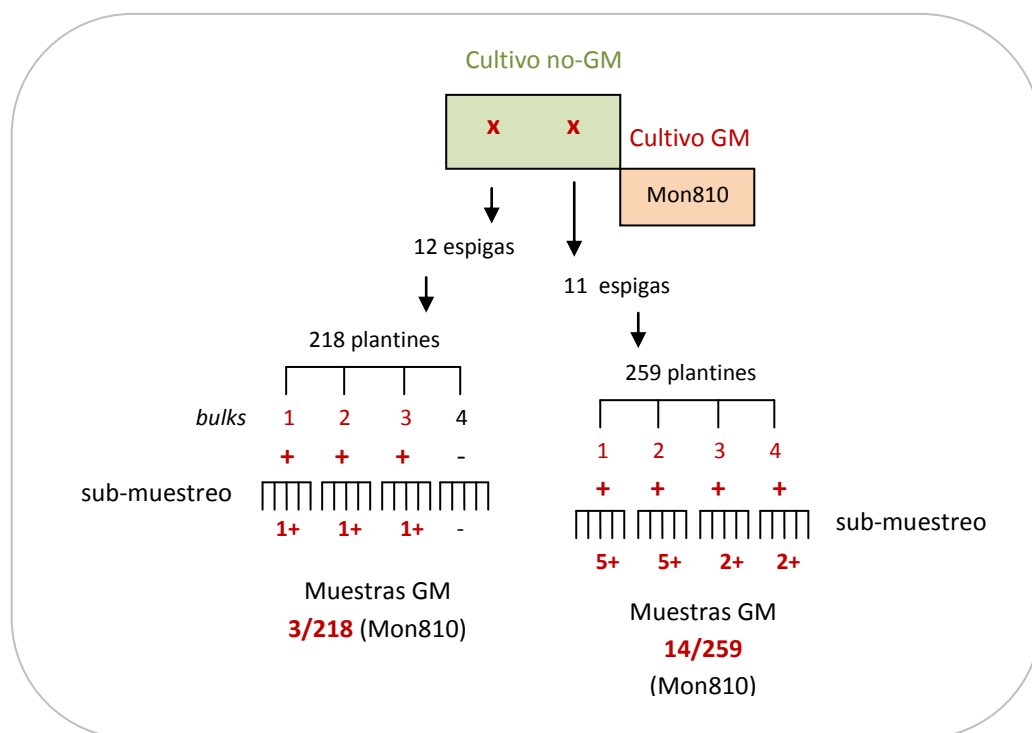


Figura 19. Representación gráfica del caso 3 “flujo de transgenes”. El diseño es únicamente ilustrativo. “x” representa el sitio de muestreo dentro de la chacra no-GM. En este caso, el cultivo no-GM se encontró junto al cultivo GM (0 metros de distancia). El análisis de la progenie se realizó por *bulk* y por sitio mediante las técnicas de DAS-ELISA y PCR. La presencia de transgenes se representa con el símbolo (+), la ausencia de los mismos se representa con el símbolo (-).

El **Caso 10** consistió en una chacra de maíz de 1,4 ha. sembrada con semillas del productor, obtenidas a partir de la tercer generación de plantas hijas de un cultivar híbrido. A 24m al E de esta chacra (separadas por un camino), se encontraba un cultivo de 1,1ha de maíz GM, evento MON810. Para el muestreo de la chacra no-GM se definieron dos transectas paralelas, separadas por 60 metros entre sí. En cada transecta se muestrearon cuatro sitios: un sitio en el borde más cercano a la chacra GM y los subsiguientes a los 20, 50 y 100 metros hacia el interior del cultivo. Se detectaron transgenes en los dos sitios más cercanos a la chacra no-GM (10.1 y 10.2). Del sitio 10.1 se colectaron 30 espigas y se produjeron 300 plantines. Estos se organizaron en cinco *bulks*, de los cuales cuatro resultaron positivos para la presencia de transgenes al ser analizados por DAS-ELISA y por PCR. Al menos cuatro individuos de los 300 analizados portaron transgenes. En el sitio 10.2 se colectaron 19 espigas, a partir de las cuales se produjeron 303 plantines organizados en cinco *bulks*. Dos de estos *bulks*, resultaron positivo para la presencia de transgenes. Por PCR se determinó que el evento presente en las muestras positivas fue el MON810 (Figura 20).

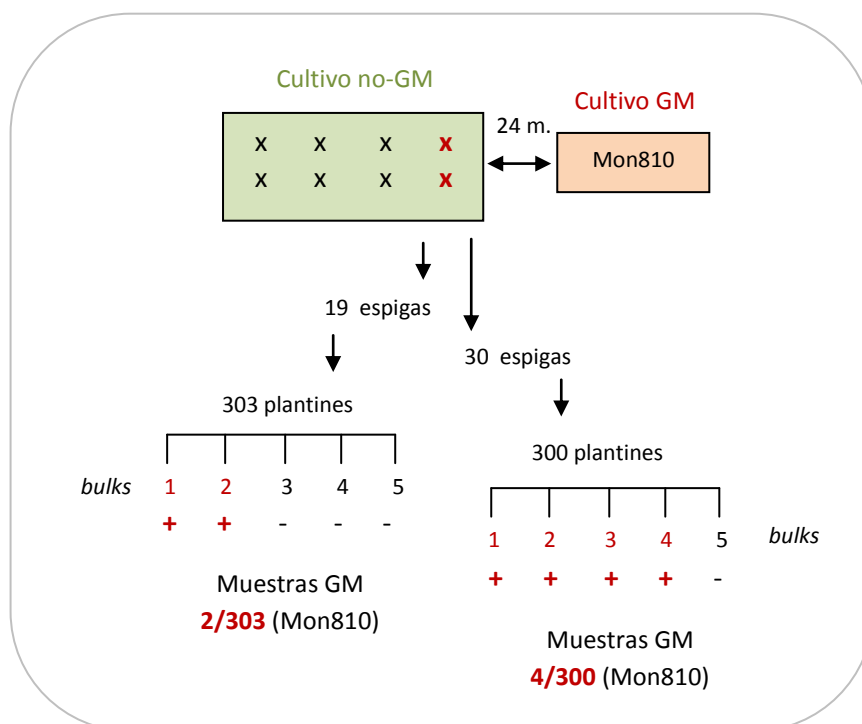


Figura 20. Representación gráfica del caso 10 “flujo de transgenes”. El diseño es únicamente ilustrativo. “x” representa el sitio de muestreo dentro de la chacra no-GM. La flecha en doble dirección representa la distancia entre el cultivo GM y no-GM. El análisis de la progenie se realizó por *bulk* y por sitio mediante las técnicas de DAS-ELISA y PCR. La presencia de transgenes se representa con el símbolo (+), la ausencia de los mismos se representa con el símbolo (-).

En el **Caso 12**, un cultivo de maíz “Blanco Cangüé” de 10ha fue sembrada a 260 metros de un cultivo de maíz GM de 11,5ha. La diferencia en las fechas de siembra de estos cultivos fue de cinco días. Para el muestreo de la chacra no-GM, se definieron tres transectas paralelas separadas por 90 metros entre sí. En cada transecta se muestrearon cuatro sitios: un sitio en el borde más cercano a la chacra GM y los subsiguientes a los 20, 50 y 100 metros del borde hacia el interior del cultivo. En el sitio 12.2 se colectaron 35 espigas, a partir de las cuales se produjeron 311 plantines. Los mismos se organizaron en cinco *bulks*, y se analizaron por DAS-ELISA y por PCR. Tres de los cinco *bulks*, resultaron positivos para la presencia material GM, por lo que al menos tres de los 311 individuos analizados portaron transgenes. En el sitio 12.3 se colectaron 32 espigas, produciéndose 321 plantines. Los mismos se repartieron en 5 *bulks*, y luego del análisis se encontró que dos de ellos portaban transgenes. En el sitio 12.5 a 20 metros del borde del cultivo, se colectaron 30 espigas, se produjeron 305 plantines y se formaron 5 *bulks*. Como resultado, uno de los cinco *bulks* mostró la presencia de transgenes. Por PCR se determinó que el evento presente en todos los individuos GM encontrados, perteneció a la variedad de maíz MON810 (Figura 21).

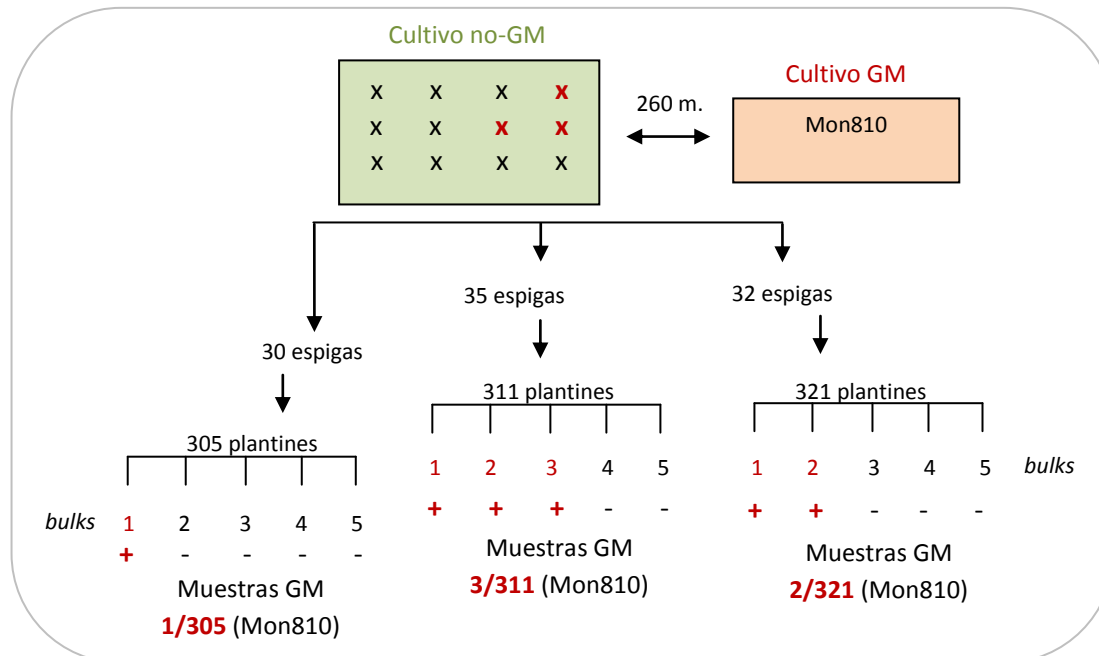


Figura 21. Representación gráfica del caso 12 “flujo de transgenes”. El diseño es únicamente ilustrativo. “X” representa el sitio de muestreo dentro de la chacra no-GM. La flecha en doble dirección representa la distancia entre el cultivo GM y no-GM. El análisis de la progenie se realizó por *bulk* y por sitio mediante las técnicas de DAS-ELISA y PCR. La presencia de transgenes se representa con el símbolo (+), la ausencia de los mismos se representa con el símbolo (-).

Para los cuatro casos descritos, la mayor frecuencia de interpolinización se encontró en el borde del cultivo no-GM más cercano al cultivo GM vecino y fue disminuyendo hacia el centro de la parcela. Este comportamiento ya ha sido descrito en otros trabajos referidos al flujo de transgenes, en donde se ha postulado que los principales factores que determinan la polinización cruzada, son la sincronía de la floración y las distancias entre los campos donantes y receptores ^[74-78]. En este estudio se observó que en aquellos casos en donde los cultivos se encontraron a distancias mayores a 420m unos de otros (Tabla 9. Caso 2, 4, 8, 9, 11), no hubo polinización cruzada con transgénicos. Sin embargo, en las situaciones donde las distancias fueron menores a 500 metros (Tabla 9. Caso 1, 3, 10 y 12), pudo presenciarse este fenómeno. Cabe destacar, que en dos de los casos en los que se observó polinización cruzada, las distancias entre los campos superó los 250 metros recomendados para evitar la interpolinización entre las variedades de maíz en Uruguay. Esto muestra que la recomendación actual no resulta suficiente para evitar el flujo génico, al menos en las condiciones en las que se realizó este ensayo.

Con respecto a las fechas de floración, ha sido demostrado que la sincronía entre la dispersión de polen y la floración femenina es un factor crucial para el cruzamiento del maíz ^[165]. El maíz produce granos de polen antes y durante la emergencia de la flor femenina para asegurar que la mayoría de las plantas se polinicen con una planta de maíz vecina. Normalmente se acepta que el polen de maíz se libera durante un periodo típico de 5-8 días, dependiendo de la variedad ^[166]. Por ello, se asume que un retraso en la floración mayor a esa cantidad de días sería suficiente para reducir el flujo de polen entre los campos vecinos. En los casos estudiados en este trabajo, se observó que la mayor frecuencia de interpolinización ocurrió en situaciones en donde las diferencias en las fechas de siembra fueron mínimas (1-2 días). No obstante, estas observaciones no se pueden atribuir únicamente a las fechas de siembra, dado a que los cultivos involucrados con estas características se encontraron a distancias muy pequeñas (0-20metros).

Se ha postulado que mediante el establecimiento de ciertas distancias entre los cultivos y la sincronía en las fechas de siembra, se podría estimar la tasa de presencia accidental de maíz GM en un cultivo no-GM ^[74]. Esto resulta muy importante debido a que se han definido límites umbrales para la presencia accidental de material GM en alimentos derivados de maíz. La detección de un porcentaje mayor al 1% de contenido GM en un alimento, implica la obligatoriedad del etiquetado del producto. No obstante, definir un valor de distancia y sincronía en la fecha de siembra para mantener un porcentaje por

debajo del umbral establecido en la nueva legislación, resulta muy difícil. Los resultados de este trabajo muestran que el fenómeno de flujo génico se relaciona con otros factores como el tamaño de la chacra, el área sembrada, la orientación y la distancia entre los cultivos. Según los datos de este estudio, esta distancia entre los cultivos no-GM y GM, no debería ser menor a los 420 metros y las diferencias en las fechas de siembra no menor a los 14 días (condiciones en las que se observó una frecuencia de 0,92%). Como se observa en la Tabla 10, el caso 3 mostró frecuencias mayores a 5% en los sitios contiguos al cultivo GM y frecuencias de 1,38% a una distancia de 20 metros. El caso 10 mostró frecuencias mayores a 0,66% y 1,3% en los sitios comprendidos en el borde del cultivo no-GM a 24 metros de distancia del cultivo GM vecino. Por otra parte, el caso 1 alcanzó frecuencias mayores a 0,9% a distancias de 420 metros del cultivo GM y el caso 12 mostró frecuencias de 0,96% y 0,33% a 260 y 280 metros respectivamente.

Extracción y amplificación de ADN de un grano de polen de maíz

Se compararon distintas estrategias de extracción de ADN, utilizadas especialmente para extraer ADN de un grano de polen de maíz; el método de Suyama (2008), el de Chen (2008), el de Isagi (2011), y una modificación propia del método de Chen. Todos los protocolos contaron con un paso de lisis, en donde el grano de polen se sometió a una solución con sales y fue tratado a altas temperaturas para liberar el ADN. Luego de la lisis, se prosiguió con la amplificación por PCR de distintas regiones blanco dentro de la secuencia del ADN del polen.

En primer lugar, todos los productos de las extracciones fueron analizados por PCR para detectar una secuencia específica de la especie *Zea mays*. En este caso, se eligió una región de 225 pb del gen de la *invertasa* de maíz. A partir de este análisis se observó que los únicos protocolos que lograron rendir ADN amplificable por PCR, fueron los de Chen (2008) y el correspondiente a su modificación (Figura 22). Los dos protocolos restantes, descritos por Suyama (2008) e Isagi (2011) respectivamente, no lograron amplificar ADN del polen. Esto pudo deberse a la escasa presencia de molde de ADN para la amplificación, o a la presencia de inhibidores de la PCR.

La presencia de los inhibidores fue monitoreada mediante la amplificación de un Control Interno Positivo (CIP), que consistió en una secuencia de ADN que no está presente en la muestra (exógena) y que es fácilmente detectable utilizando el par de

cebadores adecuados. Tras el ensayo, la amplificación del CIP demuestra la ausencia de inhibidores de la PCR en la muestra estudiada ^[163]. Para este caso se eligió como CIP, una secuencia de ADN de manzana detectable con los cebadores universales descritos por Taberlet y colaboradores (1991) ^[164]. Estos cebadores se encuentran dirigidos hacia el intrón *trn-l* presente en los cloroplastos de especies vegetales, incluida la manzana (*malus* sp.). Debido a que el polen de maíz no contiene cloroplastos ^[167], estos cebadores representan una buena elección para el análisis de inhibición.

Los resultados de este análisis (que aquí no se muestran), ciertamente revelaron la existencia de inhibición de la PCR cuando se utilizaron los protocolos descritos por Suyama e Isagi. Esta inhibición pudo darse por la presencia de componentes interferentes o inactivadores de la enzima polimerasa contenidos en la solución de lisis, tales como la proteinasa K, o el detergente SDS ^[159].

Como se comentó anteriormente, el método de Chen y el método de Chen modificado rindieron los mejores resultados de amplificación por PCR, tanto para un solo grano de polen, como para diez granos de polen. Asimismo, el método modificado de Chen fue el de mejor rendimiento, logrando obtener una banda nítida del tamaño esperado (225pb) en el gel de poliacrilamida al 12% (Figura 22, carril 8 del panel A y carril 3 y 4 del panel B). Dicho método resultó ser el más sencillo, debido a que sólo utiliza una solución de lisis con KOH y Tris-HCl, sumado a dos rondas de incubación a altas temperaturas y una centrifugación a bajas velocidades. La diferencia exitosa de esta modificación respecto al protocolo original, parece estar en la eliminación del detergente *Tween-20* y el agente quelante EDTA que podrían interferir con la actividad de la ADN polimerasa en la reacción de PCR ^[104].

Por otra parte, a partir del ADN extraído utilizando el protocolo de Chen y su modificación, se realizó una PCR con los cebadores HMGAF/R, también específicos para maíz, pero que amplifican un fragmento más pequeño de 79 pares de bases. Se obtuvieron resultados similares a los ilustrados para los cebadores IVR1/2. Ambos protocolos, probados con uno y diez granos de polen, permitieron la amplificación de la región específica para maíz, siendo el método modificado el que mostró bandas de mayor intensidad (no se muestra).

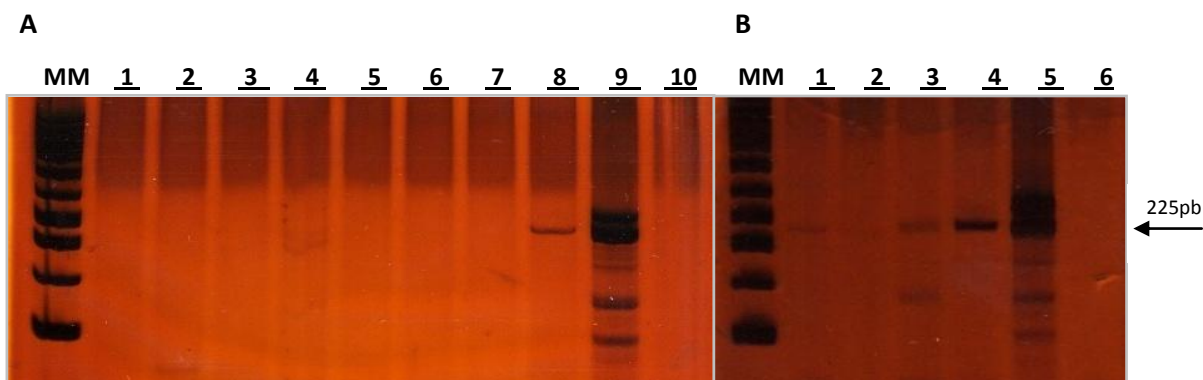


Figura 22. Visualización de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación de una región del gen de la *invertasa* de maíz (225pb), sobre el ADN extraído de polen, según los distintos protocolos descritos. Panel A (izquierda): MM- Marcador de peso molecular 100pb (DNA Ladder), 1- ADN extraído de 1 grano de polen utilizando el protocolo de Suyama (2008), 2- ADN extraído de 10 granos de polen utilizando el protocolo de Suyama (2008), 3- ADN extraído de 1 grano de polen siguiendo el protocolo de Chen (2008), 4- ADN extraído de 10 granos de polen siguiendo el protocolo de Chen (2008), 5- ADN extraído de 1 grano de polen utilizando el protocolo de Isagi (2011), 6- ADN extraído de 10 granos de polen utilizando el protocolo de Isagi (2011), 7- ADN extraído de 1 grano de polen siguiendo el protocolo modificado de Chen (2008), 8- ADN extraído de 10 granos de polen siguiendo el protocolo modificado de Chen (2008), 9- Control positivo de PCR (ADN extraído de hojas de maíz), 10- Control negativo de PCR (sin ADN). Panel B (derecha): MM- Marcador de peso molecular 100pb, 1- ADN extraído de 1 grano de polen siguiendo el protocolo de Chen (2008), 2- ADN extraído de 10 granos de polen siguiendo el protocolo de Chen (2008), 3- ADN extraído de 1 grano de polen siguiendo el protocolo modificado de Chen (2008), 4- ADN extraído de 10 granos de polen siguiendo el protocolo modificado de Chen (2008), 5- Control positivo de PCR (ADN extraído de hojas de maíz), 6- Control negativo de PCR (sin ADN).

Luego de comprobar que los protocolos lograron extraer el ADN del polen, de forma amplificable y sin inhibidores de la PCR, se intentó detectar la presencia del promotor 35S presente en las variedades transgénicas de maíz. Asimismo se buscó detectar el evento transgénico MON810, por ser la variedad de maíz de donde se colectó el polen estudiado (Figura 23, panel A y B respectivamente). En el panel A de la Figura 23 (correspondiente a la electroforesis en poliacrilamida al 12%) se observa que todas las muestras analizadas revelan una banda de aproximadamente 82 pares de bases, correspondiente a la secuencia del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor. A su vez, en el panel B se observan bandas de un tamaño aproximado de 170 pares de bases, que se corresponden con el tamaño de la secuencia específica del evento MON810. Estos resultados demuestran que ambos protocolos (Chen y Chen modificado), utilizando uno o diez granos de polen, fueron capaces de rendir ADN de buena calidad amplificable con distintos juegos de cebadores específicos. No obstante, los mejores resultados se observaron tras la utilización del protocolo de Chen modificado por nuestro grupo.

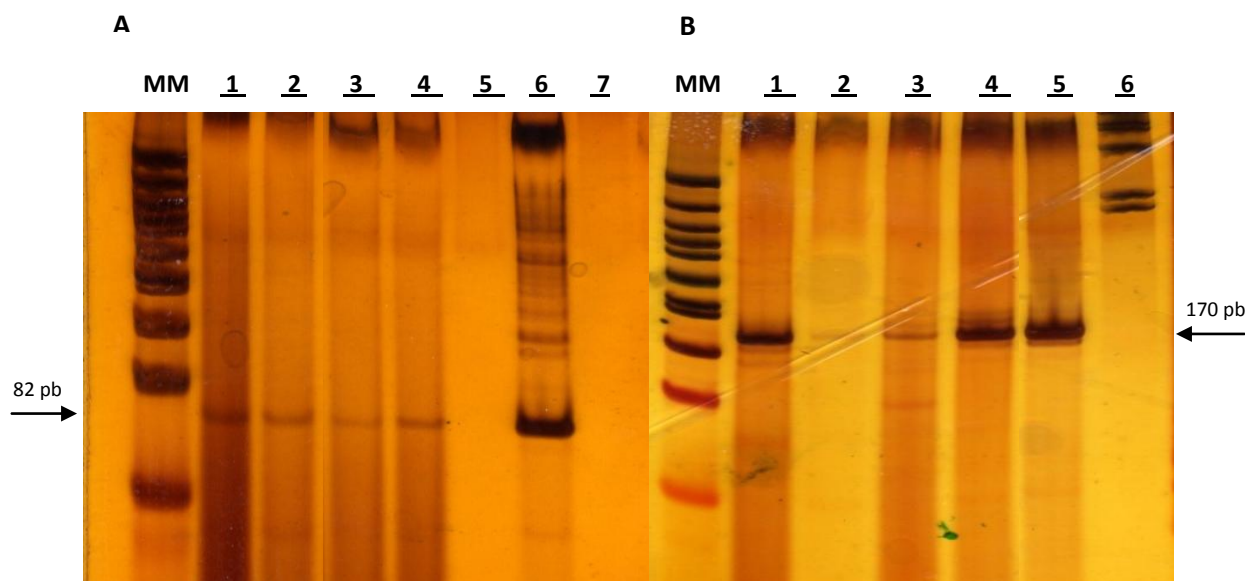


Figura 23. Visualización de los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del promotor 35S (82pb) y la amplificación del evento específico MON810 (170p). Panel A (izquierda): MM- Marcador de peso molecular 50pb (DNA Ladder), 1- ADN extraído de 1 grano de polen siguiendo el protocolo de Chen (2008), 2- ADN extraído de 10 granos de polen siguiendo el protocolo de Chen (2008), 3- ADN extraído de 1 grano de polen siguiendo el protocolo modificado de Chen (2008), 4- ADN extraído de 10 granos de polen siguiendo el protocolo modificado de Chen (2008), 5- (-), 6- Control positivo de PCR (ADN extraído de hojas de maíz de la variedad MON810), 7- Control negativo de PCR (sin ADN). **Panel B (derecha):** MM- Marcador de peso molecular 50pb, 1- ADN extraído de 1 grano de polen siguiendo el protocolo de Chen (2008), 2- ADN extraído de 10 granos de polen siguiendo el protocolo de Chen (2008), 3- ADN extraído de 1 grano de polen siguiendo el protocolo modificado de Chen (2008), 4- ADN extraído de 10 granos de polen siguiendo el protocolo modificado de Chen (2008), 5- Control positivo de PCR (ADN extraído de hojas de maíz de la variedad MON810), 6- Control negativo de PCR (sin ADN).

Finalmente, es importante destacar que se logró poner a punto y desarrollar una técnica fácil y rápida para la extracción y amplificación por PCR de un solo grano de polen, que sólo requiere de algunas técnicas básicas de biología molecular. No obstante, debe tenerse en cuenta que los principales problemas o dificultades asociadas a ésta, son causados por las pequeñas cantidades de ADN molde para la PCR. Por lo tanto, debe prestarse mucha atención durante los procedimientos de la extracción para asegurar el éxito de la misma, y para evitar posibles contaminaciones con otros ADN.

A su vez, todas las condiciones de PCR, incluyendo el diseño de los cebadores, la temperatura de *annealing*, el número de ciclos y la selección de la polimerasa deben ser optimizados para la amplificación del ADN extraído, ya que el mismo se encuentra en muy pequeñas cantidades y puede contener inhibidores de la PCR. Los cebadores fueron elegidos para ser específicos y complementarios con la secuencia diana. En el caso del

polen la cantidad de molde de ADN es extremadamente bajo y no se recomienda cebadores comunes o universales, ya que incluso un bajo nivel de desapareamiento de bases (*mismatches*) puede afectar el experimento ^[168]. Por último, las altas tasas de éxito de la amplificación se alcanzaron cuando la región diana para la amplificación fueron menores a los 200 pares de bases.

Como se comentó anteriormente, la importancia de este tipo de desarrollo reside en que tiene el potencial de facilitar la estimación de la ocurrencia del flujo de polen, a través del seguimiento directo del movimiento de los granos individuales. A la vez, permite el estudio genético de productos alimenticios que contienen granos de polen, tales como la miel. La miel puede contener entre 0,1 a 0,5% de polen y éste puede provenir total o parcialmente de plantas transgénicas. Este fenómeno, que ha sido comprobado, podría constituir un problema para los países exportadores de miel que quieren comercializar sus productos como naturales y orgánicos. Este es el caso de Uruguay, quien exporta gran parte de la producción de miel a países europeos. En el año 2011 empresas alemanas frenaron la importación de mieles uruguayas, argumentando que contenía polen transgénico, lo que impidió la exportación de miel de nuestro país a dicha región.

3

Trabajos Experimentales

TRABAJO EXPERIMENTAL II.

“Detección y cuantificación de OGM
en alimentos derivados de maíz”



I. Introducción

En más de 30 países se ha adoptado una legislación específica para el control de la producción de los OVGМ y de los alimentos que los contienen ^[95]. En los últimos años, se dictaron diversas normas que imponen la obligación de identificar a los “alimentos genéticamente modificados o transgénicos” que se comercializan, a través de leyendas en el rótulo o bien mediante la exhibición de listas de productos que los contienen en los puntos de venta al público ^[93].

Uruguay avanzó en este tema primero mediante la redacción de un proyecto de ley, presentado por parte de un equipo interdisciplinario al Parlamento en Julio de 2013, el cual exigía el etiquetado obligatorio de los alimentos compuestos o derivados de organismos genéticamente modificados. El mismo buscaba *“promover el derecho de los consumidores al acceso a información clara sobre la trazabilidad de los alimentos procedentes de OGM, garantizándoles la elección y contribuyendo a las transacciones justas entre vendedor y comprador”*. A su vez, proponía realizar el seguimiento de estos alimentos para poder detectar e identificar *“cualquier efecto directo, indirecto, inmediato, diferido o imprevisto, que estos puedan producir en la salud humana o el ambiente después de su comercialización”* ^[99]. Si bien este proyecto de ley no fue aprobado, a fines del año 2013 la Junta Departamental de Montevideo aprobó el **Decreto N° 34.901**, que establece la obligatoriedad del etiquetado en los alimentos que contienen más de un 1% de material GM, y que se comercializan en el departamento (productos nacionales e importados). Esta normativa comenzó a implementarse en el mes de enero del 2015.

Si bien hasta el año 2010 se encontraban aprobados para consumo directo únicamente dos eventos transgénicos para maíz (Bt11 y MON810), a la fecha Uruguay tiene autorizados diez eventos diferentes y otros tantos se encuentran en etapa de evaluación agronómica. Esto muestra la necesidad de poner a punto, a corto plazo, técnicas moleculares de trazabilidad que permitan detectar y cuantificar de forma rápida y sencilla, los OGM que pudieran estar presentes en los alimentos.

El presente trabajo plantea desarrollar e innovar en técnicas de biología molecular para detectar y cuantificar transgénicos en muestras reales de alimentos, y de esta forma facilitar y fortalecer los sistemas de control, a la vez de obtener datos originales.

II. Materiales y Métodos

Para llevar a cabo la detección y cuantificación de OGM en alimentos se siguió la estrategia metodológica ilustrada en la siguiente figura (Figura 24). Se buscó obtener ADN genómico en buena cantidad y calidad, para luego detectar mediante la estrategia de *screening* de OGM por PCR, la presencia del *CaMVp35S* y del *t-Nos*. Las muestras positivas fueron analizadas en busca de los eventos MON810, Bt11, GA21, TC1507 y Bt176. Finalmente se realizó la cuantificación del promotor *CaMVp35S* mediante qPCR.

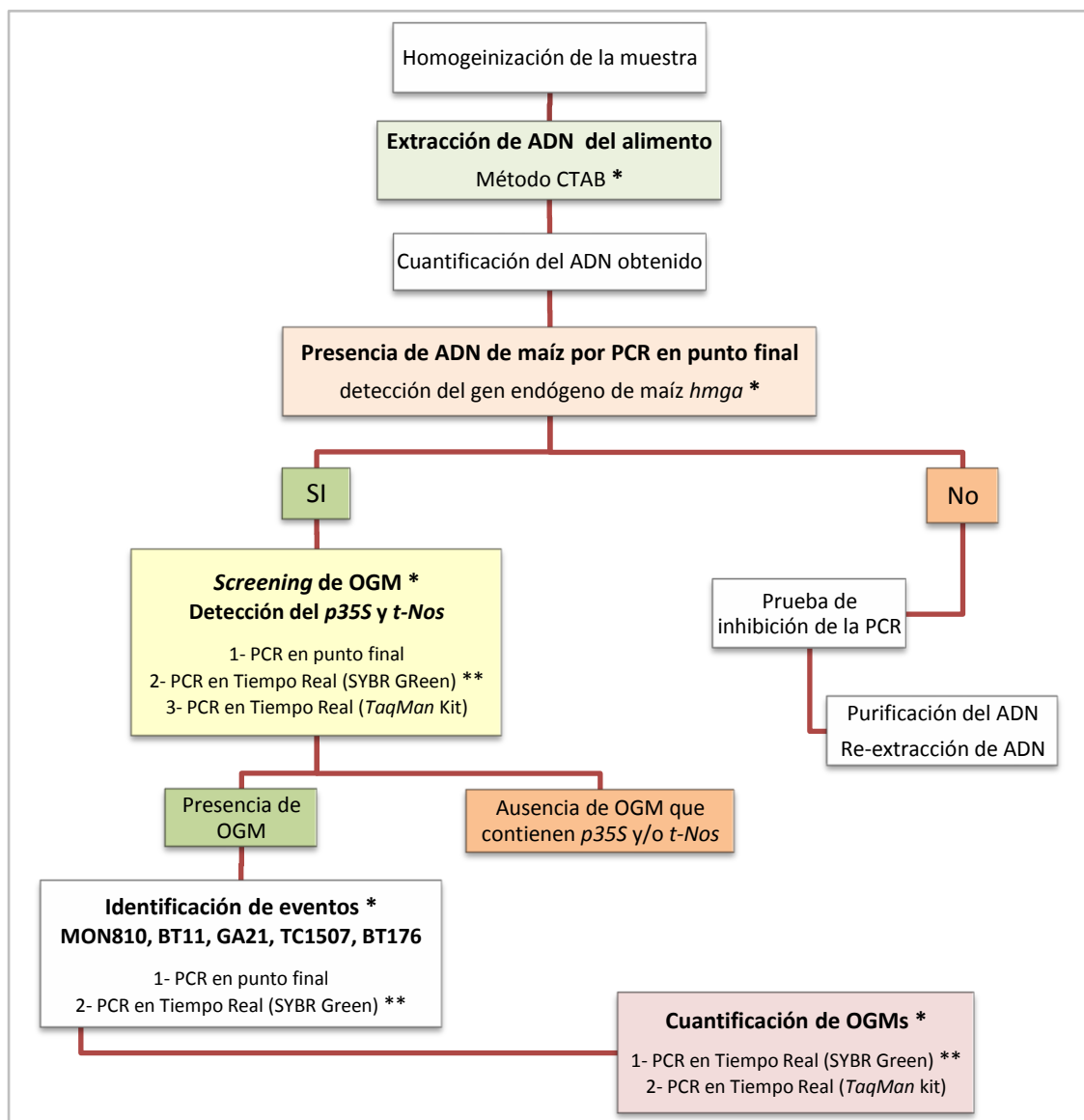


Figura 24. Esquema metodológico utilizado para la detección, identificación y cuantificación de OGM en materias primas y alimentos. * Protocolos validados internacionalmente. ** Previo al análisis de los alimentos las PCR en Tiempo Real con SYBR® Green fueron puestas a punto siguiendo los parámetros de validación: selectividad, especificidad, sensibilidad, exactitud, linealidad, LOD y LOQ.

Materiales de Trabajo

1. Muestras de Alimentos

Los alimentos a estudiar fueron cedidos por el Laboratorio de Bromatología de la Intendencia de Montevideo en el marco del convenio N° 3061/93 y por el responsable del Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria. Fueron muestreados del mercado local e internacional, varios productos a base de maíz elaborados en distintos países: Argentina, Uruguay, Brasil, Chile, México, España, Francia, Alemania y Estados Unidos. Se eligieron para el análisis los siguientes alimentos: cereales, tortillas, granos y productos de copetín (*snacks*), los cuales fueron identificados con números del 1 al 51. Del total, 21 se encontraron en los comercios de Uruguay y 30 en el mercado internacional (ver información detallada en **Anexo III**).

2. Materiales de referencia

Para evaluar la especificidad y la sensibilidad de las técnicas de detección de OGM y para validar los ensayos de identificación y cuantificación de los mismos, se utilizaron Materiales de Referencia Certificados (MRC) importados desde el *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM, Bélgica) ^[146]. Se emplearon como controles positivos, harinas certificadas de seis variedades de maíz GM: MON810, Bt11, GA21, NK603, TC1507 y Bt176, y como control negativo sus respectivos blancos no-GM (*blank*). Los códigos y contenidos de cada uno se describen a continuación (ver información detallada en **Anexo III**):

- ERM-BF412f, Bt-11 MAIZE (5%GM) - ERM-BF412a, Bt-11 MAIZE (blank 0%GM)
- ERM-BF413gk, MON 810 MAIZE (10%GM) - ERM-BF413ak, MON 810 MAIZE (blank 0%GM)
- ERM-BF414f, GA21 MAIZE (5%GM) - ERM-BF414a, GA21 MAIZE (blank 0%GM)
- ERM-BF411f, Bt-176 MAIZE (5% OGM) - ERM-BF411a, Bt-176 MAIZE (blank 0% OGM)
- ERM-BF415f, NK603 MAIZE (5% OGM) - ERM-BF415a, NK603 MAIZE (blank 0%OGM)
- ERM-BF418d, TC1507 MAIZE (10%OGM) - ERM-BF418a, TC1507 MAIZE (blank 0%OGM)

Extracción de ADN

Con el fin de minimizar los errores del análisis y realizar un muestreo representativo, los alimentos fueron homogenizados minuciosamente previo a la toma de muestra y pulverizados con Nitrógeno líquido antes de la extracción del ADN.

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de *Doyle & Doyle (1987)* ^[158], con algunas modificaciones que se detallan en el **Anexo I**. Aproximadamente 2 gramos de alimento, fueron colocados en un mortero limpio para su pulverización con Nitrógeno líquido. Posteriormente se tomó 100 mg del pulverizado y se lo colocó en un tubo de 2.2ml. Se agregó 1 ml de solución de extracción de CTAB y se incubó durante 60 ± 5 minutos, a $65 \pm 2^\circ\text{C}$. Una vez concluida la incubación, se prosiguió con pasos de desproteización y precipitación descritos en el **Anexo I**. La concentración del ADN extraído se calculó mediante lecturas de absorbancia a 260nm, en un espectrofotómetro de microvolúmenes (*NanoDrop*, Thermo Scientific, EE.UU). La pureza del ácido nucleico se estimó a partir de la relación de absorbancia a 260nm/280nm. Se consideraron puras las muestras de ADN cuya relación Abs260/Abs280 se situó entre 1,6 y 1,8 ^[159].

Cada muestra de ADN fue diluida en H₂OmQ hasta una concentración final de 100ng/μl para ser utilizada en los ensayos de PCR en punto final y 25ng/μl para ser utilizada en la PCR en Tiempo Real. Las mismas fueron almacenadas en *freezer* a -20°C hasta su posterior utilización.

Detección de maíz mediante PCR en Punto Final

El producto resultante de cada extracción fue analizado por PCR en punto final, para confirmar la presencia de ADN de maíz y descartar la presencia de inhibidores de la PCR. Para ello, se buscó amplificar el gen endógeno *hmga* (*High mobility group proteins*), que codifica para una proteína del grupo de alta movilidad de esa especie.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 25μl, cada tubo conteniendo: 1μl de ADN molde (100ng/μl), 1μl del cebador directo (10μM), 1μl del cebador reverso (10μM), 0.25μl de dNTPs (10mM), 0.25μl *Immolase DNA polymerase* (1U), 2.5μl *Buffer* 10X, 1.25μl MgCl₂ (50mM), H₂OmQ c.s.p. 25μl.

Los cebadores utilizados fueron obtenidos del Compendio de métodos de referencia para el análisis de OGM de la UE ^[142] (Tabla 10).

Tabla 10. Cebadores utilizados para la detección del gen *hmgA* de maíz. Reportados por el *Joint Research Centre* (JRC) de la Unión Europea ^[142].

CEBADOR	NOMBRE	Secuencia 5' - 3'	Tm °C	Tamaño amplicón	Temp. trabajo	METODO Ref.
Directo	HMGA-F	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA	58.9	79 pb	60°C	QT/ZM/020
Reverso	HMGA-R	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T	62.1			

La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador *Maxygen Terminal Cycler T1000* (Axygen EE.UU), el cual se programó para realizar 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 33 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Por último una extensión de 7 minutos a 72°C.

La visualización de los productos de PCR se realizó a través de una electroforesis en acrilamida al 12%, utilizando para su revelado la técnica de tinción en plata (ver **Anexo II**).

Screening de OGM

El rastreo de OGM en los alimentos fue efectuado en dos plataformas distintas, PCR en punto final y PCR en Tiempo Real, con el fin de comparar las sensibilidades y los límites de detección de cada una de ellas. El *screening* por PCR en punto final se llevó a cabo siguiendo los métodos de referencia del *Joint Research Centre* (ver apartado siguiente). El *screening* por PCR en Tiempo Real se realizó con la química de *SYBR® Green* y paralelamente utilizando sondas específicas de tipo *TaqMan®*. El protocolo de detección con *SYBR® Green* fue puesto a punto y verificado antes de realizar el análisis de los alimentos, mientras que la detección con sondas *TaqMan®* se llevó a cabo directamente sobre estos, utilizando kits validados internacionalmente (ver más adelante).

Para el *screening* de OGM se eligieron como secuencias diana de detección al promotor *CaMVp35s* y el terminador *Nos (t-Nos)*, por encontrarse en la totalidad de los eventos de maíz autorizados en el país y en gran parte de los eventos liberados en los países que comercializan sus productos en Uruguay. Como se ilustra en la Tabla 11, de los diez eventos de maíz liberados en Uruguay, siete contienen tanto el *CaMVp35S* como el

t-Nos, mientras que dos poseen únicamente al promotor mencionado y uno solamente a la secuencia terminadora.

Para detectar la presencia de OGM en alimentos también suelen buscarse las secuencias del promotor del virus del mosaico del higo (FMV), y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* que codifica para la enzima *fosfoinotricin-acetil transferasa* (*pat*), de tolerancia al glufosinato de amonio ^[117,121]. Estas secuencias son blancos frecuentes de los kits comerciales para la detección de OGM.

Tabla 11. Secuencias génicas presentes en los eventos de maíz autorizados en Uruguay. SI: la secuencia se encuentra presente en la construcción del evento, NO: la secuencia no se encuentra presente. (*) El evento de maíz Bt176 no se encuentra autorizado en Uruguay, pero si en Argentina y EEUU que comercializan gran parte de sus productos en nuestro país.

Nombre del EVENTO de maíz	Promotor <i>CaMVp35s</i>	Terminador- <i>nos</i>	Promotor FMV	Gen <i>bar</i>
MON810 (MON-00810-6)	SI	NO	NO	NO
BT11 (SYN-BT011-1)	SI	SI	NO	NO
NK603 (MON-00603-6)	SI	SI	NO	NO
TC1507 (DAS-01507-1)	SI	NO	NO	NO
GA21 (MON-00021-9)	NO	SI	NO	NO
GA21 X BT11	SI	SI	NO	NO
MON810 x NK603	SI	SI	NO	NO
TC1507 X NK603	SI	SI	NO	NO
MON89034 X TC1507 X NK603	SI	SI	SI	NO
Bt11 X GA21 X MIR162	SI	SI	NO	NO
Bt176*	SI	NO	NO	SI

1. Screening de OGM mediante PCR en punto final

Para la detección del *CaMVp35s* y del *t-Nos* por PCR convencional, se utilizaron los cebadores del Compendio de Métodos de Referencia del JRC (método SC/ELE/012) ^[142] detallados con anterioridad en la Tabla 5 (Trabajo Experimental I pág.67). Cada elemento fue detectado en reacciones de PCR separadas, utilizando las mismas condiciones de ciclado e iguales concentraciones de reactivos.

Las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen total de 25µl, conteniendo: ADN molde (100ng/µl), Cebador directo (10µM) Cebador reverso (10µM), dNTPs (10mM), *Immolase DNA polymerase* (1U), *Buffer* 10X, MgCl₂ (50mM), H₂O c.s.p. 25µl.

El ciclado se realizó en un termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin Elmer). El aparato fue programado para realizar 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguido 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.

La visualización de los productos de PCR se realizó a través de una electroforesis en acrilamida al 12%, utilizando para el revelado, la técnica de tinción en plata (ver **Anexo II**). Paralelamente al análisis de las muestras se ensayó un control negativo o blanco de PCR (sin ADN molde) y un control positivo conteniendo la secuencia génica blanco.

2. Puesta a punto del *screening* de OGM por PCR en Tiempo Real (*SYBR® Green*)

El protocolo elegido como guía para el *screening* de OGM por qPCR (*SYBR® Green*), fue el propuesto por Barbau-Piednoir y colaboradores en el año 2010 ^[117]. El mismo consiste en la amplificación de las secuencias del promotor *35S* y del terminador *nos*, mediante el uso de cebadores específicos y la detección de los productos amplificados a partir de la señal fluorescente emitida por el agente intercalante *SYBR® Green*. Dicho protocolo, al igual que el descrito recientemente por Barbau-Piednoir en el 2014 ^[121], ha sido validado y publicado como Método de Referencia por el *Joint Research Centre* (Método QL-ELE-00-17) ^[142].

En primera instancia se realizó la puesta a punto del método evaluando parámetros de validación tales como la especificidad, selectividad y eficiencia de los cebadores utilizados, y la sensibilidad y el límite de detección de la técnica. Posteriormente se prosiguió con el análisis de cada una de las muestras de alimentos.

Todas las reacciones de PCR se realizaron en el equipo ABI 7500 PCR System (*Applied Biosystems*), en un volumen final de 25µl, conteniendo: 2µl de ADN (25ng/µl), 12.5µl de *SYBR® Green* PCR Mastermix con ROX (*Life technologies*), 10µM de cada cebador y H₂O c.s.p. 25µl. Se aplicó el siguiente programa de ciclado: un único ciclo de activación de la enzima ADN polimerasa por 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 30 segundos a 95°C (desnaturalización), y 1 minuto a 60°C (*annealing* y extensión). Luego de finalizada la reacción de amplificación, se prosiguió con el análisis de la temperatura de *melting* de los productos obtenidos. Para ello se programó un ascenso gradual de

2.2 Especificidad y selectividad de los cebadores

Se evaluó la habilidad de los cebadores CaMVp35s F/R y t-Nos F/R de amplificar única y específicamente la secuencia blanco correspondiente. Para ello, se analizaron distintos materiales de referencia certificados (MRC): (i) ERM-BF412f, correspondiente a la línea de maíz Bt11 conteniendo la secuencia génica *p35S* y *t-Nos*; (ii) ERM-BF413gk, correspondiente a la línea de maíz MON810 que contiene únicamente la secuencia del promotor *35S*; y (iii) ERM-BF414f, correspondiente a la línea GA21 el cual contiene únicamente al terminador *nos*.

Por otro lado y para evaluar la existencia de falsos positivos del método, se analizaron los materiales de referencia certificados no transgénicos (blancos no-GM). Además, en cada una de las pruebas se incluyó un blancos de reacción (sin ADN) para evaluar la formación de dímeros de cebadores y la intensidad de la fluorescencia de base del método.

2.3 Sensibilidad y cálculo del Límite de detección (LOD)

El límite de detección de la técnica fue definido como la menor concentración de ADN transgénico (LOD relativo en %m/m) que puede ser detectada en un 95% de las determinaciones^[137]. Este límite fue calculado para ambas secuencias blanco, *CaMVp35S* y *t-Nos*. Para ello, se corrieron cuatro réplicas del MRC de la línea NK603 (conteniendo al *p35S* y al *t-Nos*) con distintas concentraciones de material GM: 5%, 1%, 0.1% y 0.01% (m/m) y se definió el menor valor para el cual las cuatro réplicas dieron positivas. Con los resultados de este análisis se construyeron las curvas de calibración para cada juego de cebadores, graficando los valores de Ct, respecto al logaritmo (log) de las concentraciones de los MRC. A partir de las curvas de calibración se calcularon las eficiencias de las reacciones de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente}) - 1} \times 100$$

Luego de poner a punto las condiciones para la detección de las dos secuencias, se analizaron muestras de ADN extraídas de distintos alimentos procesados a base de maíz. Cada extracción de ADN fue analizada por duplicado colocando una cantidad de 50ng en la reacción de PCR.

3. Screening de OGM mediante PCR en Tiempo Real – *TaqMan*® Kits

El rastreo de OGM también fue realizado utilizando la tecnología de sondas específicas del tipo *TaqMan*®, a partir del análisis con Kits comerciales. Para este caso se analizaron 40 muestras correspondientes a los alimentos numerados del 12 al 51. Los resultados de este ensayo fueron comparados con los obtenidos mediante el análisis por PCR convencional y PCR en Tiempo Real utilizando *SYBR*® *Green*.

El *kit* elegido para detectar transgénicos en alimentos fue el de la empresa BIOTECON *Diagnostics* (Alemania), “*foodproof*® *GMO Screening Kit* (35S, NOS, bar, FMV)”, compatible con el equipo de PCR en Tiempo Real, *Applied Biosystems* 7500. Dicho *kit* utiliza cebadores específicos y sondas *TaqMan*® fluorescentes para detectar las secuencias del promotor 35S, el terminador *nos*, el gen *bar*, y el promotor *FMV*, de forma simultánea en una única reacción de PCR. El mismo es capaz de detectar 10 copias de ADN (LOD), con un coeficiente de variación menor al 10%, tiene una especificidad absoluta y no ha reportado resultados de falsos positivos^[169].

Antes de comenzar con el análisis de las muestras de alimentos, el *kit* fue verificado internamente siguiendo las especificaciones del fabricante, analizando distintos materiales de referencia certificados del IRMM (datos no mostrados).

Identificación de eventos específicos de maíz

Luego de realizar el *screening* de OGM en los alimentos se prosiguió con los ensayos de identificación de eventos. Se buscaron cuatro eventos de maíz autorizados para consumo en Uruguay: MON810, Bt11, Ga21, TC-1507 y un evento no autorizado Bt176, que podría encontrarse en los productos alimenticios por estar permitido en Argentina y EE.UU. La estrategia general del análisis consistió en utilizar cebadores específicos que amplifican la región de unión entre el genoma de la planta y la construcción génica, específica del evento buscado (estrategia *evento específica* - Figura 10, pág.43). Al igual que para el caso anterior, la identificación de eventos se llevo a cabo mediante PCR en punto final y por PCR en Tiempo Real. Cada método de identificación por qPCR fue puesto a punto y verificado según parámetros de rendimiento establecidos en las guías de verificación de métodos de detección de OGM^[133] y las normas estándares ISO 24276, 5725, 17025^[140, 143, 144].

1. Identificación de eventos mediante PCR en punto final.

Para la identificación de los eventos Bt176, GA21, MON810, Bt11, TC1507, se utilizaron los cebadores reportados en los métodos de referencia del JRC (métodos QT/ZM/002, QT/ZM/003, QT/ZM/004, QT/ZM/006, QT/ZM/010 respectivamente) ^[142]. Las secuencias de los cebadores utilizados y el tamaño de los amplicones resultantes, se resumen en la Tabla 12. Cada evento se detectó en reacciones de PCR separadas pero utilizando las mismas condiciones de ciclado e iguales concentraciones de reactivos.

Tabla 12. Cebadores utilizados para la identificación de los eventos de maíz MON810, Bt11, GA21, TC1507, Bt176. Reportados por el *Joint Research Centre (JRC)* de la Unión Europea ^[142].

EVENTO	CEBADOR	Secuencia 5' - 3'	Tm °C	Tamaño amplicón	Temp. Trabajo	METODO Ref.
MON810	MON810-IVS-HSP-F	GATGCCTTCTCCCTAGTGTTGA	60.3	113 pb	60°C	QT/ZM/004
	MON810-CRY 1A(B)-R	GGATGCACTCGTTGATGTTTG	57.9			
Bt11	Bt11-INS-F	GCGGAACCCCTATTGTTTA	55.3	70 pb	60°C	QT/ZM/006
	Bt11-3'JUN-R	TCCAAGAATCCCTCCATGAG	57.3			
GA21	GA21-OTP-F	GAAGCCTCGGCAACGTCA	58	133 pb	60°C	QT/ZM/003
	GA21-ESPS-R	ATCCGGTTGGAAAGCGACTT	57.3			
TC1507	TC1507-F	TAGTCTTCGGCCAGAATGG	58	58 pb	60°C	QT/ZM/010
	TC1507-R	CTTTGCCAAGATCAAGCG	54			
Bt176	Bt-176- CryIA(b)-F	TGTTCAACCAGCAGCAACCAG	59.4	100 pb	60°C	QT/ZM/002
	Bt-176-IVS9PEPC-R	ACTCCACTTTGTGCAGAACAGATCT	61.3			

Las reacciones de PCR se efectuaron en un volumen total de 25µl, conteniendo: ADN molde (100ng/µl), Cebador directo (10µM), Cebador reverso (10µM), dNTPs (10mM), *Immolase DNA polymerase* (1U), *Buffer* 10X, MgCl₂ (50mM), H₂O c.s.p. 25µl.

El ciclado se realizó 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.

La visualización de los productos de PCR se realizó a través de una electroforesis en acrilamida al 12%, utilizando para el revelado, la técnica de tinción en plata (ver **Anexo II**). Paralelamente al análisis de las muestras se ensayó un control negativo o blanco de PCR (sin ADN molde), y un control positivo conteniendo el elemento génico a detectar.

2. Puesta a punto de la Identificación de eventos por PCR en Tiempo Real (SYBR® Green)

La identificación de los eventos mediante esta técnica se realizó utilizando los cebadores descritos en la Tabla 12 del apartado anterior. Cabe destacar, que los mismos se encuentran diseñados para ser utilizados en PCR en Tiempo Real. Debido a que la mayoría de los protocolos de identificación de eventos descritos hasta la fecha, se basan en la utilización de sondas específicas *TaqMan*®, la estrategia de identificación con *SYBR*® Green debió ser puesta a punto y validada internamente con los materiales de referencia certificados del IRMM. Los resultados obtenidos, fueron comparados con los correspondientes al ensayo por PCR en punto final.

Todas las reacciones se llevaron a cabo en 25µl totales, conteniendo: 2µl de ADN (25ng/µl), 12.5µl de *SYBR*® Green PCR Mastermix con ROX (*Life technologies*), 1µl del cebador directo (10 µM) y 1µl del cebador reverso (10 µM) y H₂O mQ c.s.p. 25µl.

Se utilizó el equipo ABI 7500 PCR System (*Applied Biosystems*), el cual se programó de la siguiente manera: un ciclo de activación de la enzima ADN polimerasa por 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, y 1 minuto a 60°C para el *annealing* y la extensión. Luego de finalizada la reacción de amplificación, se prosiguió con el análisis de la temperatura de *melting* de los productos obtenidos. Para ello se programó un ascenso gradual de temperatura desde 60°C a 95°C y se tomaron los datos de intensidad de fluorescencia cada 30 segundos.

El análisis de los datos, y los criterios de aceptación para considerar una muestra como positiva, se siguieron de igual forma que para el *screening* de OGM por *SYBR*® Green (Ver apartado “Análisis de datos”, pág. 96).

2.1 Especificidad y selectividad de los cebadores

Se evaluó la habilidad de los cebadores para amplificar única y específicamente los eventos de transformación correspondientes. Cada juego de cebadores fue probado sobre los materiales de referencia certificados del evento específico y sobre las demás líneas transgénicas. A su vez, se analizaron los controles no-GM y los blancos de PCR (sin ADN), para evaluar la existencia de falsos positivos del método, la formación de dímeros de cebadores y la intensidad de fluorescencia de base de la técnica.

2.2 Sensibilidad y cálculo del Límite de detección (LOD)

Al igual que para el método de *screening* de OGM por *SYBR® Green*, el límite de detección fue definido como la menor concentración de ADN transgénico (LOD relativo en %m/m) que puede ser detectada en un 95% de las determinaciones ^[137]. Para cada estrategia evento específica se corrieron distintas concentraciones del MRC genéticamente modificado correspondiente, con un contenido GM de 5%, 1%, 0.1% y 0.01% y se definió el menor valor para el cual se obtuvo una señal de fluorescencia por encima del umbral detectable. Para el evento Mon810 y el evento TC1507 la mayor concentración ensayada fue de 10% GM. A partir de los resultados de este análisis, se generaron las curvas de calibración y se calcularon las eficiencias de reacción como se mostró anteriormente.

Luego de poner a punto las condiciones del ensayo se prosiguió con el análisis de las muestras de ADN extraídas de los distintos alimentos procesados a base de maíz. Cada alimento se analizó por duplicado, colocando una cantidad del ADN extraído de 50ng finales en la reacción de PCR.

Cuantificación de OGM mediante qPCR

1. Cuantificación mediante sondas *TaqMan®* - Kit comercial

Las muestras que resultaron positivas para la presencia de la secuencia transgénica *p35S*, fueron cuantificadas utilizando el kits de la empresa BIOTECON *Diagnostics "foodproof® GMO 35S Maize Quantification Kit"*. Este kit detecta específicamente al promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (*CaMVp35S*) y al gen de la invertasa de maíz (*ivr*), permitiendo el cálculo del porcentaje de material GM en dicha especie. El límite de detección del kit se encuentra en 25 copias de la secuencia blanco y el límite de cuantificación en 0.1% GM (m/m) ^[169].

A diferencia de otros kits de cuantificación que determinan individualmente la cantidad de cada evento específico, este kit permite abarcar una mayor cantidad de material transgénico, ya que detecta a todos aquellos OGM que contienen el promotor 35S. A pesar de ello, la limitante del mismo reside en que no logra detectar a los OGM que carecen de este elemento (ej. el evento GA21).

2. Aproximación a la cuantificación de OGM por qPCR (SYBR® Green)

2.1 Curvas de calibración y cálculo del Límite de Cuantificación (LOQ)

La aproximación a la cuantificación de OGM mediante *SYBR® Green*, se realizó diseñando dos curvas de calibración, una para el gen endógeno de maíz *hmgA* (normalizador) y una para el promotor *35S*. Las curvas fueron construidas utilizando diluciones del MRC de la línea NK603 (5% GM), conteniendo aproximadamente 100, 50, 10, 1 y 0,1 ng de ADN genómico. Estas concentraciones corresponden a 18348, 3670, 367 y 36 copias del genoma haploide de maíz (considerando el valor 1C de la especie), y 917, 184, 18 y 2 copias de material GM respectivamente.

Los valores obtenidos de Ct fueron graficados con respecto al logaritmo (log) del producto amplificado y tras la regresión lineal, se obtuvo el coeficiente de correlación (R^2) y la pendiente. A partir del valor de esta última, se calcularon las eficiencias de cada reacción.

El límite de cuantificación (LOQ) fue definido como la menor cantidad de material transgénico que pudo determinarse cuantitativamente con un nivel aceptable de precisión y exactitud, y se estimó a partir de las curvas de calibración ^[138].

2.2 Cálculo del porcentaje de OGM

Para cada muestra se determinó mediante interpolación con las curvas patrón, las cantidades correspondientes a la diana específica y al gen de referencia. El contenido de OGM (porcentaje) se estimó como el cociente entre la cantidad de secuencias de *p35S* sobre la cantidad de gen endógeno, multiplicado por 100 (%). Los cálculos se realizaron utilizando una planilla de cálculo especialmente diseñada para trazar las curvas patrón, calcular las eficiencias de reacción, calcular las concentraciones para cada secuencia blanco y estimar el contenido (porcentaje) de OGM en las muestras, tomando en cuenta las desviaciones de la técnica y un factor normalizador que contempla la diferencia entre las eficiencias de las dos curvas patrón.

Para amplificar la secuencia del promotor *35S* se utilizó el juego de cebadores CaMVp35S F/R (ver Tabla 5, pág. 68) y para amplificar el gen *hmgA*, se utilizaron los cebadores HMGAF/R (ver Tabla 10, pág. 93).

Las reacciones se llevaron a cabo en 25µl totales, conteniendo: 2µl de ADN (25ng/µl), 12.5µl de *SYBR® Green* PCR Mastermix con ROX (*Life technologies*), 1µl del cebador directo (10 µM) y 1µl del cebador reverso (10 µM) y H₂O c.s.p. 25µl. Se utilizó el equipo ABI 7500 PCR System (*Applied Biosystems*), el cual se programó de la siguiente manera: un ciclo de activación de la enzima ADN polimerasa por 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, y 1 minuto a 60°C para el *annealing* y la extensión. Luego de finalizada la reacción de amplificación, se prosiguió con el análisis de la temperatura de *melting* de los productos obtenidos. Para ello se programó un ascenso gradual de temperatura desde 60°C a 95°C y se tomaron los datos de intensidad de fluorescencia cada 30 segundos.

El análisis de los datos, y los criterios de aceptación para considerar una muestra como positiva, fueron los que se utilizaron para el *screening* de OGM por *SYBR® Green* (ver apartado “Análisis de datos”, pág. 96).

III. Resultados y Discusión

Puesta a punto del Screening de OGM mediante PCR en Tiempo Real (SYBR® Green)

1. Especificidad de los cebadores CaMVp35S F/R y t-Nos F/R

Los cebadores utilizados para detectar al promotor *CaMVp35S* y los utilizados para detectar el terminador *nos*, resultaron ser selectivos y específicos. Para el par CaMVp35S F/R, se obtuvieron señales de fluorescencia por encima del umbral detectable, en las líneas transgénicas (MRC) MON810 y Bt11 que contienen al promotor 35S (Ct=28,8 y Ct=29,7 respectivamente). No se detectó señal en la línea de maíz GA21, tampoco en los MRC no transgénicos (blancos), ni en el control negativo de PCR (sin ADN), que carecen de dicho elemento (Tabla 13). Debido a que no se observó la presencia de falsos positivos en este ensayo, la especificidad para el juego de cebadores CaMVp35S F/R se consideró de 100%.

Para el par de cebadores t-Nos F/R, se observaron señales de fluorescencia por encima del umbral detectable, en las líneas transgénicas Bt11 y GA21, que contienen en su construcción a la secuencia terminadora *nos* (Ct= 29,1 y Ct=29,5 respectivamente). No se detectaron señales de fluorescencia para la línea transgénica MON810 que no posee la secuencia *t-Nos*, ni para los blancos no-GM, o para el control negativo de PCR (sin ADN) (Tabla 13). La especificidad obtenida para el juego de cebadores t-Nos F/R, fue establecida en 100%.

Luego de visualizar las curvas de fluorescencia para cada MRC, se prosiguió con el análisis de las temperaturas de *melting* (T_m) de los productos amplificados con los dos juegos de cebadores (Figura 26). La curva de disociación obtenida con el par CaMVp35S F/R sobre los MRC de la línea MON810 y Bt11, resultó en un pico único de $T_m = 80 \pm 1^\circ\text{C}$. El mismo es característico de la secuencia del promotor 35S buscada. Cabe destacar que este pico no fue observado en el control de la línea GA21, ni en los blancos no-GM, o en el control negativo de PCR (sin ADN), que carecen de esta secuencia. No obstante, para estos últimos controles, se observó un leve pico de $T_m = 62 \pm 1^\circ\text{C}$, cuya intensidad de fluorescencia resultó insignificante respecto a la obtenida para el pico de $T_m = 80 \pm 1^\circ\text{C}$.

Este pico inespecífico podría estar indicando la formación de dímeros de cebadores y/o a la presencia de una señal de fluorescencia de base de la técnica.

Tabla 13. Ensayo de especificidad y selectividad para el juego de cebadores CaMVp35S F/R y t-Nos F/R. Se representan los valores obtenidos del ciclo umbral (**Ct**) y las temperaturas de melting (**Tm**) para los Materiales de Referencia Certificados, líneas transgénicas MON810, Bt11 y GA21, y para sus respectivos blancos no transgénicos. **SI**: la secuencia blanco está presente; **NO**: la secuencia blanco está ausente; **(-)** No hubo amplificación o la misma se encontró por debajo del límite de detección, con valores de Ct >36,5. **(*)** pico de Tm no característico para la secuencia blanco.

MATERIAL DE REFERENCIA CERTIFICADO				CEBADORES			
LÍNEA	% GM (m/m)	Secuencia blanco		CaMVp35S F/R		t-Nos F/R	
		P 35S	t-Nos	Ct	Tm	Ct	Tm
MON810 (GM)	10%	SI	NO	28,8	80,6	-	62,2*
Bt11 (GM)	5%	SI	SI	29,7	80,8	29,1	73,2
GA21 (GM)	5%	NO	SI	-	62,7*	29,5	73,1
MON810 (blanco)	0%	NO	NO	-	62,2*	-	62,0*
Bt11 (blanco)	0%	NO	NO	-	62,0*	-	62,1*
GA21 (blanco)	0%	NO	NO	-	61,8*	-	62,4*
Control sin ADN	-	NO	NO	-	62,1*	-	62,0*

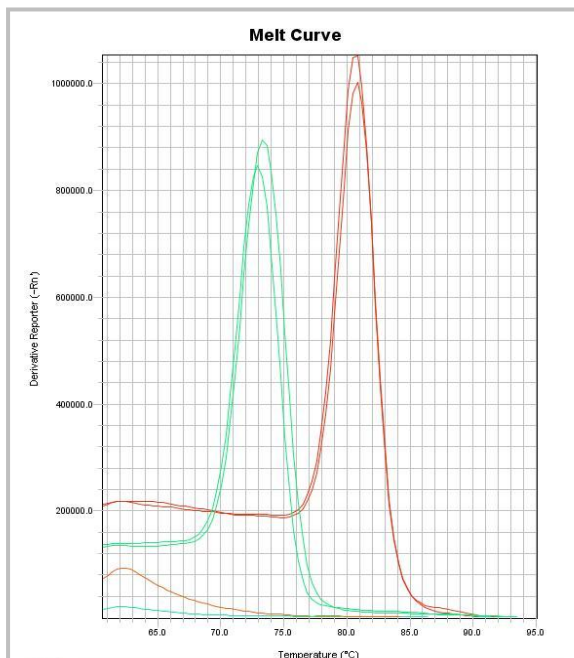


Figura 26. Curvas de disociación obtenidas con los cebadores CaMVp35S F/R y t-Nos F/R. En verde se muestra la curva de disociación obtenida para los productos de amplificación de los MRC Bt11 y GA21 y MON810 con los cebadores t-Nos F/R. Para los dos primeros, se observa un pico único de $73 \pm 1^\circ\text{C}$ correspondiente a la secuencia amplificada del terminador nos y para el MRC MON810 se observa un leve pico de Tm de $62,2^\circ\text{C}$. En rojo se muestra la curva de disociación obtenida para los productos de amplificación de los MRC Bt11, MON810 y GA21, utilizando los cebadores CaMVp35S F/R. Para los dos primeros, se observa un pico único de $80 \pm 1^\circ\text{C}$, correspondiente a la secuencia amplificada del promotor 35S. Para el MRC GA21 se observa un leve pico de Tm de $62,7^\circ\text{C}$.

El análisis de la curva de *melting* de los productos amplificadas con el par de cebadores t-Nos F/R, mostró un pico único de $T_m = 73 \pm 1^\circ\text{C}$ en los MRC Bt11 y GA21, no así en el MRC de la línea MON810, ni en los blancos, o en el control negativo de PCR (Figura 26). No obstante, para estos últimos controles, se observó un pico inespecífico de muy baja intensidad de fluorescencia de $T_m = 62 \pm 1^\circ\text{C}$, que podría corresponder a la presencia de dímeros de cebadores.

2. Sensibilidad y Límite de detección (LOD)

Para validar los ensayos de sensibilidad y calcular el límite de detección de la técnica de *screening* de OGM, se ensayaron distintas concentraciones del material de referencia de la línea de maíz NK603: 5%, 1%, 0,1%, 0,01% (m/m) de material GM. Para los dos juegos de cebadores estudiados CaMVp35S y t-Nos F/R, el Límite de Detección (LOD) fue definido en 0.01% (m/m) GM. Todas las réplicas ensayadas para esta cantidad de material GM, mostraron señales de fluorescencia por debajo del ciclo umbral (C_t) de 36,5 por lo que se consideraron positivas para el análisis por *SYBR® Green* (Figura 27). Los desvíos obtenidos entre las réplicas no superaron el valor de 10% (ver Tabla 14), lo que se ajustó a los criterios de aceptación definidos en las guías y normas ISO de análisis de OGM y validación de ensayos [133, 140].

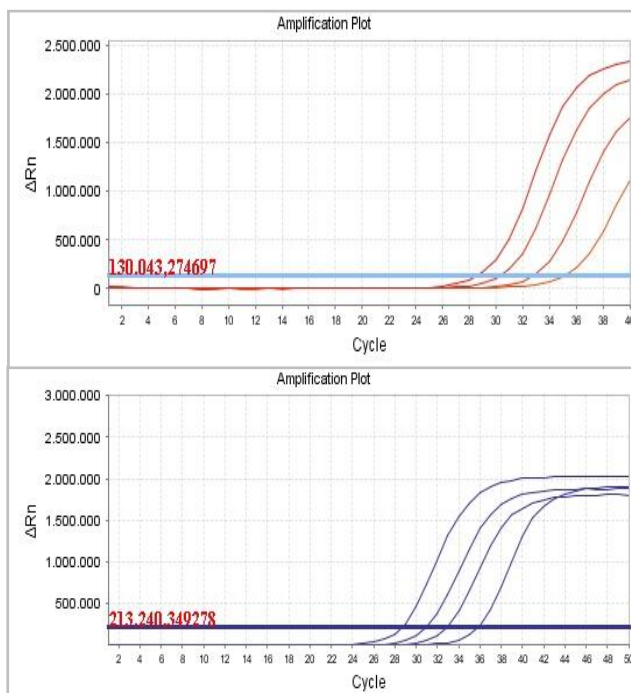


Figura 27. Análisis de sensibilidad para la detección del promotor 35S y del terminador t-nos. Superior: curvas obtenidas tras la amplificación del MRC NK603 5%, 1%, 0,1% y 0,01% GM, utilizando los cebadores CAMVp35s F/R.

Inferior: curvas obtenidas tras la amplificación del MRC NK603 5%, 1%, 0,1% y 0,01% GM, utilizando los cebadores t-Nos F/R. Mientras menor es el valor del ciclo en el que la curva de amplificación sobrepasa el umbral (línea horizontal), mayor es la cantidad inicial de ADN diana.

Este valor de 0,01% de material GM obtenido para las dos estrategias, equivale a 2 copias de ADN transgénico (Tabla 14). Cabe destacar, que el cálculo de copias equivalentes haploides a partir del valor de % m/m, se realizó teniendo en cuenta la naturaleza heterocigota del transgén en la línea NK603, y conociendo que el mismo contiene en su construcción, una sola copia del promotor 35S y una copia del Terminador *nos*.

El número de copias calculado en función del peso del material de referencia, se utilizó como una aproximación al número real de copias presentes. Al comparar los límites de detección del método de *screening* de OGM utilizando la técnica de PCR en punto final y la de Tiempo Real, se observó que esta última es diez veces más sensible que la técnica convencional (LOD PCR convencional = 0,1% GM ^[109]).

Los resultados mostraron que el *screening* de OGM para las dos secuencias, abarca un rango dinámico de detección de 0.01% a 5% (m/m) de material genéticamente modificado. Este rango permite detectar oportunamente el valor límite de 1% establecido para el etiquetado de alimentos GM en Montevideo. Cabe destacar que este ensayo sirve únicamente como un estimativo de la cantidad de OGM presentes y no como un método cuantitativo. La cuantificación de OGM siempre debe realizarse normalizando la cantidad de secuencias GM, respecto a la cantidad de secuencias endógenas de la especie.

Tabla 14. Ensayo de sensibilidad y límite de detección para los cebadores CAMVp35S F/R y t-Nos F/R. Se representan los valores promedios de **Ct** y los **desvíos** estándar calculadas para las cuatro réplicas ensayadas del MRC de la línea NK603, de concentraciones 5%, 1%, 0.1% y 0.01% GM (m/m). Los valores de **R²**, pendiente y Eficiencia, fueron obtenidos de la curva de calibración (Ct vs Log concentración) trazada para cada juego de cebadores. El resultado positivo fue definido para valores de Ct < 36,5.

MRC Línea NK603	N° Copias Equivalentes GM (50 ng ADN)	Positivos (n=4)	CAMVp35s F/R		t-Nos F/R	
			Ct promedio	Desvío St	Ct	Desvío St
5% GM	917	4/4	28,07	±0,06	28,05	±0,05
1% GM	184	4/4	30,01	±0,02	29,40	±0,04
0,1% GM	18	4/4	33,70	±0,05	33,30	±0,05
0,01% GM	2	4/4	36,30	±0,10	36,10	±0,09
R²			0,995		0,989	
Pendiente			-3,121		-3,102	
Eficiencia			109%		110%	

A partir de los resultados de Ct obtenidos para las distintas diluciones del MRC GM, se construyeron las curvas de calibración. La regresión lineal obtenida para la amplificación del *CaMVp35S*, fue $y = -3,121x + 30,22$ con un R^2 de 0,995. La eficiencia de esta reacción resultó en 109%. La ecuación obtenida para la amplificación del *t-Nos* fue $y = -3,102x + 29,92$ con un R^2 de 0,998. La eficiencia calculada resultó en 110%. Cabe destacar que las normas de referencia para el análisis de OGM admiten métodos de detección cuyos valores de R^2 son mayores a 0,98, sus pendientes se sitúan entre -3,1 y -3,6, y logran eficiencias de entre 86% y 110%^[133, 140]. Ambos protocolos ensayados cumplieron con los criterios de aceptación establecidos en las normas de referencia, por lo que se consideraron aptos para la detección de las secuencias transgénicas.

Luego de poner a punto el método de *screening* de OGM utilizando la química *SYBR® Green*, se prosiguió con el análisis de muestras de alimentos procesados a base de maíz. Los resultados de estos ensayos se muestran en el apartado “*screening*, identificación y cuantificación de OGM en muestras de alimentos” (pág. 113).

Puesta a punto de la identificación de eventos mediante PCR en Tiempo Real –SYBR® Green

1. Especificidad de los cebadores

Las especificidades de los cebadores utilizados para amplificar los diferentes eventos transgénicos, fueron estudiadas sobre los materiales de referencia correspondientes y sobre las demás líneas transgénicas. También se probaron sobre líneas no GM (blancos) y sobre controles negativos de PCR (sin ADN), de modo de estudiar la formación de dímeros de cebadores, la presencia de una señal de fluorescencia de base, y la probabilidad de detectar falsos positivos. La Tabla 15 ilustra los resultados de Ct y los valores de Tm obtenidos para cada uno de los cebadores específicos.

Para el juego de cebadores MON810 F/R, se observó una señal de fluorescencia por encima del umbral detectable, únicamente en el MRC de la línea MON810, no así en los demás materiales de referencia GM y no-GM. Asimismo, para esta línea GM se obtuvo un valor de Tm de $79 \pm 1^\circ\text{C}$, característico de la secuencia amplificada y correspondiente al evento MON810 (Figura 28). Para los demás MRC se obtuvieron Tm inespecíficas, de muy

baja señal de fluorescencia, que podrían estar indicando la formación de dímeros de cebadores.

Tabla 15. Ensayo de especificidad y selectividad para los cebadores utilizados en la detección de eventos específicos de maíz. Se representan los valores obtenidos del ciclo umbral (Ct) y las temperaturas de melting (Tm) para los Materiales de Referencia Certificados, líneas transgénicas MON810, Bt11, Ga21, TC1507 y Bt176 y para sus respectivos blancos no transgénicos. (-) No hubo amplificación, o la misma se encontró por debajo del límite de detección, con valores de Ct >36,5, (*) pico de Tm no característico para la secuencia blanco.

MATERIAL DE REFERENCIA		CEBADORES									
LÍNEA	%GM (m/m)	MON810 F/R		Bt11 F/R		GA21 F/R		TC1507 F/R		BT176 F/R	
	(50ng ADN)	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm	Ct	Tm
MON810	10%	26,9	79,0	-	70,4*	-	62*	-	61,9*	-	61,6*
Bt11	5%	-	70,4*	28,5	72,8	-	62,4*	-	61,9*	-	64*
GA21	5%	-	72,8*	-	61,8*	28,1	86,3	-	62,2*	-	63,0*
TC1507	10%	-	70*	-	62,0*	-	62,8*	26,8	77,5	-	61,8*
BT176	5%	-	72,7*	-	62,8*	-	62,4*	-	61,9*	29,9	80,9
MON810	0%	-	73,1*	-	62,8*	-	62*	-	61,9*	-	62,0*
Bt11	0%	-	70,3*	-	62*	-	62,8*	-	62,1*	-	62*
GA21	0%	-	70,4*	-	62,0*	-	62,4*	-	61,9*	-	62,3*
TC1507	0%	-	70*	-	62,8*	-	62,4*	-	62,9*	-	62,2*
BT176	0%	-	70,4*	-	62,3*	-	62,4*	-	61,9*	-	62*

Al igual que para el caso anterior, para los juegos de cebadores Bt11 F/R, GA21 F/R, TC1507 F/R y Bt176 F/R, se obtuvieron señales de fluorescencia por encima del umbral detectable, únicamente en el MRC de la línea transgénica correspondiente (Tabla 15). Asimismo, para cada línea transgénica se obtuvo un único pico de Tm, característico de la secuencia amplificada y correspondiente al evento específico (Figura 28). Al igual que para el caso anterior, los valores inespecíficos de Tm observados para los demás MRC no transgénicos, podrían estar indicando la formación de dímeros de cebadores, o la presencia de una señal de fluorescencia basal propia de la técnica. Cabe destacar que las intensidades de fluorescencia de las Tm inespecíficas, resultan insignificantes al compararlas con las intensidades de fluorescencia de los picos de Tm característicos de cada evento.

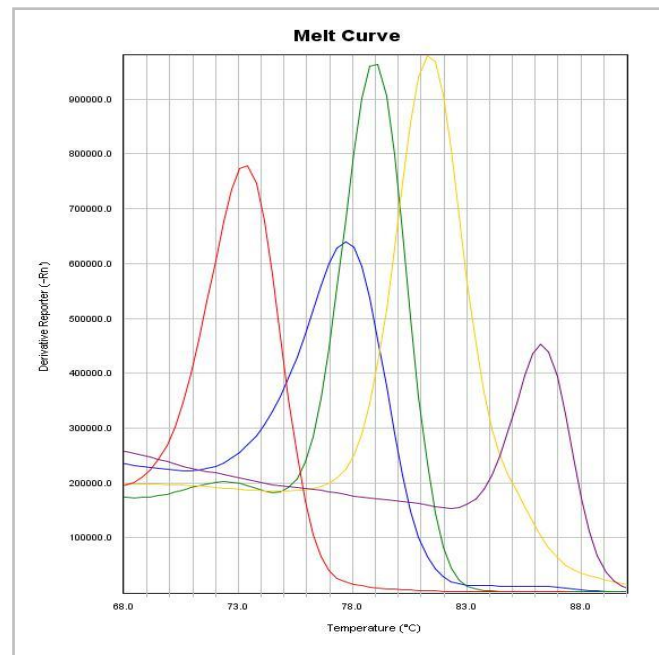


Figura 28. Curvas de disociación obtenidas tras la amplificación de los eventos específicos utilizando los MRC (GM). Curvas de disociación de los productos de amplificación utilizando los cebadores Bt11 F/R, TC1507 F/R, MON810 F/R, BT176 y GA21 F/R, sobre los materiales de referencia respectivos. MRC BT11 ($T_m=72,8$), MRC TC1507 ($T_m=77,5$), MRC MON810 ($T_m=79,0$), MRC Bt176 ($T_m=80,9$) y MRC GA21 ($T_m=86,3$).

2. Sensibilidad y Límite de detección (LOD).

El límite de detección para los ensayos de identificación de eventos específicos, se ubicó por debajo del valor de 0,01% GM (m/m). Para todas las concentraciones del MRC ensayadas, utilizando los distintos juegos de cebadores, se observaron señales de fluorescencia por encima del umbral detectable y por debajo del Ciclo 36,5 (Tabla 16). El valor de 0,01 % en masa, se estima en un valor de 2 copias de material transgénico. Como se comentó en el apartado anterior, este número se calculó asumiendo que los MRC utilizados son heterocigotas para el transgén y contienen una única copia de la construcción génica por genoma.

Las curvas de calibración obtenidas para los distintos juegos de cebadores específicos, mostraron pendientes con valores aceptables de entre -3,1 y -3,2. Las eficiencias obtenidas se ubicaron entre 105 y 110% y los R^2 se mantuvieron por encima del valor de 0,98 en todos los casos.

Tabla 16. Ensayo de sensibilidad y límite de detección de la identificación evento específica. Se representan los valores de Ct obtenidos para las distintas concentraciones de los MRC de las líneas transgénicas MON810, Bt11, GA21, TC1507 y Bt176. Los valores de R², pendiente y Eficiencia, fueron obtenidos de la curva de calibración (Ct vs Log concentración) trazada para cada juego de cebador sobre las distintas concentraciones del material de referencia correspondiente.

MRC	N° Copias GM Equivalentes	MON810 F/R	BT 11 F/R	GA21 F/R	TC1507 F/R	Bt176 F/R
(Línea GM específica)	(50 ng ADN)	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
10% GM	1834	26,90 ± 0,13	----	----	26,86 ± 0,03	----
5% GM	917	----	28,06 ± 0,07	28,09 ± 0,05	----	28,06 ± 0,03
1% GM	183	29,77 ± 0,03	30,91 ± 0,05	29,62 ± 0,04	30,51 ± 0,05	31,06 ± 0,04
0,1% GM	18	32,94 ± 0,010	34,04 ± 0,12	33,25 ± 0,04	33,94 ± 0,05	34,33 ± 0,11
0,01% GM	2	36,2 ± 0,2	36,5 ± 0,05	36,27 ± 0,11	36,39 ± 0,08	36,49 ± 0,07
R ²		0,999	0,989	0,994	0,992	0,980
Pendiente		-3,107	-3,103	-3,113	-3,202	-3,108
Eficiencia		109%	110%	109%	105%	109%

Los métodos de identificación de eventos abarcaron un rango dinámico de detección desde 0.01% a 10% (m/m) de material GM para el evento MON810 y el evento TC1507, y de 0,01% a 5% para los MRC restantes. Este rango permite detectar oportunamente el valor límite de 1% establecido por la reglamentación departamental para el etiquetado GM de alimentos.

Luego de poner a punto el método de identificación específica de OGM utilizando la química *SYBR® Green*, se prosiguió con el análisis de muestras de alimentos procesados a base de maíz. Los resultados del análisis se muestran en el apartado “screening, identificación y cuantificación de OGM en muestras de alimentos” (pág. 113).

Puesta a punto de la cuantificación de OGM por qPCR – *SYBR® Green*

1. Curvas de calibración y cálculo del Límite de Cuantificación (LOQ)

La aproximación a la cuantificación de OGM mediante qPCR-*SYBR® Green*, se realizó diseñando dos curvas de calibración, una para el gen endógeno de maíz *hmgA* y una para al promotor 35S. Ambas curvas fueron generadas a partir de los valores de Ct obtenidos para las distintas diluciones del MRC de la línea NK603 (5% GM). Se ensayaron cinco

niveles de concentración de 100, 50, 10, 1 y 0,1 ng de ADN, correspondientes a 36697, 18348, 3670, 367, 36 copias del genoma de maíz y 1835, 917, 183, 18 y 2 copias del transgén respectivamente (considerando el valor 1C de la especie). Para cada curva de calibración se obtuvo el valor de R^2 , la pendiente y se calculó la eficiencia de reacción. Los resultados se presentan en la Tabla 17.

Como se comentó anteriormente, para validar los ensayos de cuantificación relativa entre el gen de referencia y el transgén, las eficiencias de las dos reacciones deben ser similares. Las eficiencias obtenidas para la amplificación de la secuencia del promotor 35S y para el gen endógeno de maíz *hmga*, resultaron en 95%. Esto indica que el ensayo es adecuado para la detección cuantitativa. Las dos curvas estándar manifestaron valores de $R^2 > 0,98$, y pendientes entre -3,1 y -3,6, proporcionando una relación lineal en todo el rango de concentraciones ensayadas.

El límite de detección (LOD) del método fue definido en 2 copias equivalentes de material transgénico y el límite de cuantificación (LOQ) fue estimado en 18 copias del mismo. Si se considera que una muestra contiene inicialmente 18348 copias de ADN genómico en 50ng ensayados, la cantidad de 18 copias de transgén, se corresponde con 0,1% (m/m) de material GM.

Tabla 17. Eficiencias de las reacciones obtenidas para la cuantificación de OGM por qPCR. Se representan los valores de Ct obtenidos tras la amplificación de las diluciones del MRC NK603 (5% GM) utilizando los cebadores CaMVp35SF/R y los cebadores HMGA F/R. Para cada reacción se construyó una curva de calibración (Ct vs Log concentración) y se calculó el valor de R^2 , la pendiente y la eficiencia de amplificación. De las curvas de calibración, se obtuvo el n° de copias equivalentes de *p35S* y *hmga* para cada dilución del MRC y se calculó el % GM experimental, según la ecuación: n° copias *p35S* experimentales/ n° copias *hmga* x 100.

MRC NK603	HMGA F/R			CaMVp35S F/R			%GM Experimental
5% GM	n° Copias teóricas	Ct	n° copias experimental	n° Copias teóricas	Ct	n° copias experimental	(copias GM/copias Ref)*100
100ng	36697	24,10	53255,88	1835	25,89	2867,23	5,38
50ng	18348	26,31	12207,06	917,5	28,22	601,54	4,93
10ng	3669,7	27,99	3983,64	183,5	30	182,45	4,58
1ng	366,97	31,84	306,04	18,3	33,71	15,18	4,96
0,1ng	36,7	34,82	41,99	1,8	36,64	2,13	5,07
	Curva estándar			Curva estándar			
R^2	0,989			0,986			
Pendiente	-3,444			-3,435			
Eficiencia	94,7%			95,5%			

2. Cálculo del porcentaje de OGM

Para cada concentración del MRC NK603 (5% GM) ensayada, se calculó el número de copias de referencia y de transgén experimentales, interpolando los valores en la curva de calibración correspondiente. Para determinar el contenido de material GM en el MRC (en porcentaje), el número de copias de la diana *p35S*, se dividió por el número de copias del gen de referencia *hmgA* y se multiplicó por 100. Como se observa en la Tabla 17, para todas las diluciones del material de referencia, el porcentaje GM calculado se acercó al valor real de 5%. Los desvíos obtenidos entre los porcentajes GM teóricos y los reales se ubicaron dentro de los valores aceptados por las normas de referencia para la validación/verificación de los métodos de detección de OGM (<25%) ^[133]. Este resultado muestra que la cuantificación de material GM mediante la amplificación del promotor 35S, puede ser llevada a cabo de manera confiable en muestras reales de alimentos. Cabe destacar que la detección del promotor 35S sirve como una primera aproximación a la cuantificación del contenido de maíz GM en los alimentos. No obstante, la manera adecuada y recomendada para realizar el ensayo, es a través de la cuantificación de cada uno de los eventos de maíz y la posterior suma de los porcentajes ^[104].

Finalmente, luego de poner a punto este método de cuantificación de OGM, se prosiguió con el análisis de las muestras de alimentos que resultaron positivas para la presencia del promotor 35S. Los resultados se muestran a continuación.

Screening, identificación y cuantificación de OGM en muestras de alimentos derivados de maíz.

1. Screening de OGM

Tras la puesta a punto y la verificación de los métodos de *screening*, identificación y cuantificación de OGM mediante la técnica de PCR en Tiempo Real (*SYBR® Green*), se realizó el análisis de distintos alimentos derivados de maíz. Entre ellos se eligieron productos de copetín (*snacks*), cereales (copos de maíz), productos caseros tipo tortillas y granos de maíz cocidos, de diversos orígenes. A cada uno de ellos se le extrajo el ADN, que se cuantificó y se analizó para detectar la presencia de inhibidores de la PCR.

Este análisis fue realizado mediante la técnica de PCR en punto final, amplificado la región del gen endógeno específico de la especie de maíz, *hmgA*. El resultado de este estudio, reveló la ausencia de inhibidores de la PCR, en todos los ADN extraídos utilizando la modificación del protocolo descrito por Doyle & Doyle^[135] (no se muestra).

Luego de comprobar la calidad del ADN extraído, las muestras sin inhibidores fueron analizadas para la presencia de material genéticamente modificado. El *screening* de OGM se realizó utilizando la técnica de PCR convencional y la de PCR en Tiempo Real (qPCR), a fin de comparar los resultados y las sensibilidades de cada una. A su vez, el rastreo por qPCR se realizó utilizando la química *SYBR® Green* y utilizando kits comerciales conteniendo la tecnología de sondas específicas *TaqMan®* (BIOTECON *Diagnostics*)^[169].

Los resultados obtenidos del *screening* por *SYBR® Green* se detallan en la Tabla 18. Las curvas de amplificación y las temperaturas de *melting* obtenidas para las muestras se ilustran en el **Anexo IV (S1)**.

Se observó que los resultados del análisis por qPCR coinciden en su mayoría con los obtenidos mediante la amplificación por PCR en punto final (datos no presentados). No obstante, debido a que el límite de detección de la técnica de PCR convencional (0,1% GM) es mayor que el definido para la técnica de PCR en Tiempo Real (0,01% GM), algunas muestras que resultaron positivas para la presencia de la secuencia blanco en la técnica de qPCR, no pudieron ser definidas mediante la visualización en geles de poliacrilamida (muestras n° 7, 10, 39 y 48). Se demostró que la técnica de PCR en Tiempo real (*SYBR® Green*), puede utilizarse para detectar la presencia de trazas de material genéticamente modificado en muestras reales, logrando reducir los resultados falsos negativos.

Como se observa en la Tabla 18, a partir del rastreo de OGM por qPCR (*SYBR® Green*), se vio que 32 de las 51 muestras analizadas, presentaron alguno de los dos elementos transgénicos buscados. Este valor representó el 62,7% del total de las muestras estudiadas. De estas 32 muestras positivas, 30 presentaron tanto al promotor 35S como al terminador *nos*, y dos (muestras n° 13 y 18) únicamente a la secuencia promotora 35S (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados del análisis de screening de OGM y de la identificación de eventos específicos en muestras de alimentos derivados de maíz, mediante qPCR (SYBR® Green). Se representan los valores de Ct obtenidos para cada secuencia blanco. (-) **Resultado negativo**, corresponde a la ausencia de la secuencia buscada, debido a que no se observó señal de amplificación (ND) o la misma tuvo valores de Ct > 36,5; (+) **Resultado positivo** (coloreado), corresponde a la presencia de la secuencia buscada, definido para valores de Ct < 36,5 (límite de detección de la técnica). (*) Alimentos comercializados en Uruguay.

MUESTRA			Screening OGM		EVENTO ESPECÍFICO				
N°	NOMBRE	ORIGEN	p35s	t-Nos	MON810	Bt11	GA21	TC1507	Bt176
			Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
1	Granos de maíz blanco nativo	México	ND -	ND -	ND -	ND -	38,53 -	ND -	ND -
2	Granos de maíz	México	36,91 -	37,08 -	ND -	37,74 -	37,91 -	ND -	ND -
3	Tortilla de maíz blanco	México	33,95 +	32,09 +	38,18 -	34,86 +	39,57 -	ND -	ND -
4	Tortilla de maíz azul	México	34,71 +	32,71 +	ND -	35,21 +	37,73 -	ND -	ND -
5	Tortilla de maíz	México	34,76 +	32,32 +	33,71 +	33,38 +	35,46 +	ND -	ND -
6	Tortilla de maíz	México	29,88 +	29,32 +	ND -	32,46 +	35,35 +	39,85 -	ND -
7	Tortilla de maíz azul	México	36,08 +	33,82 +	ND -	34,25 +	ND -	ND -	ND -
8	Tortilla de maíz blanco	México	36,98 -	36,92 -	ND -	ND -	37,25 -	36,93 -	ND -
9	Tortilla de maíz blanco	México	37,4 -	36,76 -	36,94 -	37,18 -	38,43 -	39,92 -	ND -
10	Tortilla de maíz	México	35,87 +	34,05 +	ND -	35,4 +	37,59 -	37,34 -	ND -
11	Tortilla de maíz	México	29,87 +	29,99 +	ND -	37,03 -	36,87 -	ND -	ND -
12	Cheetos Torciditos queso chile	México	32,49 +	29,79 +	33,88 +	33,97 +	ND -	ND -	ND -
13	Topitos queso	México	31,65 +	36,84 -	31,76 +	ND -	ND -	ND -	ND -
14	Fritos de chile y limón	México	32,15 +	32,88 +	31,85 +	33,98 +	36,88 -	ND -	ND -
15	Doritos	Francia	32,12 +	34,83 +	34,2 +	ND -	38,03 -	ND -	ND -
16	Tortillas chili	Francia	32,58 +	33,74 +	35,37 +	36,82 -	35,37 +	ND -	ND -
17	3D	Francia	30,04 +	34,54 +	ND -	35,41 +	37,79 -	ND -	ND -
18	Tortillas de maíz	Francia	31,19 +	38,17 -	34,55 +	37,18 -	37,07 -	39,02 -	ND -
19	Tortillas naturales	México	29,74 +	29,48 +	32,35 +	ND -	38,12 -	ND -	ND -
20	Tortillas naturales	México	36,99 -	37,2 -	37,25 -	37,14 -	37,86 -	ND -	ND -
21	Doritos recargados	México	23,72 +	22,72 +	25,42 +	31,44 +	32,41 +	38,09 -	ND -
22	Crujitos queso y chile	México	29,70 +	28,95 +	30,32 +	34,58 +	39,28 -	ND -	ND -
23	Rancheritos	México	24,75 +	23,99 +	27,47 +	30,95 +	34,33 +	ND -	ND -

N°	NOMBRE	ORIGEN	p35s	t-Nos	MON810	Bt11	GA21	TC1507	Bt176
			Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct	Ct
24	Fritos chile	México	24,28 +	23,11 +	26,3 +	29,98 +	34,28 +	39,00 -	ND -
25	Doritos pizzerolas	México	23,91 +	23,29 +	25,97 +	30,51 +	33,78 +	ND -	ND -
26	Nachitas	EE.UU*	24,48 +	23,98 +	26,33 +	35,55 +	38,77 -	38,79 -	ND -
27	3D barbacoa	Argentina*	29,44 +	28,39 +	29,87 +	37,18 -	38,59 -	ND -	ND -
28	Fritos	España	29,25 +	35,1 +	32,44 +	30,48 +	ND -	ND -	ND -
29	Mix Bugles 3D's	España	37,46 -	ND -	ND -	39,66 -	36,85 -	ND -	ND -
30	MixCheetos	España	ND -	36,83 -	ND -	ND -	36,94 -	39,12 -	ND -
31	Mix Doritos	España	28,88 +	35,62 +	31,37 +	34,83 +	ND -	ND -	ND -
32	Mixcheetos 2	España	ND -	37,47 -	ND -	38,85 -	38,28 -	ND -	ND -
33	Hojuelas de maíz azucaradas	Alemania*	36,74 -	37,37 -	ND -	ND -	ND -	ND -	ND -
34	Hojuelas de maíz	Alemania*	ND -	37,44 -	37,9 -	ND -	38,2 -	ND -	ND -
35	Hojuelas de maíz	Argentina*	38,4 -	38,52 -	ND -	39,20 -	ND -	ND -	ND -
36	Hojuelas de maíz con miel	Argentina*	38,38 -	36,71 -	ND -	38,07 -	ND -	ND -	ND -
37	Cornflakes	Brasil*	37,73 -	ND -	ND -	39,02 -	ND -	ND -	ND -
38	Copos de maíz	Chile*	36,93 -	36,88 -	ND -	ND -	38,9 -	37,02 -	ND -
39	Copos con miel	EE.UU*	35,07 +	33,76 +	ND -	ND -	36,99 -	37,89 -	ND -
40	Copos frutales	Argentina*	29,36 +	25,79 +	ND -	29,26 +	33,78 +	38,28 -	ND -
41	Copos de maíz	Argentina*	36,91 -	37,93 -	ND -	38,20 -	ND -	ND -	ND -
42	Copos de maíz Azucarados	Argentina*	ND -	38,01 -	36,98 -	ND -	39,69 -	ND -	ND -
43	Copos de maíz	Uruguay*	ND -	38,77 -	36,88 -	ND -	38,07 -	ND -	ND -
44	Copos de maíz azucarados	Uruguay*	28,55 +	26,88 +	29,36 +	32,87 +	37,25 -	30,88 +	ND -
45	Bolitas dulces multicolor	Uruguay*	30,00 +	26,98 +	30,14 +	30,45 +	35,47 +	Ind -	ND -
46	Copos de avena y miel	Argentina*	30,16 +	27,22 +	31,62 +	29,44 +	37,3 -	31,51 +	ND -
47	Copos con azúcar	Argentina*	33,23 +	29,43 +	ND -	36,07 +	37,93 -	35,86 +	ND -
48	Copos sin azúcar	Argentina*	35,58 +	32,61 +	ND -	35,2 +	ND -	39,52 -	ND -
49	Copos de chocolate	Alemania*	37,19 -	37,31 -	37,06 -	ND -	ND -	ND -	ND -
50	Copos de chocolate	Argentina*	28,71 +	25,97 +	30,09 +	28,91 +	35,49 +	31,52 +	ND -
51	Copos de maíz tostado	Alemania*	36,81 -	37,44 -	ND -	38,0 -	ND -	ND -	ND -

Estos resultados fueron comparados con los obtenidos mediante el rastreo de OGM utilizando el kit comercial de la empresa BIOTECON *Diagnostics* (Tabla 19). Para este último caso, se estudiaron un total de 40 muestras, correspondientes a los alimentos N° 12-51. Los resultados obtenidos del *screening* mediante las dos aproximaciones fueron similares. Las muestras que resultaron negativas para la presencia del *p35S* y del *t-nos* por *SYBR® Green*, también resultaron negativas en el análisis con el kit comercial. Sin embargo, para el caso de las muestras positivas, se observaron algunas diferencias, que se atribuyeron a los límites de detección de ambas técnicas. A partir del análisis por qPCR *SYBR® Green* las muestras n° 15, 17, 28, 31, 39 y 48, resultaron positivas para la presencia del *p35S* y del *t-nos* (Tabla 18), sin embargo, mediante el análisis por el kit comercial sólo pudo detectarse la presencia del *p35S* o del *t-Nos* (Tabla 19). Cabe recordar, que en el análisis por *SYBR® Green* el resultado negativo es considerado cuando no hay amplificación o cuando la misma ocurre a partir de un valor de $Ct > 36,5$, mientras que en el análisis por el kit comercial el resultado negativo se define a partir de un $Ct > 35$ (según las especificaciones del fabricante). Si se observa cuidadosamente, los resultados que difieren entre ambas técnicas (Tabla 19, muestras coloreadas en naranja), coinciden con valores de Ct cercanos al ciclo 35, lo que resulta positivo para el análisis por *SYBR® Green* y negativo para el kit comercial.

Al mismo tiempo que el kit comercial detecta a los elementos *p35S* y *t-Nos*, también busca otras dos secuencias comunes a diversos eventos de maíz. Estas son el promotor del virus del mosaico del higo (FMV), y el gen *bar* que codifica para la proteína *pat* de tolerancia a herbicidas. El resultado del análisis mostró que ninguna de las muestras analizadas contenía la secuencia promotora del FMV (Tabla 19). Cabe destacar, que la única línea transgénica liberada en el país que contiene dicha secuencia, es el apilado MON89034xTC1507xNK603, más específicamente por contener el evento MON89034 (Tabla 11, pág. 94). A partir de este resultado se puede afirmar que ninguna de las muestras analizadas presenta este evento, ni de forma individual, ni combinada con otras construcciones génicas (apilado).

Tabla 19. Resultados del análisis de *screening* de OGM en muestras de alimentos, utilizando el kit comercial. (-) Resultado negativo, corresponde a la ausencia de la secuencia buscada (no se detectó amplificación (ND) o la misma mostró valores de Ct > 35); (+) Resultado positivo, corresponde a la presencia de la secuencia buscada, definido para valores de Ct < 35. Los cuadros coloreados en naranja indican una diferencia con el resultado obtenido tras el análisis por qPCR SYBR® Green. (*) Alimentos comercializados en Uruguay.

MUESTRA	<i>p35S</i>		<i>t-Nos</i>		<i>Bar</i>		<i>FMV</i>	
	Ct	Resultado	Ct	Resultado	Ct	Resultado	Ct	Resultado
12	33,07	+	34,40	+	ND	-	ND	-
13	32,79	+	ND	-	ND	-	ND	-
14	32,80	+	34,19	+	ND	-	ND	-
15	33,86	+	35,69	-	ND	-	ND	-
16	32,09	+	31,80	+	ND	-	ND	-
17	31,07	+	36,27	-	ND	-	ND	-
18	30,79	+	39,90	-	ND	-	ND	-
19	30,86	+	31,63	+	ND	-	ND	-
20	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
21	28,27	+	30,95	+	ND	-	ND	-
22	29,08	+	29,92	+	ND	-	ND	-
23	28,87	+	31,79	+	ND	-	ND	-
24	27,70	+	29,69	+	ND	-	ND	-
25	27,89	+	33,46	+	ND	-	ND	-
26*	28,09	+	33,84	+	ND	-	ND	-
27*	30,76	+	30,21	+	ND	-	ND	-
28	30,91	+	35,98	-	ND	-	ND	-
29	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
30	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
31	32,90	+	36,12	-	ND	-	ND	-
32	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
33*	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
34*	ND	-	37,80	-	ND	-	ND	-
35*	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
36*	37,70	-	ND	-	ND	-	ND	-
37*	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
38*	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
39*	36,30	-	32,43	+	ND	-	ND	-
40*	31,76	+	34,27	+	ND	-	ND	-
41*	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
42*	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
43*	37,40	-	ND	-	ND	-	ND	-
44*	30,70	+	31,78	+	ND	-	ND	-
45*	31,27	+	32,64	+	ND	-	ND	-
46*	32,51	+	33,98	+	ND	-	ND	-
47*	32,79	+	34,73	+	ND	-	ND	-
48*	35,75	-	33,67	+	ND	-	ND	-
49*	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-
50*	31,90	+	32,74	+	ND	-	ND	-
51*	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-

Con respecto al gen *bar*, varios eventos liberados de maíz lo contienen en sus construcciones, ya que es uno de los genes más utilizados para conferir la tolerancia al herbicida glufosinato de amonio (al igual que el gen *pat* presente p.ej., en el evento Bt11). Este gen no se encuentra en ninguno de los eventos de maíz autorizados hasta la fecha en Uruguay, sin embargo, se encuentra en la construcción del evento Bt176 (Tabla 11, pág. 94) autorizado en Argentina y EE.UU. Del análisis de las 40 muestras, ninguna resultó positiva para la presencia del gen *bar* (Tabla 19). Como se discutirá en el siguiente apartado, este resultado coincide con el obtenido tras la identificación del evento Bt176 mediante el análisis por qPCR (*SYBR® Green*).

Del análisis de *screening*, se desprende que 32 muestras resultaron positivas para la presencia de OGM, de las cuales 22 corresponden a alimentos comercializados fuera del país y 10 a alimentos distribuidos en Uruguay. Si se observan los resultados por tipo de producto, se percibe que el 63,6% de las tortillas caseras (7 de 11), resultó positivo para la presencia de material genéticamente modificado. Asimismo, resultaron positivas para este análisis el 42,1% de los copos de maíz (8 de 19), y el 80,9% de las muestras de *snacks* (17 de 21). A partir de estos valores, se deduce que las muestras con mayor contenido GM, corresponden a los alimentos más procesados y comercializados, los productos copetín o *snacks*.

Otra manera de observar los resultados es relacionando el porcentaje de muestras positivas, con la procedencia de los alimentos. El 76% (16 de 21) de las muestras de origen Mexicano resultaron positivas para la presencia de OGM, lo que resulta sorprendente ya que este país es considerado “centro de origen del maíz” y tiene prohibido el cultivo GM para preservar la diversidad nativa de la especie. Sin embargo, debido a que el país no alcanza a cubrir la demanda de maíz con la producción nacional, suele importar productos desde países como EEUU, Sudáfrica y Brasil. Como se comentó, Estados Unidos es el mayor proveedor de cultivos agrobiotecnológicos a nivel mundial y es el mayor exportador de maíz a México, alcanzando un 87,0% de las importaciones en el año 2012 ^[171]. Esto podría explicar los resultados obtenidos para las muestras de México. A su vez, las dos muestras de EE.UU, resultaron positivas para la presencia de OGM. Por otro lado, el 53,3% de las muestras sudamericanas (8 de 15), provenientes de Argentina, Brasil, Chile y Uruguay, presentaron el promotor 35S y/o el terminador *t-Nos*. Esto no resulta llamativo, debido a que Brasil, Argentina y Uruguay se encuentran dentro de los diez países con mayor producción de cultivos GM a nivel mundial, y son los primeros tres en la lista de

Sudamérica. Por último, el 46,2% (6 de 13), de los alimentos de origen Europeo (España, Francia y Alemania), resultaron positivos para la presencia de las secuencias transgénicas. De estos tres países, únicamente Alemania exhibió muestras negativas para la presencia de transgenes. Estos resultados sí resultan sorprendentes, debido a que la Unión Europea tiene una política estricta para la aprobación de cultivos GM, y una reglamentación firme con respecto al etiquetado de los mismos. Cabe destacar que ninguno de los productos analizados incluía el rótulo de “*contiene material genéticamente modificado*”. No obstante, el análisis de *screening* de OGM no es de carácter cuantitativo, y la detección de los mismos suele darse a nivel de trazas, por lo que la muestra pudo resultar positiva para la presencia de OGM, pero no necesariamente con un porcentaje mayor al 0,9% establecido por la UE para el etiquetado GM en alimentos ^[95] (ver más adelante).

Por último cabe mencionar que las muestras que resultaron negativas para el *screening* de OGM, no necesariamente carecen de material genéticamente modificado, únicamente se demostró que no contienen el promotor 35S, ni el terminador *nos*. Es por ello, que el resultado no debe ser informado de la forma “*la muestra no contiene OGM o está libre de OGM*”, sino que debe indicar que no presenta las secuencias transgénicas buscadas.

2. Identificación de eventos específicos

Luego de poner a punto el método de identificación de eventos mediante PCR en Tiempo Real, se procedió con el análisis de las muestras de alimentos. Los resultados obtenidos para la búsqueda de los eventos MON810, Bt11, GA21, TC1507 y Bt176 se resumen en la Tabla 18 de la sección anterior. Las curvas de amplificación y las temperaturas de *melting* obtenidas para las muestras se ilustran en el **Anexo IV (S2-S6)**.

Todas las muestras positivas para el *screening* de OGM, presentaron alguno de los eventos transgénicos buscados, a excepción de las muestras nº 11 y 39. Estas últimas pudieron contener otros eventos conteniendo las secuencias p35S y t-Nos, (p. ej., el evento NK603), o una combinación de eventos conteniendo una y otra secuencia (p. ej., la línea T25 que contiene únicamente el p35S y la línea MIR162 que contiene solamente el t-Nos). En la mayoría de los casos, se encontró más de un evento específico por muestra. El evento que predominó fue la línea Bt11, presente en un 75% de las muestras (24 de 32). El evento MON810 se encontró en un porcentaje de 65,6% (21 de 32), el GA21 en un 31,2%

(10 de 32), y el TC1507 en un 12,5% del total de las muestras GM (4 de 32) (Figura 26). El evento Bt176 no fue detectado en ninguna de las muestras estudiadas. Cabe destacar, que este resultado es consistente con la distribución de las variedades de maíz GM a nivel mundial. Según el último informe del Servicio Internacional para la Adquisición de las Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA), los eventos de maíz mayormente cultivados, son los que poseen resistencia a insectos, como el evento Bt11 y el MON810 ^[5]. Por otro lado, el evento Bt176 ha sido desautorizado para su uso en varios países (incluido Uruguay), encontrándose aprobado únicamente en algunos como Argentina y EE.UU.

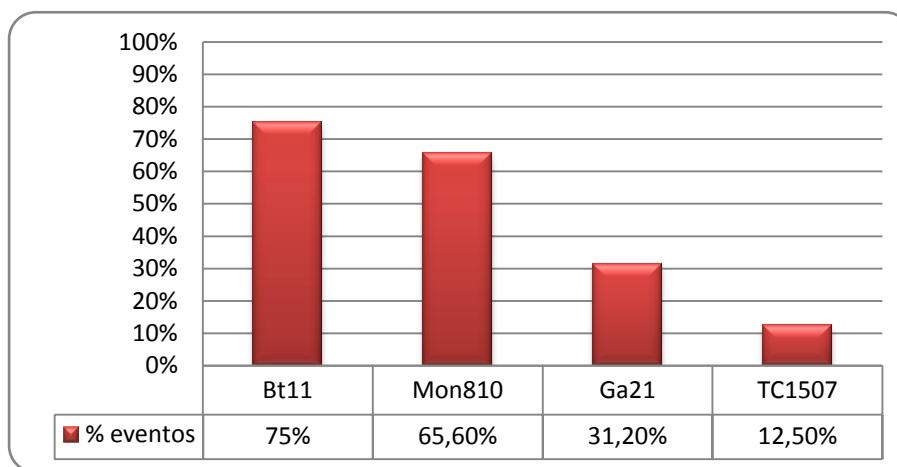


Figura 29. Porcentajes de los eventos específicos presentes en los alimentos estudiados. El evento BT11 fue encontrado en el 75% (24 de 32) de las muestras positivas para la presencia de secuencias GM, el evento MON810 en un 65,6% (21 de 32), el GA21 en un 31,2% (10 de 32) y el evento TC1507 en un 12,5% (4 de 32). El evento no autorizado Bt176 no se encontró en ninguno de los alimentos analizados.

Por otra parte, se evaluó la coherencia entre los resultados obtenidos a partir del *screening* y de la identificación de eventos específicos. De esta forma, cuando se encontró en la muestra, un evento específico conteniendo en su construcción al promotor 35S, se evaluó el resultado obtenido tras el análisis de *screening* de ese elemento. Como ejemplo, siempre que se detectó el evento Bt11, que contiene tanto al promotor 35S, como al terminador nos, el *screening* de OGM debió resultar positivo para ambas secuencias. Esta coherencia se observó en todas las muestras estudiadas. No obstante, en dos de los casos que se detectó únicamente al evento MON810, que sólo contiene el p35S, el *screening* de OGM dio positivo también para el terminador nos (muestras nº 19 y 27). Esto no supone una contradicción, debido a que las muestras podrían contener otros eventos de maíz con la secuencia terminadora, pero que no fueron analizados en este trabajo (p. ej., el evento

MIR604, o el evento MIR162 aprobados en países tales como Argentina, Mexico y EEUU).

A su vez (y como se comentó en la sección anterior), los resultados de la detección del gen *bar* obtenidos a partir del *screening* de OGM por el kit comercial, deberían coincidir con los resultados de la identificación del evento Bt176 por qPCR (*SYBR® Green*). Como se observa en la Tabla 18, ninguna de las 51 muestras analizadas presentó el evento Bt176, lo que coincidió con lo observado tras el análisis por el kit comercial, el cual evidenció la ausencia del gen *bar* en todas las muestras analizadas.

Para validar el ensayo de identificación de eventos por qPCR, se compararon los resultados con los obtenidos mediante la técnica de PCR convencional (datos no presentados). Ambas técnicas lograron resultados semejantes, con algunas diferencias que se explican por los límites de detección de cada una. Mediante la técnica de PCR convencional se logró identificar al evento MON810 en 20 de las 51 muestras analizadas por qPCR. No obstante mediante esta última se detectaron 21 muestras positivas para este evento. La muestra que resultó diferente fue la n°16, la cual amplificó con un valor de Ct de 35,37 cercano al límite de detección de la técnica de qPCR y apartado del límite de detección de la técnica de PCR convencional (diez veces menor a la de Tiempo Real). El evento Bt11, fue identificado en 20 de las 24 muestras que resultaron positivas para el análisis por qPCR, (muestras n° 4, 7, 10 y 47). El evento GA21 se identificó en las 10 muestras que resultaron positivas para el análisis por *SYBR® Green*, y el evento TC1507 se encontró en 3 de las 4 muestras analizadas (exceptuando la muestra n° 47). Las discrepancias de los últimos resultados también pueden explicarse debido a las diferencias en los límites de detección de ambas técnicas.

3. Cuantificación de OGM mediante qPCR

La cuantificación de OGM se llevó a cabo mediante la técnica de qPCR, utilizando un kit comercial con sondas específicas *TaqMan* (para algunas muestras seleccionadas) y además mediante la aproximación por *SYBR® Green*.

En ambos casos se realizaron dos curvas de calibración, una para la cuantificación del gen endógeno de maíz (gen de referencia) y una para la cuantificación del promotor 35S. El contenido de material GM en las muestras (en porcentaje), se determinó siguiendo lo establecido en la norma ISO 21570 (2005) de cuantificación de OGM ^[138], dividiendo la

cantidad de copias obtenidas del *p35S*, por la cantidad obtenida para el gen de referencia, y multiplicando por 100.

Para cada reacción de amplificación (gen de referencia y OGM) se consideraron los siguientes resultados: (i) *No detectado*: No hubo amplificación en la muestra, o el valor de Ct obtenido superó el ciclo 35 para el caso del kit, o el ciclo 36,5 para el análisis utilizando *SYBR® Green*. (ii) *No cuantificable*: Se detectó amplificación en la muestra, pero en una cantidad inferior al último punto de la recta de cuantificación (menor concentración), o límite de cuantificación (LOQ). Este límite fue definido para las dos aproximaciones en 0.1% del contenido de material GM. (iii) *Cuantificable*: Se detectó amplificación en la muestra, en una cantidad superior al límite de cuantificación. El Ct obtenido fue “interpolable” entre los valores de los puntos del material de referencia, por lo que el resultado cuantitativo resultó fiable. El mismo, fue empleado para calcular el número de copias experimentales de los dos genes blanco y el porcentaje de material GM en la muestra.

La cuantificación utilizando el kit comercial, se realizó sobre seis de las muestras de alimentos que resultaron positivas para el *screening* de OGM (muestras nº 15, 23, 26, 40, 45 y 46) y sobre distintas concentraciones del material de referencia certificado de la línea NK603 (5%, 1%, 0,1% y 0,01%). Las curvas de calibración fueron construidas a partir de diluciones seriadas de una solución estándar que portaba el kit. Las condiciones de reacción y ciclado, fueron establecidas siguiendo el protocolo del fabricante ^[169]. Los resultados obtenidos se detallan en la siguiente Tabla (Tabla 20).

Tabla 20. Resultado de la cuantificación de OGM mediante qPCR utilizando el kit comercial. Se detallan los valores de las curvas de calibración para el gen de referencia y para el promotor 35S, obtenidas a partir de las soluciones estándar del kit (a). Las mismas fueron utilizadas para estimar la concentración (* unidades arbitrarias según instrucciones del kit) del gen de referencia y del *p35S* en las distintas muestras y controles (b). El porcentaje de OGM, se calculó según $\text{Concentración } p35S / \text{Concentración gen de referencia} \times 100$.

(a) ESTANDAR		GEN REFERENCIA		GMO (Promotor 35S)	
Nº	Concentración	Ct	Curva estándar	Ct	Curva estándar
S1	100	24,63	Pendiente	23,39	Pendiente
S2	25	26,72	-3,3940	25,66	-3,4802
S3	6,26	28,23	Eficiencia	27,58	Eficiencia
S4	1,56	30,88	97%	29,92	94%
S5	0,39	32,77	R ²	31,74	R ²
S6	0,098	34,40	0,994	34,12	0,998

(b) MUESTRA			GEN REFERENCIA		GMO (Promotor 35S)		%GM Experimental
N°	NOMBRE	ORIGEN	Ct	Conc. Obtenida	Ct	Conc. obtenida	(OGM/Ref)*100
15	Doritos	Francia	27,10	17,83	34,70	0,06	0,30
23	Rancheritos	Mex.	26,40	28,68	29,30	2,11	6,66
26	Nachitas	EEUU	25,16	66,51	30,60	0,89	1,21
40	Copos frutales	Arg.	28,40	7,38	32,80	0,21	2,55
45	Bolitas dulces	Uru.	25,60	49,34	31,82	0,40	0,73
46	Copos con miel	Arg.	27,60	12,70	32,29	0,29	2,08
MRC	NK603 5%	IRMM	29,80	2,86	33,40	0,14	4,44
MRC	NK603 1%	IRMM	28,50	6,90	33,90	0,10	1,32
MRC	NK603 0,1%	IRMM	27,80	11,09	37,40	0,01	0,08
MRC	NK603 0%	IRMM	27,90	10,36	39,30	0,00	0,02
Kit	C+		24,60	97,24	23,40	104,53	97,34
PCR	C- (sin ADN)		ND	-	ND	-	-

Las curvas estándar obtenidas para el gen de referencia y para el promotor 35S (OGM) utilizando este Kit, tuvieron eficiencias aceptables de 97% y 94% respectivamente, por lo que fueron utilizadas para el cálculo del porcentaje de OGM de las muestras de alimentos y de las distintas concentraciones del MRC de la línea NK603.

Los porcentajes de material GM obtenidos para las distintas concentraciones del MRC NK603, resultaron similares a los valores reales. Para el MRC 5% GM, se obtuvo un porcentaje de 4,44%, para el MRC 1%, 0,1% y 0% GM, se obtuvieron porcentajes de 1,32%, 0,08% y 0,02% respectivamente. Asimismo, el control positivo del kit presentó un porcentaje experimental de 97,34% de material GM, similar al valor real de 100%. Estos resultados validan el método de cuantificación y permiten estimar de manera fiable el contenido de OGM en las muestras problema.

La muestra que presentó mayor contenido de material GM, fue la n° 23, correspondiente a un *snack* comercializado en México (6,66% GM). El menor porcentaje de OGM, se encontró en la muestra n° 15, correspondiente a un *snack* comercializado en Francia (0,30%). La muestra n° 45 comercializada en Uruguay, presentó un porcentaje de 0,73%, mientras que las muestras 26, 40 y 46, también distribuidas en el país, sobrepasaron el límite umbral de 1% propuesto para el nuevo etiquetado de alimentos GM en Montevideo.

Por otro lado, se realizó la cuantificación de todas las muestras que resultaron positivas para la presencia del promotor 35S en el *screening* de OGM (32 alimentos), utilizando la aproximación con el agente intercalante *SYBR® Green*. Los resultados de este

análisis se muestran a continuación (Tabla 21). Las curvas de calibración, las curvas de amplificación y las de *melting* obtenidas en el ensayo, se ilustran en el **Anexo IV (S7,S8)**.

Tabla 21. Resultado de la cuantificación de OGM en muestras de alimentos mediante qPCR utilizando el agente intercalante SYBR® Green. Se detallan los valores obtenidos para las curvas estándar del gen de referencia (*hmga*) y del promotor 35S, construidas a partir del MRC de la línea NK603 5%. Se determinó el nº de copias del gen de referencia y del *p35S* para cada muestra y se calculó el porcentaje de OGM, según la ecuación: $\text{n}^\circ \text{ copias } p35S / \text{n}^\circ \text{ copias del gen Referencia} \times 100$. (*) Muestras comercializadas en Uruguay.

ESTANDAR		GEN REFERENCIA (<i>hmga</i>)			GMO (Promotor 35S)		
CRM	Concentración	Ct	n° Copias	Curva estándar	Ct	n° Copias	Curva estándar
NK603 5%	100ng	24,10	36697	Pendiente -3,45	25,89	1835	Pendiente -3,44
NK603 5%	50ng	26,31	18348	Eficiencia 95%	28,22	917,5	Eficiencia 95%
NK603 5%	10ng	27,99	3669,7		30,00	183,5	
NK603 5%	1ng	31,84	366,97	R ² 0,989	33,71	18,3	R ² 0,986
NK603 5%	0,1ng	34,82	36,7		36,64	1,8	
MUESTRA			GEN REFERENCIA (<i>hmga</i>)		GMO (Promotor 35S)		%GM exp.
N°	NOMBRE	ORIGEN	Ct	n° Copias	Ct	n° Copias	(OGM/Ref) *100
3	Tortilla de maíz	Mex.	27,13	7067,01	33,85	13,82	0,20
4	Tortilla de maíz	Mex.	30,13	958,43	34,64	8,16	0,85
5	Tortilla de maíz	Mex.	31,21	465,69	35,03	6,27	1,35
6	Tortilla de maíz	Mex.	30,21	903,91	30,68	115,58	>5%
7	Tortilla de maíz	Mex.	30,72	647,08	36,17	2,91	0,45
10	Tortilla de maíz	Mex.	28,02	3904,77	35,75	3,87	0,10
11	Tortilla de maíz	Mex.	26,88	8354,89	29,48	257,69	3,08
12	Chitos	Mex.	31,49	387,40	33,32	19,77	>5%
13	Topitos queso	Mex.	26,36	11800,51	30,96	95,79	0,81
14	Fritos	Mex.	30,63	684,47	33,09	23,01	3,36
15	Doritos	Francia	26,81	8747,22	32,54	33,25	0,38
16	Tortillas chili	Francia	31,93	288,45	32,53	33,40	>5%
17	3D	Francia	25,35	23148,05	30,21	158,50	0,68
18	Tortilla de maíz	Francia	28,038	3859,03	32,58	32,36	0,84
19	Tortillas	Mex.	28,15	3587,11	30,82	105,34	2,94
21	Doritos	Mex.	24,72	35228,03	25,15	4708,21	>5%
22	Crujitos	Mex.	28,91	2163,605	29,31	288,98	>5%
23	Rancheritos	Mex.	26,11	13956,13	27,44	1017,44	>5%
24	Fritos	Mex.	26,74	9142,98	27,43	1012,65	>5%
25	Doritos pizzeria	Mex.	24,52	40269,46	24,89	5597,42	>5%
26	Nachitas	EE.UU*	24,02	56172,82	27,79	802,46	1,43
27	3D barbacoa	Arg. *	25,96	15469,62	28,95	367,94	2,38

MUESTRA			GEN REFERENCIA (hmgA)		GMO (Promotor 35S)		%GM exp.
N°	NOMBRE	ORIGEN	Ct	n° Copias	Ct	n° Copias	(OGM/Ref) *100
28	Fritos	España	24,49	41026,63	28,92	375,13	0,91
31	Mix Doritos	España	25,21	25412,18	29,75	215,74	0,85
39	Copos con miel	EE.UU *	31,20	469,63	36,16	2,94	0,63
40	Copos frutales	Arg. *	26,96	7941,41	29,74	216,55	2,73
44	Copos de maíz	Uru.*	29,33	1631,90	28,99	358,02	>5%
45	Bolitas dulces	Uru. *	25,55	20258,99	30,24	155,35	0,77
46	Copos de avena	Arg.*	26,98	7810,12	30,04	177,63	2,27
47	Copos con azúcar	Arg.*	31,03	525,47	35,87	3,57	0,68
48	Copos s/azúcar	Arg.*	27,76	4659,20	35,24	5,43	0,12
50	Copos de choco	Arg.*	27,83	4418,33	29,24	302,75	>5%
C+	Kit BIOTECON		25,67	18701,65	23,11	18477,47	98,80
C-	Sin ADN		ND	-	ND	-	-

Como se observa en la tabla, las curvas de calibración para la amplificación del gen de referencia (*hmgA*) y para el promotor 35S utilizando el agente *SYBR® Green*, mostraron eficiencias aceptables de 95%, con valores de R^2 mayores a 0,98. Utilizando estos valores, se realizaron los cálculos de porcentajes de OGM en los alimentos. El contenido de material GM detectado en todas las muestras analizadas fue cuantificable, encontrándose en cantidades superiores al LOQ de 0,1%, definido para la técnica.

Los porcentajes de material GM encontrados en las muestras resultaron muy variables, observándose cantidades cercanas al límite inferior de la curva de cuantificación (0,1%), y cantidades que sobrepasaron el 5% ensayado para el límite superior de la misma. En 18 de las 32 muestras analizadas, el porcentaje de la secuencia promotora 35S sobrepasó el valor umbral de 1% establecido para el etiquetado GM en Montevideo. Este valor representó el 56,25% del total de las muestras positivas para la presencia de transgénicos (32), y el 35,3% del total de las muestras analizadas (51). En líneas generales, los productos que presentaron mayores cantidades de material GM fueron los *snacks*, con una mayor cantidad de muestras sobrepasando el valor de 5%. Como se muestra en la Tabla 22, más del 84% de los productos de copetín analizados presentaron las secuencias transgénicas buscadas, y más de la mitad (52,6%) lo hicieron en porcentajes superiores al 1%. En orden decreciente le siguieron las tortillas y los cereales, en donde el 30,7% y el 21,1% respectivamente, sobrepasó el valor umbral para el etiquetado GM.

Tabla 22. Resultado del análisis de 51 muestras de alimentos elaborados a base de maíz. Se especifica el tipo de matriz alimentaria, el número de muestras positivas para el análisis de *screening*; y el número de muestras con contenido GM >1%, respecto al tipo de matriz y en el total de muestras analizadas. (*) Muestras comercializadas en Uruguay.

MATRIZ		Nº de muestras analizadas	Muestras positivas para la presencia de <i>CaMVp35S</i> y <i>t-Nos</i>		Contenido GM > 1%	
Tortillas y granos		13	8	61,5 %	4	30,7 %
Snacks		19	16	84,2 %	10	52,6%
Cereales		19	8	42,1%	4	21,1%
Total		51	32	62,7%	18	35,3%

MUESTRA			Resultado <i>Screening</i>	Requiere Etiqueta	MUESTRA			Resultado <i>Screening</i>	Requiere Etiqueta
Nº	Nombre	Origen			Nº	Nombre	Origen		
1	Granos	Mex.	Negativo	NO	27	3D*	Arg.	Positivo	SI
2	Granos	Mex	Negativo	NO	28	Fritos	Esp.	Positivo	NO
3	Tortilla	Mex	Positivo	NO	29	Bugles	Esp.	Negativo	NO
4	Tortilla	Mex	Positivo	NO	30	Cheetos	Esp.	Negativo	NO
5	Tortilla	Mex	Positivo	SI	31	Doritos	Esp.	Positivo	NO
6	Tortilla	Mex	Positivo	SI	32	cheetos	Esp.	Negativo	NO
7	Tortilla	Mex	Positivo	NO	33	Hojuelas*	Alem.	Negativo	NO
8	Tortilla	Mex	Negativo	NO	34	Hojuelas*	Alem.	Negativo	NO
9	Tortilla	Mex	Negativo	NO	35	Hojuelas*	Arg.	Negativo	NO
10	Tortilla	Mex	Positivo	NO	36	Hojuelas*	Arg.	Negativo	NO
11	Tortilla	Mex	Positivo	SI	37	Copos*	Brasil	Negativo	NO
12	Cheetos	Mex	Positivo	SI	38	Copos*	Chile	Negativo	NO
13	Topitos	Mex	Positivo	NO	39	Copos*	EE.UU	Positivo	NO
14	Fritos	Mex	Positivo	SI	40	Copos*	Arg.	Positivo	SI
15	Doritos	Fran.	Positivo	NO	41	Copos*	Arg.	Negativo	NO
16	T.Chile	Fran	Positivo	SI	42	Copos*	Arg.	Negativo	NO
17	3D	Fran.	Positivo	NO	43	Copos*	Uru.	Negativo	NO
18	T. snack	Fran.	Positivo	NO	44	Copos*	Uru.	Positivo	SI
19	Tortillas	Mex	Positivo	SI	45	Bolitas*	Uru.	Positivo	NO
20	Tortillas	Mex	Negativo	NO	46	Copos*	Arg.	Positivo	SI
21	Doritos	Mex	Positivo	SI	47	Copos*	Arg.	Positivo	NO
22	Crujitos	Mex	Positivo	SI	48	Copos*	Arg.	Positivo	NO
23	Ranch.	Mex	Positivo	SI	49	Copos*	Alem	Negativo	NO
24	Fritos	Mex	Positivo	SI	50	Copos*	Arg.	Positivo	SI
25	Doritos	Mex	Positivo	SI	51	Copos*	Alem.	Negativo	NO
26	Nachitas*	EE.UU	Positivo	SI					

Por otro lado, para validar el ensayo de cuantificación utilizando la química de *SYBR*[®] *Green*, los resultados obtenidos para las muestras n° 15, 23, 26, 40, 45 y 46 fueron comparados con los obtenidos con el kit comercial (química *TaqMan*[®]). Los porcentajes de OGM calculados por ambos métodos resultaron similares. Los desvíos observados entre

los porcentajes de las muestras se encontraron dentro de los valores aceptados por las normas de referencia ISO 24276 y 5725 (<35%)^[140, 143]. Para todas las muestras analizadas, se observaron valores de desvíos por debajo del 20%. Estos resultados hacen confiable el método de cuantificación de OGM utilizando la química de *SYBR® Green* y lo habilitan para ser utilizado como método de rutina en un laboratorio de control.

Como se comentó anteriormente, el empleo de la cuantificación de OGM mediante la detección del promotor 35S, no siempre es aconsejable, sobre todo si se van a analizar alimentos. Esto es debido a que un alimento puede contener varios ingredientes, por ejemplo maíz y soja genéticamente modificados, cuyas construcciones se han realizado con la misma secuencia promotora. Por lo tanto y para ese caso, la detección del *p35S* estaría dando un resultado sobreestimado de la cantidad de OGM. Lo mismo ocurriría si existiera más de una copia del promotor 35S por evento, ya sea por tratarse de un una construcción con más de un promotor, o por provenir de un evento apilado. Asimismo, existen algunos eventos que no contienen el *p35S*, por lo que estarían escapando a este análisis. Para evitar este conflicto, se recomienda recurrir a la cuantificación a través de métodos de detección evento-específicos, prosiguiendo con la sumatoria de todas las construcciones encontradas en la muestra. No obstante, este método es laborioso y muy costoso en términos económicos, debido a que requiere de la detección y cuantificación de cada uno de los eventos transgénicos presentes en la muestra. Para el caso de maíz, esta detección ascendería a un centenar de análisis, puesto que existen más de 130 eventos liberados para maíz a nivel mundial^[54]. Cabe hacer notar que hasta la fecha, no se han publicado trabajos en los que se detecte a la totalidad de los eventos de maíz disponibles en el mercado. Por otra parte, la cuantificación mediante este método (al igual que el método evento específico) no logra distinguir entre eventos apilados, por lo que si se llegara a presentar alguno en la muestra, se estaría sobreestimando el valor real de OGM (si las inserciones que conforman el apilado presentaran una o más copias del *p35S*).

Considerando los distintos escenarios y conociendo las limitantes de la cuantificación, parece razonable elegir el método de detección del *p35S* para llevar a cabo la primera estimación de la cantidad de OGM en muestras de alimentos. Este método ha sido implementado en más de 40 laboratorios independientes y oficiales de control. Ciertos trabajos argumentan que el reconocimiento de este método por las organizaciones internacionales, podría contribuir de manera significativa a la armonización del comercio internacional^[135].

4

Discusión General

4.1 Estudio de Flujo génico entre cultivos de maíz

Se conoce que en condiciones reales de coexistencia del cultivo de maíz, la polinización cruzada trae como consecuencia la presencia accidental de transgénicos en cultivos no-GM ^[11, 83, 85]. Dado que la legislación nacional adoptó en el año 2008 la política de coexistencia regulada entre los distintos cultivos de maíz en el territorio (orgánico, GM y no-GM) ^[70], resulta indispensable poner a punto las metodologías que permitan detectar una posible contaminación por flujo génico.

En este contexto, el trabajo experimental I de la tesis tuvo como objetivo general, emplear técnicas moleculares de detección de OGM para evaluar la frecuencia con la que ocurre el flujo de transgenes entre cultivos de maíz GM y no-GM en Uruguay. Este trabajo se enmarcó en el Proyecto CSIC (I+D) del año 2011 *“Flujo de transgenes entre cultivos comerciales de maíz en el Uruguay”* (Responsable Dra. ML. Franco-Fraguas) en el cual participaron las Facultades de Química, Agronomía y Ciencias de la UdelaR ^[90].

Para llevar a cabo el estudio, los integrantes de la contraparte por Facultad de Agronomía y Química recorrieron un total de 53 chacras comprendidas entre los Departamentos de Lavalleja, San José, Colonia, Canelones, Soriano y Rocha, en donde finalmente se identificaron 9 casos de cultivos de maíz no-GM con potencial riesgo de polinización cruzada con cultivos de maíz GM (situaciones que admitían una distancia máxima de 1500 metros entre los bordes más cercanos de los cultivos y no más de dos semanas de diferencia en las fechas de siembra). De estos 9 casos se tomaron espigas de los cultivos no-GM para la producción de plantines y para el posterior análisis de presencia de transgénicos por DAS-ELISA y por PCR en punto final. El análisis por DAS-ELISA estuvo a cargo del Lic. Pablo Galeano de la Cátedra de Bioquímica de la Facultad de Química y el análisis por PCR fue realizado en el marco de esta tesis, en el Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria.

4.1.1 Detección de transgenes en la descendencia por PCR convencional

La detección de transgenes por PCR se llevó a cabo en dos etapas: en primera instancia se realizó un ensayo de *screening* de OGM basado en la búsqueda de dos secuencias génicas (promotor 35S y Terminador *nos*) presentes en las construcciones de los eventos de maíz cultivados en Uruguay ^[61]; posteriormente se realizaron ensayos *evento específicos* para confirmar la identidad de los eventos involucrados. En todos los casos se buscó el evento Bt11 y el evento MON810 (líneas GM mayormente cultivadas en el país), para luego comparar los resultados con las identidades de los cultivos GM más cercanos.

Los resultados de los análisis por PCR en punto final revelaron la presencia de transgenes (presencia del *p35S*) en las progenies de los cultivos no-GM, en 4 de los 9 casos de estudio. El análisis *evento específico* confirmó la presencia del evento MON810 en los 4 casos positivos para la presencia del promotor. Este resultado coincidió con la identidad GM de los cultivos vecinos, lo que permitió confirmar la fuente de contaminación por polen transgénico. Cabe destacar que el análisis de DAS-ELISA realizado, detecta a la proteína *cry1AB* presente en los eventos autorizados de maíz MON810 y Bt11, pero no es capaz de discriminar entre uno u otro. Por el contrario, la estrategia empleada en la PCR es específica para cada evento, permitiendo inferir cuál de los cultivos GM vecinos fue la fuente de flujo de transgénicos. Como ejemplo, se muestra el caso N° 1 del trabajo experimental (Tabla 9, Figura 18), el cual consistió en un cultivo de maíz no-GM cercano a dos cultivos GM, uno correspondiente al evento MON810 y otro al evento Bt11. A partir del análisis por PCR se pudo evidenciar que la contaminación con transgenes resultó desde el campo sembrado con la variedad MON810 y no desde plantado con la línea Bt11.

4.1.2 Estimación de la frecuencia de flujo génico

En líneas generales los resultados observados de presencia accidental de transgenes en los cultivos de maíz no-GM se ubicó en valores de entre 0,3 y 5%. Cabe mencionar que la frecuencia estimada en este trabajo, corresponde a la presencia de transgenes en las progenies no-GM y no propiamente a la frecuencia de interpolinización. Esta última debería ser mayor dado que el maíz híbrido GM del cual provino el polen parental, es

hemicigoto para el transgén ^[85], por lo cual no todos los granos de polen producidos en el cultivo GM portaron el transgén.

Al igual que lo reportado en la bibliografía consultada, el porcentaje de transgénicos encontrado fue disminuyendo a medida que aumentaron las distancias entre los cultivos y las diferencias en las fechas de siembra ^[89]. Se encontró que en 2 de los 4 casos, las distancias entre los cultivos superaron los 250 metros recomendados actualmente en Uruguay, para evitar la contaminación por flujo génico en maíz ^[61].

Estos resultados sugieren que, para evitar que el intercambio de polen GM por flujo génico supere el 1% establecido para la presencia accidental de transgenes, la distancia de aislamiento debería superar los 420 metros y la diferencia en las fechas de siembra debería ser de dos semanas. Estas distancias podrían minimizar el efecto de otros factores que aportan a la contaminación por transgénicos, tales como la mezcla de semillas durante la siembra, la cosecha y el almacenamiento. No obstante, la implementación de esta política en zonas similares a las estudiadas parece difícil, debido a que actualmente no se respetan las zonas de amortiguación de 250 metros recomendadas ^[89].

Por otro lado, la estrategia basada en la sincronía de la floración debería ser un instrumento eficaz para garantizar la coexistencia, pero su aplicación está limitada por las condiciones climáticas específicas del cultivo de maíz.

4.1.3 Extracción y amplificación de ADN de un grano de polen de maíz

Se compararon distintas estrategias para extraer y estudiar el ADN proveniente de un grano de polen de maíz. Todas ellas siguieron tres diferentes etapas: (i) aislamiento del grano de polen bajo lupa desde una solución de H₂O y polen, (ii) extracción del ADN mediante el empleo de soluciones de lisis a temperaturas elevadas (iii) análisis del ADN mediante PCR con cebadores específicos para secuencias endógenas de maíz (*ivr* y *hmga*), cebadores específicos para detectar al promotor *CaMVp35S* transgénico y para amplificar el evento específico MON810.

El protocolo óptimo de extracción de ADN consistió en una etapa de lisis de la envoltura del grano, a partir de la incubación a 65°C por 15 minutos con una solución de KOH (0,1M) y una posterior incubación a 95°C por 10 minutos con Tris-HCl (100mM); y un paso de centrifugación en donde se purificó el ADN de proteínas y otros contenidos

celulares. Este protocolo modificado, basado en el método de Chen y colaboradores del año 2008 ^[161], no solo resulta eficiente para extraer ADN de granos de polen de una panoja de maíz, sino que también resulta óptimo para extraer ADN del polen presente en muestras de miel. Este último ensayo que aquí no se presenta, ha sido comprobado por nuestro grupo de trabajo en el marco de otros proyectos de investigación del LaTraMa.

Para la detección de las distintas secuencias blanco por PCR en punto final, se siguieron las condiciones de ciclado del método de Chen ^[161], y se utilizaron los cebadores descritos en el Compendio de métodos de Referencia del JRC ^[142]. Todas las condiciones del ensayo, incluidas las temperaturas de reacción, el número de ciclos, y los tamaños de amplicones resultantes, debieron evaluarse previamente de forma especial para poder detectar la cantidad mínima de ADN extraído. La utilización de cebadores diseñados para amplificar secuencias cortas de ADN (menores a los 205 pares de bases) y el número elevado de ciclos de reacción, aportaron al éxito del análisis.

Aunque la técnica de PCR en punto final acoplada a la electroforesis en poliacrilamida resulta muy sensible para el análisis del ADN, actualmente el método elegido para la detección de bajas cantidades de material genético es la PCR en Tiempo Real. La misma posee un límite de detección (LOD) de 1 a 10 copias de ADN, diez veces menor que la observada para la técnica de PCR convencional ^[107].

4.2 Detección de transgenes en alimentos.

Debido a que los requisitos legales para el uso y la comercialización de OGM varían entre los diferentes países, la aplicación de la trazabilidad en un producto terminado resulta diferente para cada uno de ellos. Una línea transgénica puede estar autorizada para el consumo en un país, pero no necesariamente en el vecino, por lo que el control sobre un alimento derivado puede resultar diferente. Asimismo, cada estado puede definir un límite umbral para el etiquetado de OGM, lo que significa que un producto que no requiere etiquetado en el lugar de origen, puede sobrepasar los límites de contenido GM implementado en el país de destino.

A su vez, aportando a la complejidad del control de los alimentos GM, se encuentra que no existe a nivel regional e internacional, una armonización de la metodología analítica para la detección y cuantificación de OGM. El empleo de los métodos de análisis depende de la capacidad técnica y económica de cada país y de cada laboratorio de

control. Un paso importante para intentar resolver esta dificultad, fue la creación del Laboratorio Comunitario de Referencia para Alimentos y Piensos Genéticamente Modificados (CRL-GMFF) de la Unión Europea, conocido como Centro Común de Investigación de la Comisión Europea ó *European Commission's Joint Research Centre* (JRC). Este centro tiene como principal cometido validar y publicar nuevos métodos de análisis de OGM para su aplicación internacional.

La elección del método para detectar y cuantificar OGM en los alimentos constituye un reto por varias razones; primeramente, existen más de 250 variedades de cultivos transgénicos a nivel mundial, que pueden estar presentes en los ingredientes de un alimento. Para el caso de maíz actualmente se encuentran autorizados para consumo, un total de 131 eventos con diferentes características agronómicas (41 eventos simples y 90 eventos apilados) ^[54]. El método elegido debe ser capaz de detectar a la mayoría de las variedades GM presentes, además de poder identificarlos y cuantificarlos. A su vez, para poder obtener resultados reproducibles deben utilizarse materiales de referencia adecuados, que no siempre se encuentran disponibles. Por otro lado, los alimentos procesados han sufrido tratamientos que llevan a la degradación del ADN, lo que dificulta su obtención para los posteriores ensayos de detección. Es necesario contar con protocolos de extracción que rindan ADN de buena calidad y sin inhibidores a partir de una amplia gama de matrices alimentarias procesadas.

Para llevar a cabo el análisis de OGM se aconseja el empleo de técnicas sensibles de detección de ADN, tales como la PCR en Tiempo Real (qPCR). Esta mide la cantidad de moléculas de ADN producidas durante cada ciclo de amplificación, utilizando agentes fluorescentes de unión al ADN como el *SYBR® Green*, o utilizando sondas específicas acopladas a fluoróforos. Esta técnica resulta ideal para el análisis de OGM, debido a que tiene la capacidad de detectar hasta 2 copias de ADN ^[104].

La nueva normativa para el etiquetado de alimentos GM en Montevideo, demanda que existan programas de vigilancia por parte de los organismos gubernamentales, para asegurar el cumplimiento del Decreto N° 34.901 ^[102]. La entidad asignada para este control es la Intendencia de Montevideo a través de la Unidad Laboratorio de Bromatología (LB-IM). Para llevar a cabo esta función, el LB-IM estableció un convenio con la Facultad de Ciencias (Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria), cuyo cometido fue la transferencia tecnológica y la puesta a punto de los métodos de rutina para la detección y cuantificación de OGM ^[103]. En el marco de este convenio se llevó a cabo el Trabajo

experimental II de la tesis, que tuvo como objetivo principal la estandarización de una metodología basada en la técnica de PCR en Tiempo Real (*SYBR® Green*), para detectar, identificar y cuantificar transgénicos en alimentos procesados a base de maíz. Esta metodología fue verificada y comparada con las plataformas comerciales disponibles en formato de Kits validados.

Cabe mencionar que en Uruguay, solamente dos laboratorios se encuentran empleando análisis de detección de OGM. En el ámbito público-privado, el Laboratorio de Técnicas Moleculares del Instituto Nacional de Semillas (INASE) se encarga del control de los granos GM que se importan y exportan del país ^[173], mientras que el Departamento de Bioprocesos y Biotecnología del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), es quien realiza los análisis cualitativos de detección de OGM en granos de arroz que se exportan desde Uruguay ^[174]. Hasta la fecha, ningún laboratorio público o privado, realiza el análisis de detección de OGM en los alimentos por qPCR, salvo el Laboratorio de Bromatología quien recientemente ha comenzado a implementar este tipo de metodologías.

4.2.1 Obtención de ADN

En los alimentos los compuestos inhibidores de las reacciones de PCR tales como las proteínas, grasas, polisacáridos y azúcares son muy frecuentes, por ello la etapa de extracción del ADN resulta crítica para lograr el éxito de los posteriores análisis moleculares de detección de OGM ^[114]. Para extraer ADN de los alimentos procesados, se empleó una modificación del protocolo de *Doyle & Doyle* (1974) ^[158], el cual utiliza una solución de detergente bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) y solventes orgánicos, especialmente recomendados para eliminar polisacáridos y compuestos polifenólicos. Mediante el empleo de este método fue posible extraer ADN en buena cantidad y sin inhibidores, de todas las matrices alimentarias estudiadas.

4.2.2 Puesta a punto del análisis de OGM por qPCR (*SYBR® Green*).

4.2.2.1 Screening de OGM

Para la puesta a punto del *screening* de las secuencias transgénicas *CaMVp35s* y Terminador *nos* por qPCR, se evaluaron distintos parámetros de rendimiento tales como la

especificidad, selectividad y eficiencias de amplificación de los cebadores, y la sensibilidad y el límite de detección de la técnica. Los resultados de la evaluación demostraron que el método de detección por qPCR (*SYBR® Green*) posee una alta sensibilidad, presentando un límite de detección (LOD) de 0,01% de material GM, lo que equivale a 2 copias de ADN transgénico. Este valor supera en diez veces al LOD de la PCR en punto final. El rango dinámico fue evaluado entre 0,01% y 5% de material GM, obteniendo resultados precisos con desvíos menores a 10% (valor aceptado por las normas estándar de verificación de métodos de detección de OGM ^[133]). A su vez, los cebadores elegidos para la detección (tomados del Compendio de Métodos de Referencia del JRC) resultaron selectivos y específicos, exhibiendo señales de amplificación únicamente en los controles conteniendo la secuencia diana. Por último, las eficiencias de amplificación para ambas secuencias transgénicas se ubicaron cercanas al 100%, lo que demuestra que el método es adecuado para la detección del Promotor-35S y del Terminador-*nos*.

4.2.2.2 Identificación eventos específicos de maíz

El método de identificación de eventos específicos por qPCR (*SYBR® Green*) fue evaluado según los parámetros de validación mencionados con anterioridad. Se utilizaron distintos juegos de cebadores especialmente diseñados por el JRC para la detección de las líneas transgénicas de maíz MON810, Bt11, GA21, TC1507 y Bt176. Los resultados de los ensayos indicaron que los cebadores empleados fueron selectivos y específicos, mostrando curvas de disociación (*melting*) con picos únicos y característicos para cada evento. A su vez, las eficiencias de amplificación para todas las secuencias blanco se ubicaron cercanas al 100%. El límite de detección de la técnica se ubicó en un valor de 0,01% de material GM, equivalente a 2 copias de ADN transgénico. Estos resultados demuestran que el método de identificación evento específico por qPCR (*SYBR® Green*) puede ser empleado para el análisis de ADN de maíz transgénico. Si bien para la identificación de los eventos específicos es recomendable el uso de sondas de hidrólisis del tipo *TaqMan®*, la aproximación mediante la química de *SYBR® Green*, junto a la utilización de cebadores específicos y el análisis de las curvas de disociación, resultó ser tan específica y sensible como la primera.

4.2.2.3 Cuantificación del Promotor CaMVp35S

El método elegido para llevar a cabo la cuantificación de OGM en maíz, se basó en la detección del promotor *CaMV-35S* y su posterior normalización con un gen endógeno de referencia *hmgA*. Este método presentó eficiencias de amplificación del 95% y parámetros de rendimiento acordes a lo establecido por las normas de referencia ISO 21568-140, ISO 24276 ^[136-40]. La desviación estándar entre las réplicas se ubicó por debajo del 35% (definido en las normas ISO de cuantificación de OGM) en todo el rango dinámico de cuantificación (0,1%-5% material GM), el límite de detección (LOD) fue fijado en 0,01% y el límite de cuantificación (LOQ) en 0,1% de material GM. Ambos límites se encuentran muy por debajo del umbral establecido para la presencia accidental de organismos genéticamente modificados en alimentos (de 1%), por lo que se concluyó que este método puede utilizarse como una primera aproximación para la cuantificación de OGM en muestras que presentan la secuencia promotora (*p35S*).

Cabe recordar que para evitar errores en la cuantificación de OGM, la misma debe realizarse normalizando la cantidad de secuencias GM con una secuencia endógena de la especie. De esta manera, aunque el ADN se degrade durante el procesamiento de la muestra (en especial cuando se trata de alimentos procesados), las cantidades relativas de la secuencia transgénica a la secuencia de referencia seguirá siendo la misma, por lo que el porcentaje de material GM no se verá afectado ^[10]. El gen endógeno además sirve como control de la calidad del ADN extraído; si este gen no es amplificado durante la PCR, se deduce que la muestra contiene inhibidores de la reacción, o que el ADN extraído se encuentra muy degradado ^[134].

Finalmente y como se ha mencionado, para la cuantificación de OGM es recomendable el uso de estrategias de detección evento específicas. Mediante esta estrategia, dirigida hacia el sitio único de unión entre el transgén y el ADN de la planta, se evita la sobreestimación del porcentaje de OGM en el caso de ocurrir inserciones dobles o duplicaciones de secuencias en el proceso de transformación. La cuantificación mediante la detección de secuencias comunes como promotores, terminadores u otras secuencias transgénicas, pueden resultar en la sobreestimación, si el evento de transformación tiene varias copias de esa secuencia en su construcción, o incluso si existen diferentes ingredientes GM conteniendo esas mismas secuencias. Al mismo tiempo, este método puede dar un resultado subestimado del porcentaje, siempre que se encuentren en la

muestra, eventos que no contienen la secuencia buscada. No obstante, cualquiera de las dos estrategias descritas para la cuantificación (evento-específica o de detección de secuencias comunes) dará lugar a un porcentaje sobrestimado de material GM, cuando se encuentren en la muestra *eventos apilados* ^[148].

Por otra parte, aunque los métodos específicos de eventos son los más adecuados para la cuantificación, la información requerida para diseñar este tipo de metodología no siempre se encuentra disponible en los laboratorios. Los métodos de detección y las secuencias génicas de los nuevos eventos no siempre se encuentran publicados, y los Materiales de Referencia Certificados no siempre están disponibles ni desarrollados.

La puesta a punto de la identificación y cuantificación de cada uno de los eventos, es laboriosa y requiere de infraestructura y de personal capacitado. El costo de estos análisis se encarece enormemente cuando se analizan alimentos, debido a que existen cientos de eventos autorizados para consumo a nivel mundial ^[54]. Es por esta razón que actualmente más de 40 laboratorios de análisis de OGM en alimentos en el mundo, eligen los métodos de cuantificación de secuencias comunes en los eventos liberados (por ejemplo el *p35S* y el *t-Nos*), asegurando la practicidad y la reducción de los costos ^[135].

4.2.3 Análisis de screening, identificación y cuantificación de OGM en alimentos mediante qPCR- SYBR® Green.

Luego de poner a punto la metodología de rastreo, identificación y cuantificación de OGM por qPCR (*SYBR® Green*), se prosiguió con la detección de maíz transgénico en alimentos disponibles en el mercado. Se analizaron un total de 51 alimentos conteniendo maíz (tortillas, cereales y productos de copetín (*snacks*)), de diferente procedencia incluyendo a Uruguay, Argentina, Brasil, Chile, México, EEUU, Francia, España y Alemania.

Los resultados de los análisis indicaron que 32 de los 51 productos presentaron la secuencia del promotor 35S y del terminador *t-Nos*. Este valor reveló que el 62,7% de los alimentos analizados contenían maíz GM. Tras el análisis de identificación de los eventos MON810, Bt11, GA21, TC1507 y Bt176, se encontró que el 75% de las muestras contenían el evento Bt11, el 65,5% el evento MON810, el 31,2% el evento GA21 y el 12,5% el evento TC1507. Se pudo descartar la presencia del evento no autorizado Bt176 en todas las muestras analizadas. Estos resultados aportan al conocimiento de cuáles son los eventos de maíz mayormente distribuidos en los alimentos que se comercializan en el mercado,

mostrando una relación coherente al uso y liberación de los mismos a nivel nacional e internacional ^[54].

Por último se llevó a cabo la cuantificación de OGM a través de la detección del promotor *CaMVp35S*. Como resultado se encontró que el 53,3% de los alimentos sobrepasaron el límite umbral del 1% establecido para el etiquetado de maíz GM en alimentos en Montevideo. Respecto a los 21 alimentos muestreados en el mercado Uruguayo, se observó que diez resultaron positivos para la presencia del elemento p35S y del t-NOS, representando el 47,6% del total. Seis de estos, presentaron valores de OGM mayor al 1%, lo que representó un 28,6% del total. Esto muestra que probablemente muchos de los alimentos que contienen maíz y se comercializan en la capital, próximamente deberán estar etiquetados para la presencia de transgénicos.

Finalmente todos los resultados conseguidos mediante la metodología de detección y cuantificación de OGM por qPCR (*SYBR® Green*), fueron comparados con los obtenidos tras la utilización de kits comerciales de tecnología *TaqMan®* validados en Alemania (*BIOTECON Diagnostics*). Para este caso no se observaron diferencias entre los métodos, consiguiendo resultados muy similares tanto para el *screening* de OGM como para la cuantificación del promotor 35S en los alimentos a base de maíz. Esta evaluación resultó importante debido a que permitió validar la nueva metodología desarrollada, permitiéndonos asumir que este método, más robusto y económico, puede utilizarse de manera confiable para la detección y cuantificación de OGM en alimentos.

5

Conclusiones y Perspectivas

El presente trabajo buscó estudiar la situación actual de Uruguay respecto al uso de la biotecnología agrícola, tanto a nivel de los cultivos GM en el campo, como a nivel de los alimentos derivados que se comercializan.

Siguiendo con la hipótesis de la existencia de flujo de transgenes entre cultivos de maíz GM y no-GM, el trabajo experimental I de la tesis tuvo como principal objetivo emplear técnicas moleculares de detección de OGM, para evaluar la frecuencia con la que ocurre dicho fenómeno en Uruguay. Para poder llevar a cabo este fin, se ideó un sistema de trazabilidad molecular capaz de evidenciar la presencia de transgenes en la descendencia de los cultivos de maíz no-GM con potencial riesgo de contaminación con polen de cultivos GM.

A partir del uso de métodos de rastreo de OGM por PCR en punto final, se pudo detectar y confirmar la presencia de transgenes en las progenies de los cultivos no-GM próximos a los cultivos GM. Este fenómeno fue observado en cultivos convencionales cuyos vecinos GM se encontraron a distancias de hasta 420 metros, en frecuencias de entre 0,3 y 5%. Los resultados de este estudio indican que al menos en las condiciones del ensayo, la distancia necesaria para mantener el umbral de contaminación con transgenes (por flujo génico) por debajo del 1%, no debería ser menor a 420 metros y las diferencias en las fechas de siembra no menor a las dos semanas.

Mediante el empleo de estrategias de PCR *evento específicas*, se pudo confirmar la identidad del evento involucrado en cada progenie no-GM, permitiendo identificar la fuente responsable de la transferencia de transgenes.

Asimismo, se logró poner a punto un método de extracción de ADN y amplificación por PCR capaz de detectar e identificar el ADN transgénico de un grano de polen de maíz. Esta metodología no solo tiene el potencial de evaluar la ocurrencia de flujo de transgenes, a través del seguimiento de los granos de polen individuales, sino que puede aportar al estudio de los alimentos que los contienen, tales como la miel.

Se entiende que los resultados de este estudio podrían contribuir a redefinir las políticas de coexistencia en Uruguay, mostrando que las distancias de aislamiento entre los cultivos GM y no-GM resultan fundamentales para conservar la identidad de los

mismos, y para asegurar valores de presencia accidental de transgenes, por debajo del umbral establecido para el etiquetado de OGM en los alimentos derivados del maíz.

Como perspectivas de este trabajo, se prevé analizar las progenies de los cultivos no-GM mediante técnicas de cuantificación de OGM más sensibles, tales como la PCR en Tiempo Real. Para este propósito deberán ponerse a punto las técnicas de cuantificación de los eventos específicos Bt11 y MON810, que tendrán como antecedentes al trabajo experimental II de esta tesis.

En lo que respecta al trabajo experimental II, el objetivo general consistió en estandarizar una metodología, basada en la técnica de PCR en Tiempo Real (*SYBR® Green*), para detectar, identificar y cuantificar maíz GM en alimentos procesados. Este objetivo fue alcanzado satisfactoriamente, permitiendo evaluar la situación actual de los productos de maíz que se comercializan.

En el marco de este trabajo se logró ajustar un protocolo de extracción de ADN basado en el método de CTAB, capaz de rendir ADN de buena calidad a partir de varias matrices alimentarias complejas, permitiendo asegurar el éxito de los ensayos de detección de OGM por PCR.

A su vez, se logró poner a punto un método de *screening* de transgénicos, basado en la detección de las secuencias del promotor *CAMVp35s* y del Terminador *Nos (t-Nos)*, capaz de rastrear a todos los eventos liberados hasta la fecha en Uruguay. Esta metodología basada en los Métodos de Referencia validados por la Unión Europea, resultó ser robusta y específica, más sensible que la PCR en punto final y más económica que la qPCR utilizando sondas de hidrólisis o de hibridación.

Por otro lado, se ajustaron protocolos de identificación *evento-específicos*, que utilizan cebadores específicos acoplados al análisis de las curvas de *melting*, y permiten identificar a varios de los eventos de maíz autorizados en el país (MON810, Bt11, GA21, TC1507) y en la región (Bt176).

Además, se consiguió ajustar un protocolo para la cuantificación de OGM en alimentos que contienen maíz, mediante la detección del promotor *CaMVp35S* y su normalización con un gen endógeno de referencia, *hmgA* de maíz. El mismo presentó eficiencias de amplificación y parámetros de rendimiento aceptados por las normas de referencia para el análisis de OGM. El límite de detección (LOD) fue fijado en 0,01% (2 copias de ADN transgénico) y el límite de cuantificación (LOQ) en 0,1% de material GM.

Ambos límites se encuentran por debajo del umbral establecido en Montevideo para el etiquetado de organismos genéticamente modificados en alimentos (definido en 1%), por lo que se concluye que este método puede utilizarse de manera conveniente para la cuantificación de OGM en productos que contienen maíz. Esta metodología resultó ser robusta y rápida, más sensible que la PCR en punto final y más económica que la qPCR que utiliza sondas específicas. Este método de cuantificación obtuvo parámetros de especificidad y sensibilidad similares al método de cuantificación con sondas específicas del tipo *TaqMan*[®], lo que legitima su utilización para el análisis de OGM en los alimentos.

Por otra parte, utilizando esta metodología se analizaron 51 productos a base de maíz, de los cuales 32 presentaron las secuencias transgénicas buscadas a través del *screening* de OGM. Este valor representó al 62,7% de los alimentos muestreados. De estos 32 alimentos, 22 correspondieron a alimentos comercializados fuera del país y 10 a alimentos distribuidos en Uruguay. El evento mayormente representado en estas muestras fue el evento Bt11, seguido del MON810, el GA21 y el TC1507. El evento no autorizado Bt176 no fue encontrado en ninguno de los alimentos analizados.

Tras la cuantificación del promotor 35S se encontró que 18 de las 32 muestras que presentaron esta secuencia, lo hicieron en porcentajes mayores al límite umbral de 1%, establecido en el nuevo Decreto Departamental de Montevideo (Decreto N° 34.901, 2013), para el etiquetado de OGM en alimentos. Este valor representó un 56,25% de las muestras positivas para la presencia de transgénicos, y un 35,3% del total de las muestras analizadas.

Los resultados de este estudio aportan al conocimiento de la situación sobre el uso y la comercialización de los OGM en el país, a través del estudio de algunos casos específicos de alimentos que contienen estas variedades, y determinando las cantidades en que se encuentran presentes. Cabe destacar que este trabajo resulta innovador respecto a la puesta a punto de las metodologías de detección y cuantificación de OGM en alimentos en Uruguay, representando el primer estudio de cuantificación de OGM por qPCR en el país.

Como consideración final este estudio aporta al cumplimiento del objetivo del convenio vigente N° 3061/93 entre la Unidad Laboratorio de Bromatología de la Intendencia de Montevideo y La Facultad de Ciencias, ayudando a fortalecer las capacidades y el conocimiento respecto a las técnicas de detección de OGM de los técnicos de la Unidad. De esta forma quedó a disposición del mismo, una metodología

capaz de hacer cumplir con la reglamentación establecida para el etiquetado de los alimentos GM en el departamento de Montevideo.

Como perspectiva de este estudio y para seguir con la finalidad del convenio marco, y el nuevo proyecto CSIC Vinculación Universidad - Sociedad y Producción Modalidad 2: “Identificación y cuantificación de especies animales y vegetales –incluyendo Organismos Genéticamente Modificados en alimentos de la Unidad Laboratorio de Bromatología, Intendencia de Montevideo” (Responsable Dr. Claudio Martínez Debat), se comenzará a realizar la puesta a punto de los métodos para cuantificar los eventos de maíz autorizados en Uruguay, MON810, Bt11, GA21, TC1507, NK603 y para cuantificar las variedades de soja MON40-3-2 (RR), MON89788 (RR2Y) y A2704-12. Para ello, se seguirán los protocolos validados por el *Joint Research Centre* de la Unión Europea y se contemplarán los parámetros de validación/verificación presentados en este trabajo.

Luego de poner a punto y verificar estos métodos, se prevé realizar ensayos de interlaboratorio con Laboratorios de detección de OGM en alimentos, como por ejemplo, el Laboratorio Comunitario de Referencia para Alimentos y Piensos Genéticamente Modificados de la Unión Europea (CRL-GMFF), la Red Nacional de Laboratorios de Detección, Identificación y Cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados de México (RNLD-OGM), el Centro GenØk para la Bioseguridad de Noruega, el Laboratorio de Genética Molecular, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y con Laboratorios nacionales que estén realizando este tipo de análisis, tales como el Instituto Nacional de Semillas (INASE) y el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU).

6

Referencias Bibliográficas

1. **Capdevielle, F., Chabalgoity, A., Silveira, R. (2012).** Biotecnología. *Asociación Uruguaya de Biotecnología (Audebio)*. Disponible en <http://audebio.org.uy/biotecnologia/>
2. **Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) (1992).** *Cumbre de Río de Janeiro, Naciones Unidas*. Disponible en <http://www.cbd.int/doc/legal/cbd-es.pdf>
3. **Ocando, O. (2003).** Biotecnología: mitos y realidades. *Agrobio, Bogotá, DC (Colombia)*. Disponible en <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Mitos20realidades.pdf>.
4. **James, C. (2014).** *Global status of commercialised biotech/GM crops: 2013. ISAAA Brief No. 46. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA), Ithaca, NY. ISBN 978-1-892456-55-9.*
5. **Asociación Argentina de Biotecnología (Argenbio).** La biotecnología: Los cultivos transgénicos en el mundo. Dirección web: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=267>. **Acceso, 2014.**
6. **Asociación de Biotecnología Vegetal Agrícola (Agrobio).** Transgénicos en el mundo. Dirección web: http://www.agrobio.org/bfiles/fckimg/AgroBio_mapa_infografia_cultivos%20Biotec_mundia_2013.pdf. **Acceso, 2014.**
7. **Vidal, R. (2006).** Informe sobre el sistema Español de Innovación. Biotecnología y Alimentación. *Fundación Cotec para la Innovación Tecnológica, Madrid. ISBN: 84-95336-64-2. 15.164-2006*
8. **Reis, L. F., Van Sluys, M. A., Garratt, R. C., Pereira, H. M., & Teixeira, M. M. (2006).** GMOs: building the future on the basis of past experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências, 78(4), 667-686.*
9. **Pertry, I., Sabbadini, S., Goormachtig, S., Lokko, Y., Gheysen, G., Bursens, S., & Mezzetti, B. (2014).** Biosafety capacity building: experiences and challenges from a distance learning approach. *New biotechnology, 31(1), 64-68.*
10. **Ahmed, F. E. (2002).** Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology, 20(5), 215-223.*
11. **Quist, D., & Chapela, I. H. (2001).** Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature, 414(6863), 541-543.*
12. **Wilkes, H.G. & Goodman, M.M. (1995).** Mystery and Missing Links: The Origin of Maize. *CIMMYT. Mexico, D. F., Mexico.*
13. **Mangelsdorf, P. C. & Reeves, R. G. (1939).** The origin of Indian corn and its relatives. (Vol. 574). *Agricultural and Mechanical College of Texas.*

14. **Mangelsdorf, P. C. (1974).** Corn. Its origin, evolution and improvement. (No.2.ed.). *Belknap Press of Harvard University Press*.
15. **Beadle, G.F. (1986).** The origin of corn. *Scientific American* 254(8): 80-86.
16. **Doebley, J. (1990).** Molecular evidence for gene flow among *Zea* species. *BioScience* 40(6): 443-448.
17. **Doebley, J., Stec, A., Wendel, J., & Edwards, M. (1990).** Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: implications for the origin of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), 9888-9892.
18. **Doebley, J., & Stec, A. (1991).** Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics*, 129(1), 285-295.
19. **Wang, R. L., Stec, A., Hey, J., Lukens, L., & Doebley, J. (1999).** The limits of selection during maize domestication. *Nature*, 398(6724), 236-239.
20. **Van Heerwaarden, J., Doebley, J., Briggs, W. H., Glaubitz, J. C., Goodman, M. M., Gonzalez, J. D. J. S., & Ross-Ibarra, J. (2011).** Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(3), 1088-1092.
21. **Serratos, H. J. A. (2009).** El origen y la diversidad del maíz en el continente americano. *Greenpeace. México, DF*. Disponible en: www.greenpeace.org.mx
22. **Acosta, R. (2009).** "El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba". *Cultivos tropicales*, 30(2), 00-00.
23. **Organization for Economic Co-operation and development (OECD) (2003).** Consensus Document on the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). *OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology. No. 27. Paris*. Disponible en: <http://www.oecd.org/ehs>, 2003.
24. **Vigouroux, Y., J. C. Glaubitz, Y. Matsuoka, M. M. Goodman, J. Sánchez G., & J. Doebley. (2008).** Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *American Journal of Botany*, 95 (10), 1240-1253.
25. **Salhuana, W., & Pollak, L. (2006).** Latin American maize project (LAMP) and germplasm enhancement of maize (GEM) project: Generating useful breeding germplasm. *Maydica*, 51(2), 339. Disponible en: http://www.maydica.org/articles/51_339.pdf
26. **Gutiérrez, L., Franco, J., Crossa, J., & Abadie, T. (2003).** Comparing a preliminary racial classification with a numerical classification of the maize landraces of Uruguay. *Crop science*, 43(2), 718-727.
27. **Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. M., Serratos, J. A., & Bye, R. A. (2009).** Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. *Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad*.

28. **Arbo, M.M. (2013).** Morfología de Plantas vasculares. Sexualidad y prefloración. *Botánica Morfológica* Disponible en http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema5/5_1_sexualidad.htm
29. **Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO).** Banco de imágenes. Dirección web: <http://bdi.conabio.gob.mx/fotoweb/Grid.fwx?position=385&archiveid=5000&columns=4&rows=8&sorting=ModifiedTimeAsc&search=Zea%20m%20ys>. Acceso 2014.
30. **Poehlman, J. M. (1994).** Breeding field crops. *Iowa State University Press*.
31. **Landraces, M. M. (2009).** Liberación comercial de maíz transgénico y acumulación de transgenes en razas de maíz mexicano. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 257-263.
32. **Valladares, C.A. (2010).** Taxonomía y Botánica de los Cultivos de Grano. *La Ceiba, Honduras*.
33. **Hanley, S., Edwards, D., Stevenson, D., Haines, S., Hegarty, M., Schuch, W., & Edwards, K. J. (2000).** Identification of transposon-tagged genes by the random sequencing of Mutator-tagged DNA fragments from *Zea mays*. *The Plant Journal*, 23(4), 557-566.
34. **Pray, L. (2008).** Transposons, or jumping genes: Not junk DNA?. *Nature Education* 1(1):32
35. **McClintock, B. (1965).** Components of action of the regulators Spm and Ac. *Carnegie Inst Wash Year Book*, 64, 527-536.
36. **Biémont, C., & Vieira, C. (2006).** Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443(7111), 521-524.
37. **Rebollo, R., Horard, B., Hubert, B., & Vieira, C. (2010).** Jumping genes and epigenetics: towards new species. *Gene*, 454(1), 1-7.
38. **Haberer, G., Young, S., Bharti, A. K., Gundlach, H., Raymond, C., Fuks, G. & Messing, J. (2005).** Structure and architecture of the maize genome. *Plant physiology*, 139(4), 1612-1624.
39. **Messing, J., & Dooner, H. K. (2006).** Organization and variability of the maize genome. *Current opinion in plant biology*, 9(2), 157-163.
40. **Candela, H.; Hake, S. (2008).** The art and design of genetic screens: Maize. *Nature Reviews Genetics*, v.9, n.3, p. 192-203, 2008.
41. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** Dirección web: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>. Acceso 2014
42. **CIMMYT, IITA, CGIAR. (2013).** What the world eats: Maize. A sustainable strategy for food security. *Publicación de CIMMYT*. Disponible en www.cimmyt.org.
43. **Silva Castro, C. A. (2005).** Maíz genéticamente modificado. *Publicación de Agro-Bio* URL Primera edición. Bogotá DC, Colombia. Disponible en www.agrobio.org.

44. **Paczka, R. O. (2003).** La diversidad del maíz en México. Sin maíz no hay país. *Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares e Indígenas, México, D. F. pp. 123-154.*123-154.
45. **Brush, S. B., & Perales, H. R. (2007).** A maize landscape: Ethnicity and agro-biodiversity in Chiapas Mexico. *Agriculture, ecosystems & environment, 121(3), 211-221.*
46. **Pressoir, G., & Berthaud, J. (2004).** Population structure and strong divergent selection shape phenotypic diversification in maize landraces. *Heredity, 92(2), 95-101.*
47. **Montevideo COMM.** Enciclopedia Geográfica del Uruguay. Dirección web <http://slekis.blogspot.in/2011/01/enciclopedia-geografica-del-uruguay.html>. **Acceso 2014.**
48. **Cárcamo, M.I. (2011).** Estudio sobre la Biodiversidad, Erosión y Contaminación Genética del maíz criollo en Uruguay. *RAPAL-Uruguay. (p. 35).*
49. **Registro IM S.R.A (2014).** Productos registrados a base de Maíz. *Laboratorio de Bromatología, Servicio de Regulación Alimentaria, Intendencia de Montevideo, Uruguay.*
50. **Pazos, F. (2008).** Maíz transgénico en Uruguay. Un ejemplo perfecto de lo que sucede cuando se promueve la “coexistencia” de dos modelos de agricultura. *RAP-AL Uruguay.* Disponible en: http://www.rapaluruguay.org/transgenicos/Uruguay/Maiz_transgenico_Uruguay.pdf
51. **Ferrari, J.R., Hernández, A., Freiría, G., & Rincón, F. (2013).** Anuario Estadístico Agropecuario. *MGAP-DIEA, Uruguay.* Disponible en: www.mgap.gub.uy/diea.
52. **Uruguay XXI Promoción de Inversiones y Exportaciones (2013).** Informe de comercio exterior de Uruguay Enero-Octubre 2013. Disponible en <http://www.uruguayxxi.gub.uy/wp-content/uploads/2011/11/Informe-de-Comercio-Exterior-de-Uruguay-Octubre2013.pdf>
53. **Blasina y Asociados (2013).** El oro maya reluce en Uruguay: año récord para el maíz. *El Observador.* Disponible en: <https://www.elobservador.com.uy/noticia/249657/el-oro-maya-reluce-en-uruguay-ano-record-para-el-maiz/>.
54. **International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications (ISAAA).** GM Approval Database. Dirección web: <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>. **Acceso 2014.**
55. **Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA).** *Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca (SAGyP). Presidencia de la Nación, Argentina.* Dirección web: http://minagri.siiia.gob.ar/site/agregado_de_valor/biotecnologia/20CONABIA/index.php. **Acceso 2014.**
56. **Manejo de Resistencia de Insectos (MRI).** Claves para un buen manejo del Maíz Bt. *Cámara Uruguaya de Semillas.* Dirección web: <http://www.programamri.com/uy/>. **Acceso 2014**
57. **GM Crop Database.** Center for environmental risk assessment. Dirección web: <http://cera-gmc.org/index.php>. **Acceso 2014**

58. **Monsanto (2008)**. Guía de usos de las tecnologías. Disponible en <http://www.monsanto.com/global/ar/productos/documents/guia-tecnologica-final.pdf>
59. **Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp, E., & Mroginski, L. (2010)**. Biotecnología y Mejoramiento vegetal II. *Consejo Argentino para la Información y el desarrollo de la Biotecnología*, 2.
60. **Cámara Uruguaya de Semillas (CUS)**. Biotecnología. Dirección web: <http://www.cus.org.uy/>. **Acceso 2014**.
61. **Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNbio)**. Comisión para la gestión de Riesgos, MGAP, Uruguay. Dirección web: <http://www.mgap.gub.uy>. **Acceso 2014**.
62. **Resolución Nº 42 de 21 de setiembre/2012 - Maíz Dulce – Comercial (2012)**. Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNbio). Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,gnbio,gnbio-resoluciones-de-autorizacion-de-gnbio,O,es,0>,
63. **Torres, M.L., Crespo Plaza, R., Romo, G., Vargas, J., Rojas, W., & Jarrín, G. (2006)**. Marco Nacional de seguridad de la Biotecnología (Bioseguridad). *PROYECTO PNUMA-GEF-MAE, QUITO, Ecuador*
64. **García Préchac, F., Ernst, O., Arbeletche, P., Bidegain, M. P., Pritsch, C., Ferenczi, A., & Rivas, M. (2010)**. Intensificación agrícola: Oportunidades y Amenazas para un país productivo y natural. Colección CSIC Artículo, 2.
65. **Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. (2000)**. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexos. *Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica*.
66. **Joint FAO/WHO Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, & World Health Organization. (2003)**. *Codex Alimentarius: Food hygiene, basic texts*. Food & Agriculture Org.
67. **Unión Internacional para la protección de las obtenciones vegetales (UPOV)**. Convenio internacional para la protección de las obtenciones vegetales. Dirección web: <http://www.upov.int/portal/index.html.es>. **Acceso 2014**.
68. **Decreto 249/000 (2000)**. Créase una Comisión de Evaluación de Riesgo de Vegetales Genéticamente Modificados integrada por especialistas de los organismos que se determinan. *Diario Oficial - 4 Setiembre 2000*.
69. **Decreto 37/007 (2007)**. Se suspende el tratamiento de nuevas solicitudes de autorización para introducir eventos de organismos vivos de origen vegetal. *Diario oficial - 29 enero 2007*.
70. **Decreto 353/008 (2008)**. "Normas relativas a Bioseguridad de vegetales y sus partes genéticamente modificadas". *Diario Oficial Nº 27.534 - Julio 28 de 2008*.
71. **Convention on Biological Diversity**. Centro de Intercambio de Información sobre Seguridad de la Biotecnología (CIISB). *Biosafety Clearing House*. Dirección web: <http://bch.cbd.int/>. **Acceso 2014**.

72. **Resolución Nº 53 de 19 de setiembre/2012 - Maíz armonización – Comercial (2012).** Gabinete Nacional de Bioseguridad (GNbio). Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,gnbio,gnbio-resoluciones-de-autorizacion-de-gnbio,O,es,0>,
73. **Yankelevich, A. (2012).** Uruguay annual Biotechnology report 2012. *USDA Foreign Agricultural Service*. Disponible en http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Agricultural%20Biotechnology%20Annual_Buenos%20Aires_Uruguay_72-2012.pdf
74. **Messeguer, J., Peñas, G., Ballester, J., Bas, M., Serra, J., Salvia, J., & Melé, E. (2006).** Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. *Plant Biotechnology Journal*, 4(6), 633-645.
75. **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. *Report Commissioned by the UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF). Project No. RG0123*. Disponible en : <http://www.agindustries.org.uk/scimac/otherdoc/NIABSep Dist Review .pdf>
76. **Sanvido O., Widmer F., Winzeler M., Streit B., Szerencsits E., Bigler F., (2008).** Definition and feasibility of isolation distances for transgenic maize cultivation. *Transgenic Res* 17:317–335
77. **Ma, B. L., Subedi, K. D., & Reid, L. M. (2004).** Extent of cross-fertilization in maize by pollen from neighboring transgenic hybrids. *Crop Science*, 44(4), 1273-1282.
78. **Jones, M. D., & Brooks, J. S. (1950).** Effectiveness of distance and border rows in preventing out-crossing in corn. *Technical Bulletin. Oklahoma Agricultural Experiment Station*, 38.
79. **Kaplinsky, N., Braun, D., Lisch, D., Hay, A., Hake, S., & Freeling, M. (2002).** Maize transgene results in Mexico are artefacts. *Nature*, 416(6881), 601.
80. **Metz, M., & Fütterer, J. (2002).** Biodiversity: suspect evidence of transgenic contamination. *Nature*, 416(6881), 600-601.
81. **Serratos-Hernández, J. A., Gómez-Olivares, J. L., Salinas-Arreortua, N., Buendía-Rodríguez, E., Islas-Gutiérrez, F., & de-Ita, A. (2007).** Transgenic proteins in maize in the soil conservation area of Federal District, México. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 5(5), 247-252.
82. **Mercer, K. L., & Wainwright, J. D. (2008).** Gene flow from transgenic maize to landraces in Mexico: an analysis. *Agriculture, ecosystems & environment*, 123(1), 109-115.
83. **Piñeyro-Nelson, a., Van Heerwaarden, J., Perales, H. R., Serratos-Hernández, J. A., Rangel, A., Hufford, M. B., & Alvarez-Buylla, E. R. (2009).** Transgenes in Mexican maize: molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular ecology*, 18(4), 750-761.

84. **Mauro, I. J., & McLachlan, S. M. (2008).** Farmer Knowledge and Risk Analysis: Postrelease Evaluation of Herbicide-Tolerant Canola in Western Canada. *Risk Analysis*, 28(2), 463-476.
85. **Devos Y., Reheul D., De Schrijver A. (2005).** The co-existence between transgenic and non-transgenic maize in the European Union: a focus on pollen flow and crossfertilization. *Environ. Biosafety Res.* 4:71–87.
86. **Poppy, G. M., & Wilkinson, M. J. (Eds.). (2008).** Gene flow from GM plants. *John Wiley & Sons.*
87. **Sabalza, M., Miralpeix, B., Twyman, R. M., Capell, T., & Christou, P. (2011).** EU legitimizes GM crop exclusion zones. *Nature biotechnology*, 29(4), 315-317.
88. **European Commission (2003).** Commission Recommendation of 23 July 2003 on guidelines for the development of national strategies and best practices to ensure the coexistence of genetically modified crops with conventional and organic farming. *Commission of the European Communities, Brussels.*
89. **Galeano, P., Debat, C. M., Ruibal, F., Fraguas, L. F., & Galván, G. A. (2010).** Cross-fertilization between genetically modified and non-genetically modified maize crops in Uruguay. *Environmental biosafety research*, 9(03), 147-154.
90. **Proyecto CSIC (I+D) (2011).** “Flujo de transgenes entre cultivos comerciales de maíz en el Uruguay”. Programa de Vinculación Universidad-Sociedad y Producción, Modalidad 2, Ejecución 2011-2013 Responsable Dra. ML Franco-Fraguas. Facultad de Química, UdeLaR.
91. **Miraglia, M., Berdahl, K. G., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E. J. (2004).** Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology*, 42, 1157-1180.
92. **Robinson C., (2001).** Alimentos y tecnología de modificación genética salud y seguridad en el consumidor. *International Life Sciences Institute (ILSI Europe) Bruselas, Bélgica. ISBN 1-57881-151-1*
93. **Abad R., Concepción A., Franco A., Sánchez R., Rosales J., (2004).** Organismos Modificados Genéticamente: Trazabilidad y Etiquetado. *ULLED Biotecnología*
94. **Schiavone E., Morón P., Lema M., (2006).** Normas locales sobre identificación de alimentos transgénicos y el derecho a la información del consumidor. *Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos – SAGPyA*
95. **OMS (Organización Mundial de la Salud) (2005).** Biotecnología moderna de los alimentos, salud y desarrollo humano: estudio basado en evidencias. *ISBN 92 4 159305*, Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/biotech_sp.pdf
96. **Reglamento (CE) No 1829/2003 (2003).** Alimentos y piensos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea. L 268/1.*
97. **Reglamento (CE) No 1830/2003 (2003).** Relativo a la Trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos

producidos a partir de éstos, y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 268/24

98. **FDA Consumer Health Information (2013)**. FDA's Role in Regulating Safety of GE Foods. *U.S. Food and Drug Administration*. Disponible en <http://www.fda.gov/downloads/forconsumers/consumerupdates/ucm352193.pdf>
99. **Rosano L. (2013)**. *Organización No Gubernamental: REDES-Amigos de la Tierra, SlowFood Canario*. Comunicación personal.
100. **Ley n°17.250 Defensa del consumidor (2000)**. *Poder Ejecutivo. Diario Oficial* . 17 ago/000 - N° 25583, Montevideo, Uruguay.
101. **Mercosur (2003)**. Reglamento técnico Mercosur sobre el rotulado nutricional de alimentos envasados. *lii gmc – montevideo*. Disponible en: [mercosur/gmc/res.nº 46/03](http://mercosur/gmc/res.nº46/03).
102. **Decreto N° 34.901 (2013)**. Alimentos que contienen organismos genéticamente modificados. *Junta Departamental de Montevideo. Resolución N° 5825/13. Intendencia de Montevideo, Uruguay*.
103. **Convenio Marco, Resolución N° 3061/93 (2012)**. Identificación de especies animales y vegetales, incluyendo a los Organismos Genéticamente Modificados en alimentos. *Unidad Laboratorio de Bromatología, Intendencia de Montevideo – Facultad de Ciencias, UdelaR. Montevideo, Uruguay*.
104. **Querci M., Jermini M., Van den Eede G (2007)**. Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. *Joint Research Centre European Commission ISBN: 978-92-79-04831-9*. Disponible en <http://mbg.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/documentation.htm>
105. **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, et al.(1988)** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491
106. **Jiménez, M. L., García, M. V., & Mallorquín, P. (2003)**. Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria: informe de vigilancia tecnológica. *Genoma España*.
107. **Querci, M., Van den Bulcke, M., Zel, J., Van den Eede, G., & Broll, H. (2010)**. New approaches in GMO detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 1991-2002.
108. **Markoulatos P., Siafakas N., Papatoma A., Nerantzis E., Betzios B., Dourtoglou V., and Moncany3 M. (2004)**. Qualitative and Quantitative Detection of Protein and Genetic Traits in Genetically Modified Food. *Food Reviews International. Vol. 20, No. 3, pp. 275–296, 2004*
109. **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*.
110. **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.

111. **Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., van den Eede, G., (2002).** Analytical methods for detection and determination of genetically modified organism in agricultural crops and plant derived food products. *European Food Research and Technology* 214, 3–26.
112. **Holst-Jensen, A., De Loose, M., & Van den Eede, G. (2006).** Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(8), 2799-2809.
113. **Hernández, M., Esteve, T., Prat, S., & Pla, M. (2004).** Development of real-time PCR systems based on SYBR® Green I, Amplifluor™ and TaqMan® technologies for specific quantitative detection of the transgenic maize event GA21. *Journal of cereal science*, 39(1), 99-107.
114. **Cankar, K., Štebih, D., Dreo, T., Žel, J., & Gruden, K. (2006).** Critical points of DNA quantification by real-time PCR—effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC biotechnology*, 6(1), 37.
115. **Yang, L., Guo, J., Pan, A., Zhang, H., Zhang, K., Wang, Z., & Zhang, D. (2007).** Event-specific quantitative detection of nine genetically modified maizes using one novel standard reference molecule. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(1), 15-24.
116. **Waiblinger, H. U., Ernst, B., Anderson, A., & Pietsch, K. (2008).** Validation and collaborative study of a P35S and T-nos duplex real-time PCR screening method to detect genetically modified organisms in food products. *European Food Research and Technology*, 226(5), 1221-1228.
117. **Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Mbongolo-Mbella, G., Roosens, N., Sneyers, M., Leunda-Casi, A., & Van den Bulcke, M. (2010).** SYBR® Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products. *European Food Research and Technology*, 230(3), 383-393.
118. **Van den Bulcke, M., Lievens, A., Barbau-Piednoir, E., MbongoloMbella, G., Roosens, N., Sneyers, M., & Casi, A. L. (2010).** A theoretical introduction to Combinatory SYBR® Green qPCR Screening, a matrix-based approach for the detection of materials derived from genetically modified plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2113-2123.
119. **Huber, I., Block, A., Sebah, D., Debode, F., Morisset, D., Grohmann, L. & Busch, U. (2013).** Development and validation of duplex, triplex, and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(43), 10293-10301.
120. **Cottenet, G., Blancpain, C., Sonnard, V., & Chuah, P. F. (2013).** Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(21), 6831-6844.
121. **Barbau-Piednoir, E., Stragier, P., Roosens, N., Mazzara, M., Savini, C., Van den Eede, G., & Van den Bulcke, M. (2014).** Inter-laboratory Testing of GMO Detection by Combinatory SYBR® Green PCR Screening (CoSYPs). *Food Analytical Methods*, 1-10.

122. **Vinueza-Burgos, C. (2009).** PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(2), 1-13.
123. **López Andreo, M. (2013).** Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real. *Doctoral dissertation, Universidad Complutense de Madrid.*
124. **Mason, G., Provero, P., Vaira, A. M., & Accotto, G. P. (2002).** Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC biotechnology*, 2(1), 20.
125. **Gasparic, M. B., Tengs, T., La Paz, J. L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T. & Gruden, K. (2010).** Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2023-2029.
126. **BIO-RAD Laboratories (2012).** Biotechnology Explorer GMO investigator kit: A quantitative Real Time PCR Extension. *Application Note 1-800-4BIORAD (1-800-424-6723)*. Disponible en http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/16625_05.pdf
127. **Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., & Pla, M. (2003).** Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry*, 323(2), 164-170.
128. **Flores, Y. A. C., Herrera, R. R., Aguilar, C. N., Carlos, J., & Esquivel, C (2007).** Nuevos métodos para la detección de residuos de organismos genéticamente modificados en alimentos basados en el ADN. *BioTecnología, Vol. 11 No. 236*
129. **Wiseman, G. (2002).** State of the art and limitations of quantitative polymerase chain reaction. *Journal of AOAC International*, 85(3), 792-796.
130. **Koch, W. H. (2004).** Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(9), 749-761.
131. **Lie, Y. S., & Petropoulos, C. J. (1998).** Advances in quantitative PCR technology: 5' nuclease assays. *Current opinion in biotechnology*, 9(1), 43-48.
132. **Kutyavin, I. V., Afonina, I. A., Mills, A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E. A., Belousov, E. S., & Hedgpeth, J. (2000).** 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*, 28(2), 655-661
133. **European Network of GMO laboratories (ENGL) (2011).** Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. *EUR – Scientific and Technical Research series – ISSN 1831-9424, 23 pp.*
134. **Hernández, M., Duplan, M. N., Berthier, G., Vaïtilingom, M., Hauser, W., Freyer, R., & Bertheau, Y. (2004).** Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays L.* *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(15), 4632-4637.

135. Holden, M. J., Levine, M., Scholdberg, T., Haynes, R. J., & Jenkins, G. R. (2010). The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2175-2187.
136. ISO 21568 (2005). *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Sampling*.
137. ISO 21569 (2005). *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Qualitative nucleic acid based methods*
138. ISO 21570 (2005). *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods*
139. ISO 21571 (2005). *Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction*
140. ISO 24276 (2006). *Foodstuffs — Methods for the detection of genetically modified organisms and derived products — General requirements and definitions*
141. Bonfini, L., Van den Bulcke, M. H., Mazzara, M., Ben, E., & Patak, A. (2012). GMOMETHODS: The European Union database of reference methods for GMO analysis. *Journal of AOAC International*, 95(6), 1713-1719. Dirección web: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/>
142. Van den Eede, G. (2011). Compendium of reference methods for GMO analyses. *Publications Office of the European Union, Luxembourg*. http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/docs/GMO_JRC_Reference_Report_2011.pdf
143. International Standard (ISO) 5725. (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. *International Organization for Standardization, Genève, Switzerland*.
144. International Standard (ISO) 17025 (2005). General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. *International Organization for Standardization, Genève, Switzerland*.
145. Trapmann, S. (2006). Uso de materiales de referencia certificados para la cuantificación de OMG en alimentos y piensos. *Comisión Europea – Centro Común de Investigación – Instituto de Medidas y Materiales de Referencia (IRMM), Geel, Bélgica*
146. European Commission, Joint Research Center, Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM). Dirección web: <https://ec.europa.eu/jrc/en/reference-materials>. Acceso 2014
147. Arumuganathan, K., & Earle, E. D. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant molecular biology reporter*, 9(3), 208-218.
148. Milavec, M., Dobnik, D., Yang, L., Zhang, D., Gruden, K., & Žel, J. (2014). GMO quantification: valuable experience and insights for the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 1-13.

149. Zhang, D., & Guo, J. (2011). "The Development and Standardization of Testing Methods for Genetically Modified Organisms and their Derived Products". *Journal of integrative plant biology*, 53(7), 539-551.
150. Brodmann, P. D., Ilg, E. C., Berthoud, H., & Herrmann, A. (2002). Real-time quantitative polymerase chain reaction methods for four genetically modified maize varieties and maize DNA content in food. *Journal of AOAC International*, 85(3), 646-653.
151. Bahrndt, C., Krech, A. B., Wurz, A., & Wulff, D. (2010). Validation of a newly developed hexaplex real-time PCR assay for screening for presence of GMOs in food, feed and seed. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 2103-2112.
152. Querci, M., Foti, N., Bogni, A., Kluga, L., Broll, H., & Van den Eede, G. (2009). Real-time PCR-based ready-to-use multi-target analytical system for GMO detection. *Food Analytical Methods*, 2(4), 325-336.
153. Shao, N., Jiang, S. M., Zhang, M., Wang, J., Guo, S. J., Li, Y. & Tao, S. C. (2014). MACRO: a combined microchip-PCR and microarray system for high-throughput monitoring of genetically modified organisms. *Analytical chemistry*, 86(2), 1269-1276.
154. Žel, J., Milavec, M., Morisset, D., Plan, D., Van den Eede, G., & Gruden, K. (2012). *How to reliably test for GMOs* (pp. 1-95). Springer US.
155. Zahradnik, C., Kolm, C., Martzy, R., Mach, R. L., Krska, R., Farnleitner, A. H., & Brunner, K. (2014). Detection of the 35S promoter in transgenic maize via various isothermal amplification techniques: a practical approach. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 1-8.
156. Morisset, D., Štebih, D., Milavec, M., Gruden, K., & Žel, J. (2013). Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR. *PLoS One*, 8(5), e62583.
157. Galeano, P. & Galván G., (2013). Informe final Proyecto CSIC-SP 601: Flujo de transgenes entre cultivos comerciales de maíz en Uruguay. *Proyectos de Vinculación Universidad – Sociedad y Producción (Modalidad 2)*. Universidad de la República
158. Doyle J. J., Doyle J. L (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.
159. García-Segura, J.M., Gavilanes, J.M., Gavilanes, J.G., Martínez-Pozo, A., Montero, F., Oñaderra, M., and Vivanco, F. (1996). Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica. Madrid, Editorial Síntesis.
160. Suyama, Y., Kawamuro, K., Kinoshita, I., Yoshimura, K., Tsumura, Y., & Takahara, H. (1996). DNA sequence from a fossil pollen of *Abies* spp. from Pleistocene peat. *Genes & genetic systems*, 71(3), 145-149.
161. Chen, P. H., Pan, Y. B., & Chen, R. K. (2008). High-throughput Procedure for Single Pollen Grain Collection and Polymerase Chain Reaction in Plants. *Journal of integrative plant biology*, 50(3), 375-383.
162. Isagi Y. and Suyama Y. (2011). Single-Pollen Genotyping. *Ecological Research Monographs* 1, DOI 10.1007/978-4-431-53901-8_2, © Springer.

163. King Christine E., Debruyne Régis, Kuch Melanie, Schwarz Carsten, & Hendrik N. Poinar (2009). A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. *BioTechniques* 47:941-949.
164. Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., & Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant molecular biology*, 17(5), 1105-1109.
165. Westgate, M. E., Lizaso, J., & Batchelor, W. (2003). Quantitative relationships between pollen shed density and grain yield in maize. *Crop Science*, 43(3), 934-942.
166. Brookes, G., Barfoot, P., Melé, E., Messeguer, J., Bénétrix, F., Bloc, D., & Poeydomenge, C. (2004). Genetically modified maize: pollen movement and crop co-existence. *PG Economics, Dorchester*, 20.
167. Stern, D. B., Hanson, M. R., & Barkan, A. (2004). Genetics and genomics of chloroplast biogenesis: maize as a model system. *Trends in plant science*, 9(6), 293-301.
168. Ito M, Suyama Y, Ohsawa WY (2008). Airborne-pollen pool and mating pattern in a hybrid zone between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla*. *Mol Ecol* 17:5092–5103.
169. BIOTECN Diagnostics. Dirección web: <http://www.bc-diagnostics.com/>. Acceso 2013
170. European Commission, Joint Research Center, Community reference laboratory (ENGL) (2008). Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing. Disponible en: <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/>
171. Roberto Morales (2014). Máximo histórico en la importación de maíz en México. AGRONoticias América Latina y el Caribe, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), México. Disponible en <http://www.fao.org/agronoticias/agro-noticias/detalle/es/c/212224/>
172. Zel, J., Mazzara, M., Savini, C., Cordeil, S., Camloh, M., Stebih, D. & Van den Eede, G. (2008). Method validation and quality management in the flexible scope of accreditation: an example of laboratories testing for genetically modified organisms. *Food Analytical Methods*, 1(2), 61-72.
173. Instituto Nacional de Semillas (INASE). Dirección web: <http://www.inase.org.uy/sitio/Laboratorio/TecnicasMoleculares.aspx>. Acceso 2014
174. Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Dirección web: <http://www.latu.org.uy/>. Acceso 2014

Anexo I. Protocolo modificado de Doyle & Doyle (1987) para extracción de ADN de alimentos de origen vegetal.

1. **Toma de muestra:** Con una pinza esterilizada, tomar aproximadamente 2 gramos del alimento y colocarlos en un mortero limpio para realizar la pulverización con Nitrógeno líquido. Pesar 100 mg del pulverizado y colocarlo en un tubo de 2.2ml.
2. Agregar 1000 uL de *Buffer* de extracción precalentado a 65°C.
3. Mezclar bien: Invertir el tubo varias veces.
4. Incubar a 65°C durante 1 hora. Agitar cada 15 minutos.
5. Desproteínizar con 500 uL de Cloroformo: Octanol (24:1). Mezclar por inversión enérgica durante 5 minutos.
6. Centrifugar 5 minutos a 12.000 *g*.
7. Tomar con cuidado la fase acuosa (superior) y colocarla en un tubo de 2.2 ml.
8. Repetir los pasos 4-6 (re-extracción).
9. Centrifugar 10 minutos a 12000 *g*.
10. Tomar el sobrenadante y transferirlo a otro tubo de 2.2 ml.
11. Agregar 0,8 volúmenes de isopropanol frío (i-PrOH).
12. Invertir el tubo varias (10) veces.
13. Centrifugar durante 5 minutos a 12000 *g*
14. Descartar el sobrenadante con cuidado.
15. Lavar con 1000 uL de EtOH 70%.
16. Centrifugar un minuto a 12000 *g*.
17. Descartar el sobrenadante con cuidado. Secar en vacuosecador rotatorio (Speed Vac).
18. Resuspender en 100 uL de H₂O mQ. Redisolver durante 10 horas en hielo

Composición Buffer Extracción (CTAB)

Tris.HCl	100 mM	pH 8.0
EDTA	50 mM	pH 8.0
NaCl	0.7 M	
CTAB	2%	
β-ME	140 mM	

Anexo II. Electroforesis en gel de poliacrilamida 12% - Tinción con Nitrato de Plata

Electroforesis en gel de acrilamida 12%

1. En un tubo Falcon de 15ml mezclar: 10 ml de acrilamida 12%, 10 μ l de APS (persulfato de amonio) 10% y 10 μ l de TEMED (N,N,N',N' tetrametiletilendiamina).
2. Mezclar suavemente y colocar entre los vidrios de la cubeta de electroforesis vertical. Colocar el peine. Dejar solidificar durante 15 \pm 5 minutos.
3. Retirar el peine, colocar el buffer de corrida TBE y limpiar los pocillos de posibles restos de acrilamida.
4. Preparar las muestras colocando 5 μ l del producto de PCR junto con un 1 μ l de de carga (azul de bromofenol).
5. Cargar las muestras con una micropipeta en el orden de numeración de los tubos. Sembrar un marcador de peso molecular adecuado.
6. Dejar migrar a 100 V hasta que el buffer de carga alcance el extremo inferior del gel.

Revelado con solución de nitrato de plata

7. Desmontar los vidrios de la cuba de electroforesis y pasar los geles a un recipiente de plástico.
8. Cubrir el gel con 200ml de **solución fijadora** y agitar durante 5 minutos.
9. Retirar la solución fijadora y agregar 200ml de **solución de Nitrato de Plata**. Agitar durante 8 minutos.
10. Retirar la solución de plata y enjuagar con abundante agua destilada.
11. Por último, colocar 200ml de **solución reveladora** y agitar hasta que las bandas de ADN resulten visibles.

Solución de acrilamida 12% (100ml):

Acrilamida 30:08	40ml	formaldehído	0,66 mL
Buffer TBE 5X	20ml	H ₂ O mRo c.s.p.	200 mL
H ₂ O mRo	40ml		

Solución de TBE 5X (500ml):

Tris base	27g
Ácido bórico	13.75g
EDTA 0,5 M, pH 8,0	10 ml
H ₂ O mRo c.s.p.	500m

Solución reveladora (200ml):

NaOH	6 g
------	-----

Solución fijadora (200ml):

EtOH 95%	20 mL
AcOH	1mL
H ₂ O mRo c.s.p.	200mL

Solución colorante de plata (200ml):

H ₂ O mRo	200 mL
AgNO ₃	0,45 g

Anexo III. Muestras de alimentos y Materiales de Referencia

Tabla S1. Productos analizados en el estudio de detección, identificación y cuantificación de OGM en alimentos. Se detalla el nombre, el origen, y los ingredientes de cada alimento. *Todos los productos fueron analizados previo a las fechas de expiración. Ninguno de estos declaraba en su etiqueta la presencia de material GM.

N°	PRODUCTO	Industria	INGREDIENTES	Comercializado EN URUGUAY
1	Granos de maíz blanco nativo	México	Granos de maíz cocidos	NO
2	Granos de maíz	México	Granos de maíz cocidos	NO
3	Tortilla de maíz blanco "Tlalpan"	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
4	Tortilla de maíz azul "Juan Angel"	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
5	Tortilla de Maíz Toluca "copro"	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
6	Tortilla de Maíz Toluca "El puente"	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
7	Tortilla de maíz azul "Tlalpan"	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
8	Tortilla de Maíz blanco "Tlalpan"	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
9	Tortilla de Maíz blanco "San Angel"	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
10	Tortilla de maíz "Tortilleria DF"	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
11	Tortilla de maíz Toluca "El 10"	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
12	Cheetos Torcitos queso chile	México	Cereal de maíz, aceite vegetal, condimento, maltodextrina, sal yodada, suero de leche, mezcla de chiles, proteína de leche, mezcla de quesos, saborizantes, colorantes	NO
13	Topitos queso	México	Harina de maíz, aceite vegetal, suero de leche, maltodextrina, sal yodada, harina de trigo, queso deshidratado, tomate, cebolla, mantequilla, saborizantes naturales y artificiales, ajo, especias, colorantes, fosfato de sodio, ácido cítrico, azúcar	NO
14	Fritos de chile y limón	México	Maíz nixtamizado, aceite vegetal, condimento, mezcla de chiles, saborizantes, jugo de limón, colorante, achiote	NO
15	Doritos dipas sweet chili	Francia	maíz, aceite de palma, derivados de leche, harina de trigo, queso en polvo, tomate en polvo, aromatizantes, aceite de girasol, cebolla en polvo, suero de mantequilla en polvo, cloruropotásico, potenciador del sabor, ajo en polvo, dextrosa, ácido cítrico, colorantes especias, azúcar, sal.	NO
16	Tortillas chili	Francia	Maíz molido, aceite de palma, aroma natural, chili y otros aromas naturales	NO
17	3D (conitos de maíz)	Francia	Harina de maíz, aromatizantes, azúcar, sal, glutamato monosódico, harina de trigo, colorantes	NO
18	Tortillas de Maíz	Francia	Harina de maíz, harina de gluten, aceite vegetal, saborizantes, sal, dextrosa, emulsionantes, acidificantes	NO
19	Tortillas de maíz naturales (Tlayudas)	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
20	Tortillas de maíz naturales (Tlayudas)	México	Harina de maíz, agua, sal	NO
21	Doritos recargados	México	Maíz nixtamizado, aceite vegetal, condimento, ácido cítrico, glutamato monosódico, almidón, azúcar, chile, jugo de limón, colorantes, saborizantes	NO

N°	PRODUCTO	Industria	INGREDIENTES	Comercializado EN URUGUAY
22	Crujitos queso y chile	México	Harina de maíz nixtamizado de grano entero, aceite vegetal, azúcar, sal, sólidos de leche, mezcla de chiles, maltodextrina, mezcla de quesos, ácido cítrico, glutamato, mezcla de especias, bicarbonato de sodio, saborizantes	NO
23	Rancheritos	México	Maíz nixtamizado, aceite vegetal, condimento, sal, maltodextrina, azúcar, trigo, almidón, proteína hidrolizada de carne, saborizantes, jugo de limón, achiote, colorantes.	NO
24	Fritos chile y limón	México	Maíz nixtamizado, aceite vegetal, condimento, mezcla de chiles, saborizantes, jugo de limón, colorante, achiote	NO
25	Doritos pizzerolas	México	Maíz nixtamizado, aceite vegetal, condimento, sólidos de leche, sal, maltodextrina, especias, glutamato monosódico, chile, quesos, ácido cítrico, dextrosa, colorantes, achiote.	NO
26	Nachitas (Tortillas Chips)	EE.UU	Maíz, aceite vegetal, fibre vegetal, queso cheddar, sal, mantequilla, polvo de tomate, azúcar, ácido cítrico, ajo, cebolla, colorantes, saborizantes	SI
27	3D barbacoa	Argentina	Harina de maíz, aromatizantes, azúcar, sal, glutamato monosódico, harina de trigo, colorantes	SI
28	Fritos	España	Maíz nixtamizado, aceite vegetal, condimento, mezcla de chile, saborizantes, jugo de limón, colorante, achiote	NO
29	Mix Bugles 3D's	España	Sémola de maíz, aceite de maíz, aroma de queso y bacon leche en polvo, queso en polvo, sustancias aromatizantes, potenciadores del sabor, acidulante (ácido cítrico), colorante, aroma de humo, azúcar, sal	NO
30	Mix Cheetos	España	Sémola de maíz, aceite de maíz, aroma a queso, lactosa , potenciadores del sabor, sustancias aromatizantes, cloruro potásico, proteínas de leche , colorante, pimentón, sal.	NO
31	Mix Doritos	España	Maíz, aceite de palma, condimento con sabor a queso, derivados de leche , harina de trigo , queso en polvo, tomate en polvo, aromatizantes, aceite de girasol, cebolla en polvo, mantequilla en polvo, potenciador del sabor, ajo en polvo, regulador de acidez, colorantes, especias, azúcar, sal	NO
32	Mix cheetos	España	Sémola de maíz, aceite de maíz, aroma a queso, lactosa , potenciadores del sabor, sustancias aromatizantes, cloruro potásico, proteínas de leche , colorante, pimentón, sal.	NO
33	Hojuelas de maíz azucaradas	Alemania	maíz (64%), azúcar, sal, malta de cebada, vitaminas, hierro	SI
34	Hojuelas de maíz	Alemania	maíz, azúcar, sal, malta de cebada, hierro y vitaminas	SI
35	Hojuelas de maíz	Argentina	maíz, azúcar, sal, extracto de malta, monoglicéridos de ácidos grasos, BHT-BHA	SI
36	Hojuelas de maíz con miel	Argentina	maíz, azúcar, jarabe de maíz, miel, sal, extracto de malta, monoglicéridos de ácidos grasos, saborizante artificial y antioxidantes	SI
37	Cornflakes	Brasil	maíz, azúcar, malta, ácido ascórbico, naciamina, hierro, zinc, vitaminas	SI
38	Copos de maíz	Chile	Granos de cereal, harina integral de maíz, semolina de maíz, azúcar, almidón de maíz, jarabe de glucosa, cacao en polvo, aceite de palma, sal, carbonato de calcio, aromatizante	SI
39	Copos con miel	EE.UU	maíz, azúcar, jarabe de maíz, miel, sal, saborizante artificial y antioxidantes extracto de malta	SI
40	Copos frutales	Argentina	Azúcar, harina de trigo (fortificada con hierro y ácido fólico), harina de maíz, harina de arroz, harina de avena, jarabe de glucosa, malto dextrina, sal, emulsionante, aromatizantes colorante, antioxidantes	SI

N°	PRODUCTO	Industria	INGREDIENTES	Comercializado EN URUGUAY
41	Copos de maíz	Argentina	Maíz, azúcar, sal, extracto de malta	SI
42	Copos de maíz azucarados	Argentina	Maíz, azúcar, glucosa, sal, extracto de malta	SI
43	Copos de maíz	Uruguay	Maíz, azúcar, sal, extracto de malta, emulsionante: mono glicéridos de ácidos grasos y antioxidantes	SI
44	Copos de maíz azucarados	Uruguay	Maíz partido pelado, azúcar, extracto de malta, sal, aromatizantes, saborizante natural: caramelo, emulsionante, antioxidante	SI
45	Bolitas dulces de maíz multicolor	Uruguay	Harina de maíz, agua, glucosa, aromatizado artificial tuti fruti, colorantes	SI
46	Copos de avena y miel	Argentina	Harina de avena, harina de maíz, azúcar, harina de arroz, miel, glucosa, almendras trozadas, melaza de caña, leche en polvo descremada, sal, colorante, estabilizante, emulsionante aromatizante	SI
47	Copos con azúcar	Argentina	Maíz, azúcar, sal, malta de cebada, vitaminas	SI
48	Copos sin azúcar	Argentina	Maíz, azúcar y sal	SI
49	Copos de chocolate	Alemania	Azúcar, semolina de maíz, harina de trigo, harina de arroz, cacao desgrasado en polvo, aceite vegetal, dextrosa, fructosa, sal, vitaminas, aroma, hierro.	SI
50	Copos de chocolate	Argentina	Harina de maíz, azúcar, jarabe de glucosa, cacao en polvo, sal, vitamina B3, hierro reducido, óxido de zinc, vitaminas, ácido fólico, saborizante: idéntico al natural chocolate, sabor artificial vainilla, colorantes, emulsionante, estabilizantes y antioxidantes.	SI
51	Copos de maíz tostado	Alemania	Maíz, azúcar, cloruro sódico, extracto de malta de cebada	SI

Tabla S2. Materiales de Referencia Certificados utilizados para la puesta a punto de los métodos de análisis de OGM en alimentos. Se especifica el nombre, el código, y el valor certificado en g/kg de cada uno. * Importados desde el Instituto de Materiales y Medidas de Referencia de la Unión Europea (Geel, Bélgica)

MRC	CODIGO	ORIGEN	DESIGNACIÓN	VALOR Certif. (g/kg)
Bt176 0% GM	ERM-BF411a	IRMM	Bt-176 MAIZE (blank)	< 0.14
Bt176 5% GM	ERM-BF411f	IRMM	Bt-176 MAIZE (level 5)	50.0
Bt11 0% GM	ERM-BF412a	IRMM	Bt-11 MAIZE (blank)	< 0.12
Bt11 5% GM	ERM-BF412f	IRMM	Bt-11 MAIZE (level 5)	48.9
Mon810 0% GM	ERM-BF413ak	IRMM	MON 810 MAIZE (blank)	< 0.9
Mon810 10% GM	ERM-BF413gk	IRMM	MON 810 MAIZE (level 3)	99
GA21 0% GM	ERM-BF414a	IRMM	GA21 MAIZE (blank)	< 0.8
GA21 5% GM	ERM-BF414f	IRMM	GA21 MAIZE (level 5)	42.9
NK603 0% GM	ERM-BF415a	IRMM	NK603 MAIZE (blank)	< 0.4
NK603 5% GM	ERM-BF415f	IRMM	NK603 MAIZE (level 5)	49.1
TC1507 0% GM	ERM-BF418a	IRMM	TC1507 MAIZE (blank)	< 0.5
TC1507 10% GM	ERM-BF418d	IRMM	TC1507 MAIZE (level 5)	98.6

Anexo IV. Curvas de amplificación y Temperaturas de disociación (Tm)

Figura S1. Ejemplo de curvas de amplificación y de disociación (*melting*) obtenidas en el *screening* de OGM mediante qPCR (*SYBR® Green*) en las muestras de alimentos. *Superior*: Curvas obtenidas para la amplificación del promotor *CaMVp35S* (izquierda) y del Terminador *nos* (derecha). *Inferior*: Curvas de disociación correspondientes a los productos de amplificación utilizando los cebadores *CaMVp35S* F/R (izquierda) y los cebadores *t-Nos* F/R (derecha). Para ambos casos se observan picos únicos de Tm, característicos de las secuencias diana (*CaMVp35S* Tm=80±1; *t-Nos* Tm= 73±1)

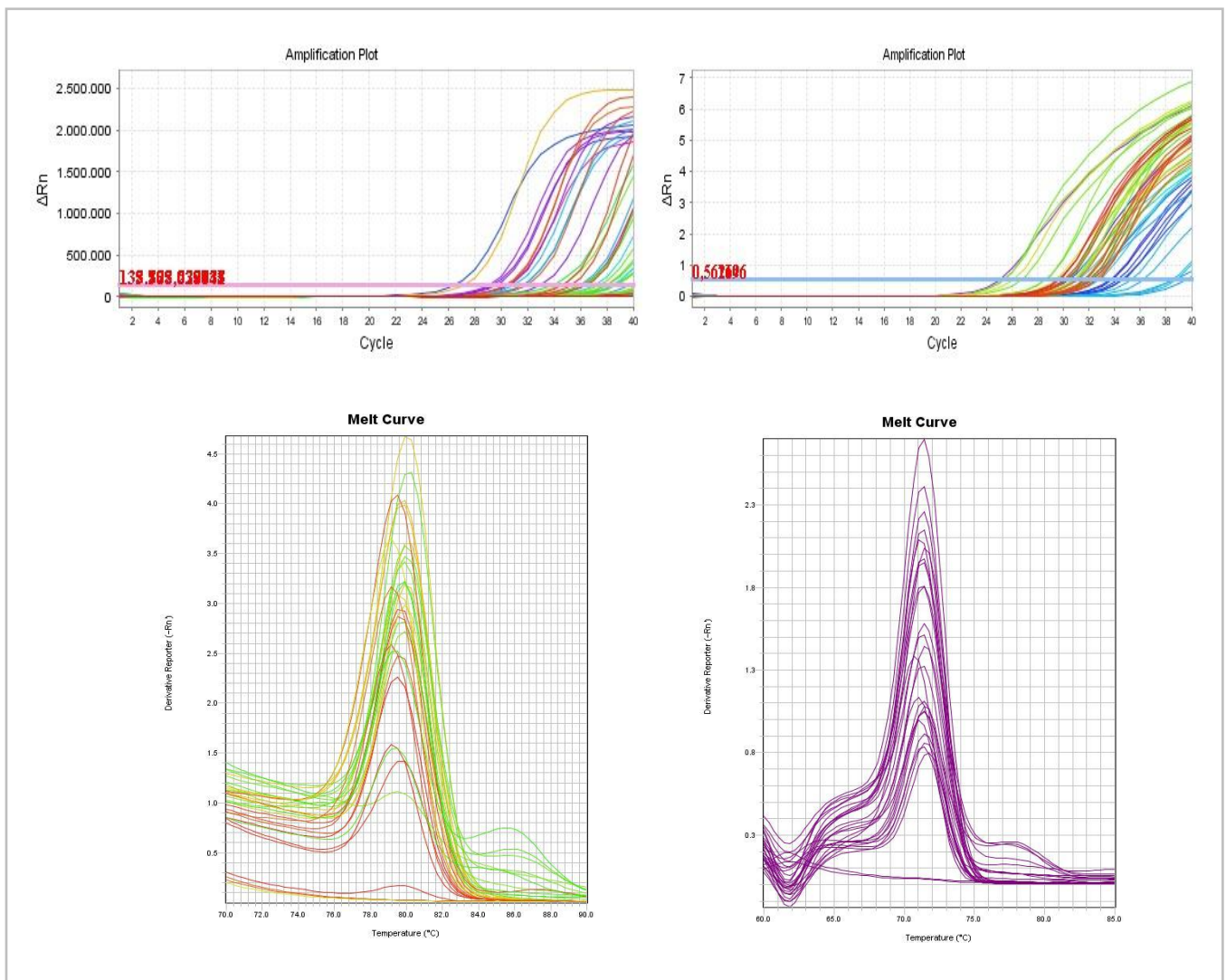


Figura S2. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento MON810. *Izquierda:* Curvas de amplificación (Representación logarítmica). *Derecha:* Curvas de *melting* obtenidas con los cebadores MON810 F/R. Se observa un pico único de T_m , característico de la secuencia diana buscada ($T_m= 79\pm 1$).

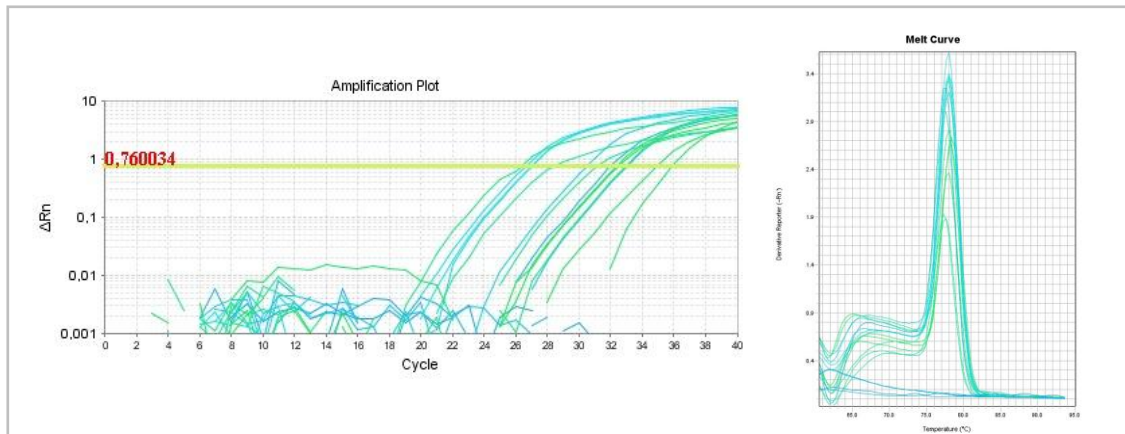


Figura S3. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento Bt11. *Izquierda:* Curvas de amplificación (representación logarítmica). *Derecha:* Curvas de disociación obtenidas con los cebadores Bt11 F/R. Se observa un pico único de T_m , característico de la secuencia diana buscada ($T_m= 72\pm 1$).

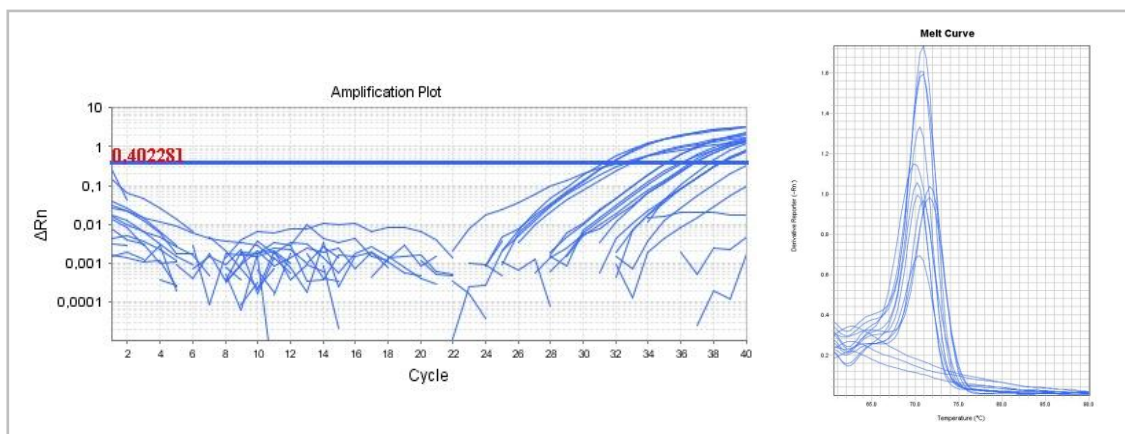


Figura S4. Curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento GA21. *Izquierda:* Curvas de amplificación (representación logarítmica). *Derecha:* Curvas de disociación obtenidas con los cebadores Bt11 F/R. Se observa un pico único de T_m , característico de la secuencia diana buscada ($T_m= 86\pm 1$).

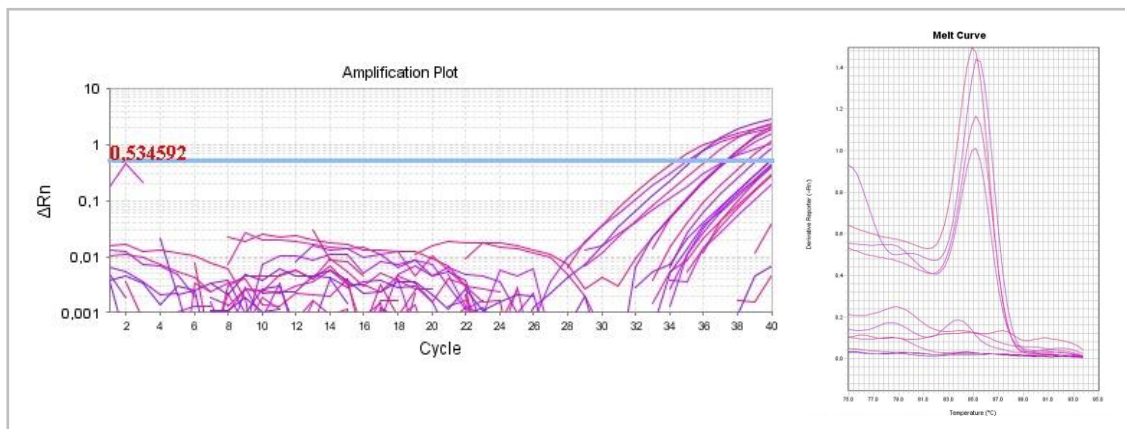


Figura S5. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento TC1507. *Izquierda*: Curvas de amplificación (representación logarítmica). ***Derecha*:** Curvas de disociación obtenidas con los cebadores TC1507 F/R. Se observa un pico único de T_m , característico de la secuencia diana buscada ($T_m = 78 \pm 1$).

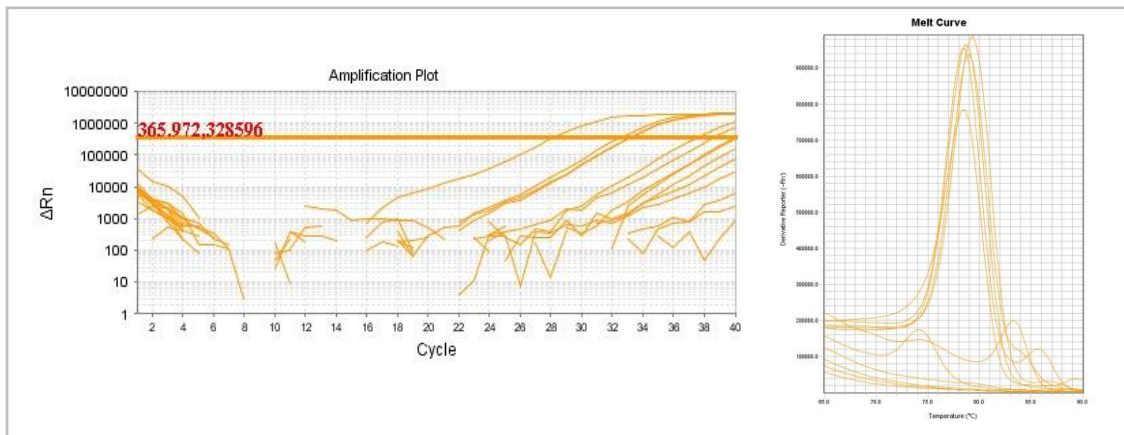


Figura S6. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento Bt176. *Izquierda*: Curvas de amplificación (representación logarítmica). ***Derecha*:** Curvas de disociación obtenidas con los cebadores Bt176 F/R. Se observa amplificación únicamente para el control positivo (MRC), con una T_m característica = 80 ± 1 .

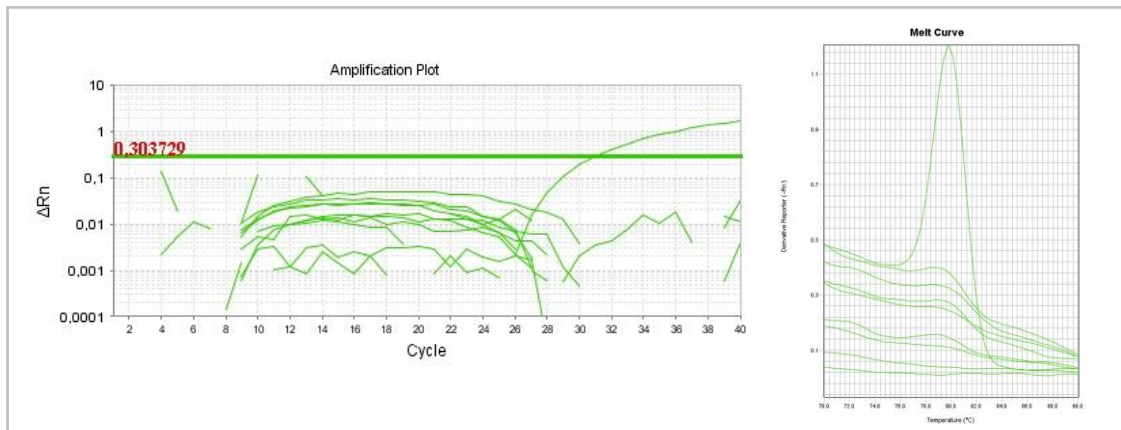


Figura S7. Curvas de calibración obtenidas para la cuantificación de OGM en muestras de alimentos. Se representan las curvas estándar de la amplificación del Promotor 35S (azul) y de la amplificación del gen de referencia *hmgA* (rojo). Las eficiencias calculadas fueron de 94,7% para el gen *hmgA* y 95,5% para el promotor 35S

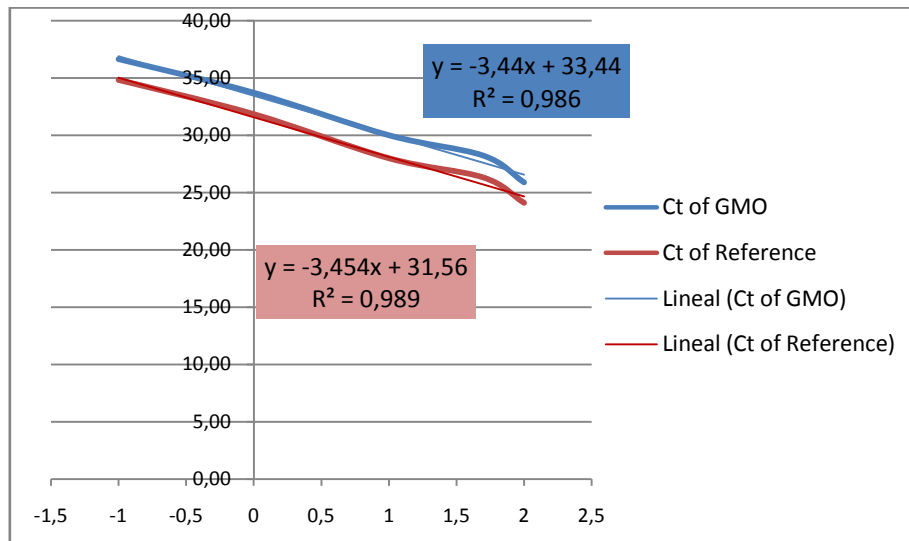


Figura S8. Ejemplo de curvas de amplificación y de disociación obtenidas en el ensayo de cuantificación de OGM en las muestras de alimentos. **Izquierda:** Curvas obtenidas para la amplificación del gen endógeno *hmgA* (*superior*) y para el Promotor 35S (*inferior*). **Derecha:** Curvas de disociación de los productos de amplificación obtenidos con los cebadores HMGA F/R ($T_m = 71 \pm 1$) y los cebadores CaMVp35S F/R ($T_m = 80 \pm 1$).

