



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Ciencia Exactas

***DETECCIÓN DE OGM EN
ALIMENTOS PROCESADOS***

MARÍA LAURA CAZZOLA

**(043.3)
TESIS**

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-4877/79 int. 129

**A mis padres
A mi hermano
A Roberto**

Seguramente hay un rumbo
posiblemente
y de muchas maneras
personal y único

Posiblemente haya un rumbo
seguramente
y de muchas maneras
el mismo para todos

Hay un rumbo seguro
y de alguna manera posible.

...De todas maneras, el mapa nunca es el territorio y habrá que ir
corrigiendo el recorrido cada vez que nuestra propia experiencia encuentre
un error del cartógrafo. Sólo así llegaremos a la cima.

Ojalá que nos encontremos allí
Querrá decir que ustedes han llegado
Querrá decir que lo conseguí también yo...

Jorge Bucay

Rumbo: dirección a la que se ha de gobernar el barco para ir a destino

Jorge R. Dillon

...Ojalá, querido Roberto, coincidamos en el rumbo
Ojalá que nos encontremos allí
Querrá decir que lo hemos logrado...

El presente trabajo de Tesis de Maestría, para optar por el Grado Académico de Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos (Fac. de Ciencias Exactas, Fac. de Ingeniería, Fac. de Ciencias Veterinarias, Fac. de Ciencias Agrarias y Forestales), UNLP; fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos -CIDCA- y en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular –IBBM- bajo la dirección de la Dra. Silvana Petrucelli

Agradecimientos

A Silvana Petruccelli por la dirección del presente trabajo de Tesis de Maestría, para optar por el Grado Académico de Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos (Fac. de Ciencias Exactas, Fac. de Ingeniería, Fac. de Ciencias Veterinarias, Fac. de Ciencias Agrarias y Forestales), UNLP.

A la Dra Cristina Añon por su asesoramiento y la revisión de éste trabajo.

Al Dr Victor Romanowski por abrir las puertas de su laboratorio en forma totalmente desinteresada para la realización de éste trabajo y el apoyo científico.

A Marina Biedma, Agustín Ure y Diego Posik, por el apoyo científico, en el manejo de equipamiento y el aliento recibido día a día.

A la Fundación Bioquímica Argentina, por el soporte brindado que permitió realizar éste trabajo.

Especialmente a:

Mis padres por ser artífices de lo que soy, porque han sido mi guía

Mi hermano Rodolfo, por cuidarme toda la vida, por estar siempre dispuesto aún dejándose de lado, por ser tan bueno

Mi amiga Irene, por su amistad sin restricciones, por escuchar cada una de mis palabras y de mis lágrimas, por estar siempre para dar un consejo y una palabra de aliento

Mi amiga Marisel, por estar siempre de mi lado, sea por la razón que sea

Mi amor Roberto, por su amor dulce y sincero, por los días compartidos, por su aliento

Quiero agradecer a todos ellos, que soportan mis ausencias e igual me quieren tanto, desde distintos lugares, pero tanto...
... y también a los que me lastimaron porque me hicieron fuerte, e hicieron que aprendiera, para poder enseñar a otros.

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. DEFINICIÓN DE BIOTECNOLOGÍA	1
I.2. MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS	2
I.2.1 Transferencia mediada por <i>Agrobacterium</i>	2
I.2.2 Transferencia por bombardeo de partículas	3
I.3. MEJORAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS	5
I.4. TIPOS DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS	6
I.4.1 OGM que mejoran la productividad	6
I.4.2 OGM cuya finalidad es modificar las características de los alimentos	7
I.4.2.1 <i>Remoción y disminución de factores antinutricionales</i>	7
I.4.2.2 <i>Aumento de sustancias promotoras de la salud</i>	8
I.4.2.3 <i>Aumento de vitaminas</i>	8
I.4.2.4 <i>Aumento del contenido de minerales</i>	8
I.4.2.5 <i>Modificación del contenido de ácidos grasos</i>	9
I.4.2.6 <i>Incremento de los niveles proteicos</i>	9
I.4.2.7 <i>Incremento del contenido de almidón</i>	9
I.4.2.8 <i>Productos con características organolépticas mejoradas</i>	9
I.4.2.9 <i>Productos con vida media mejorada</i>	10
I.4.3 OGMs obtenidos para producir moléculas con mayor valor agregado	10
I.5. BIOSEGURIDAD DE LOS OGM	11
I.6. DEBATE SOBRE LA UTILIZACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE NUEVAS ESPECIES	12
I.6.1 Necesidad de alimentar a la población mundial	13
I.6.2 Riesgo para el medio ambiente y la salud humana	13
I.6.2.1 <i>Preocupación por el medio ambiente</i>	13
I.6.2.2 <i>Preocupación por la salud humana</i>	14
1 <i>ADN introducido</i>	14
1-1 <i>Composición, cantidad de ADN recombinante ingerida y procesamiento del mismo</i>	14
1-2 <i>Transferencia de genes en la seguridad alimentaria</i>	15
1-2-1 <i>Degradación y absorción de ADN en el tracto gastrointestinal</i>	15
1-2-2 <i>Transferencia horizontal de genes</i>	16
2 <i>Proteínas codificadas por el ADN introducido</i>	17
2-1 <i>Toxicidad</i>	17
2-2 <i>Alergenicidad</i>	18
2-3 <i>Modificaciones del valor nutricional del alimento</i>	19
3 <i>Modificaciones no intencionales</i>	19
I.6.3 Distribución de los beneficios	20
I.6.4 Manejo de la información	20

I.7 REGULACIONES INTERNACIONALES Y NACIONALES DE LA PRODUCCIÓN Y USO DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS	20
I.7.1 Marcos regulatorios internacionales	21
I.7.1.1 <i>Directivas y regulaciones de la Unión Europea</i>	21
I.7.1.2 <i>Regulaciones en USA</i>	22
I.7.1.3 <i>Acuerdo de la World Trade Organization (WTO)</i>	23
I.7.1.4 <i>Codex Alimentarius</i>	23
I.7.1.5 <i>Protocolo de Cartagena</i>	23
I.7.1.6 <i>Tratado Internacional sobre Recursos en Genética de Plantas para Alimentos y Agricultura</i>	23
I.7.1.7 <i>Comparación de las propuestas de regulaciones de USA y la Unión Europea</i>	24
I.7.2 Marco regulatorio en Argentina	24
I.7.3 Normas propuestas por empresas y organizaciones	25
I.8. DETECCIÓN DE ADN Y PROTEINA DERIVADOS DE LA BIOTECNOLOGÍA	25
I.8.1. Métodos de análisis basados en proteína	26
I.8.2. Métodos de análisis basados en ADN	27
I.8.2.1 <i>PCR cualitativa</i>	28
I.8.2.2 <i>PCR especiales</i>	28
I.8.2.3 <i>PCR cuantitativa</i>	29
I.8.2.3.1 <i>PCR competitiva</i>	29
I.8.2.3.2 <i>PCR en tiempo real</i>	29
I.8.2.4 <i>Desarrollos futuros</i>	29
I.9. CULTIVOS AUTORIZADOS PARA COMERCIALIZACIÓN EN ARGENTINA	30
I.10. OBJETIVOS	31
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. MUESTRAS	32
2. OBTENCIÓN DE AISLADOS DE SOJA	33
3. PRIMERS UTILIZADOS	34
4. MÉTODOS	35
4.1- Métodos utilizados en la extracción de ADN	35
Método 1-1: Método de Dellaporta sin purificación con fenol / cloroformo	35
Método 1-2: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo	36
Método 1-3: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo y agregado de glicerol	36

Método 1-4: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo y lisis alcalina/ precipitación con PEG	36
Método 1-5: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo y previo desgrasado con hexano	36
Método 1-6: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo y agregado de glicerol y RNAsa	37
Método 1-7: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo y lisis alcalina/ precipitación con PEG , con agregado de glicerol	37
Método 2-1: Método de extracción con CTAB	37
Método 2-2: Método de extracción con CTAB con agregado de glicerol	37
Método 2-3: Método de extracción con CTAB, con agregado de glicerol y proteinasa K	38
Método 2-4: Método de extracción con CTAB, con agregado de glicerol,proteínasa K y RNAsa	38
5. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE ADN OBTENIDO	38
Tamaño molecular de los fragmentos de ADN	38
6. CUANTIFICACIÓN DE ADN	38
6.1 Cuantificación espectrofotométrica	38
6.2 Cuantificación por electroforesis en geles de agarosa	39
7. ANÁLISIS DE VARIANZA	39
8. REACCIÓN DE PCR	39
8.1 Mezcla y condiciones de ciclado	39
8.2 Determinación de la linealidad de la PCR	40
8.3 Análisis de alimentos	40
9 EVALUACIÓN DE GELES	40
CAPÍTULO 1: EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN	
1.1 INTODUCCIÓN	42
1.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR	42
1.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN ANALIZADOS	43
1.4 EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN ANALIZADOS	
1.4.1 Tamaño molecular de los fragmentos de ADN	46
1.4.2 Concentración de ADN obtenida por medida espectrofotométrica y pureza medida como relación A260/280.	47
1.4.3 Amplificación del ADN obtenido a partir de granos de soja y maíz	50
1.4.4 Amplificación del ADN obtenido de muestras de alimentos	51
1.5 CONCLUSIONES	53

CAPÍTULO 2: OPTIMIZACION DE LA REACCIÓN DE PCR

2.1 INTRODUCCIÓN	54
2.2 ELECCIÓN DE PRIMERS	54
2.2.1 <i>Tamaño del ADN en los alimentos procesados</i>	54
2.2.2 Características de los eventos de maíz y soja autorizados en la Unión Europea y Argentina	55
2.2.3 Sistemas de PCR propuestos por diferentes entidades y autores	56
2.2.4 Primers elegidos para utilizar en el presente trabajo	59
2.3 AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN DE PCR	64
2.3.1 Optimización de la concentración de Cl_2Mg	64
2.3.2 Optimización de las temperaturas de apareamiento para cada juego de primer	64
2.3.3 Optimización del uso de DMSO, glicerol, BSA y formamida en la mezcla de PCR	69
2.4 ESPECIFICIDAD DE LA REACCIÓN DE PCR	70
2.5 SENSIBILIDAD DE LA REACCIÓN DE PCR	72
2.6 AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE LINEARIDAD DE LA REACCIÓN DE PCR	73
2.7 CONCLUSIONES	87

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE ALIMENTOS

3.1 INTRODUCCIÓN	88
3.2 MODIFICACIÓN DEL ADN EN LAS CONDICIONES DE PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS	89
3.3 CRITERIOS DE ELECCIÓN DE MUESTRAS A ANALIZAR	89
3.4 OBTENCIÓN DE ADN DE LOS ALIMENTOS	91
3.5 AJUSTE DE LA REACCIÓN DE PCR A LA DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA PRESENCIA DE DERIVADOS DE OGM EN ALIMENTOS	91
3.5.1 Ajuste de la cantidad de ADN molde	91
3.5.2 Ajuste de la concentración de magnesio	93
3.5.3 Reacción de PCR optimizada	94
3.6 ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE MAÍZ EN ALIMENTOS	101
3.6.1 Primers especie específicos	101

3.6.2 Screening de la presencia de maíz transgénico	104
3.6.3 Primers específicos de OGM	106
3.7 ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE SOJA EN ALIMENTOS	107
3.7.1 Primers específicos de soja	107
3.7.2 Screening de la presencia de soja transgénica	109
3.7.3 Primers específicos del transgen de soja RR	110
3.8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	112
3.8.1 Cuantificación de OGM en alimentos: limitaciones	112
3.8.2 Análisis semicuantitativo de maíz en alimentos	114
3.8.3 Análisis semicuantitativo de soja en alimentos	116
3.9 CONCLUSIÓN	118
CONCLUSIÓN GENERAL	120
APÉNDICE	122
Características de la soja Roundup Ready®	122
Características de maíz Bt 176	122
Características del maíz MON 810	125
Características del maíz T 25	126
Características del maíz Bt 11	127
Características del algodón MON 1445	128
BIBLIOGRAFÍA	129

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNrec: ADN recombinante

ADN-T: ADN de transferencia

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BSA: albúmina de suero bovino

CBD: Convención sobre Diversidad Biológica

CEN: Comité Europeo de Normalización

Codex: Codex Alimentarius FAO-OMS

CONABIA: Comisión Nacional de Biotecnología Argentina

CTAB: bromuro de cetiltrimetilamonio

DMSO: dimetilsulfóxido

dNTPs: desoxinucleótidostrifosfatos

EPA: Agencia de Protección Ambiental USA

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

FAO: Food and Agricultural Organization

FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos USA

GM: genéticamente modificado

GRAS: generalmente reconocido como seguro

IEC: Unión Internacional Electrotécnica

ILSI: Europe Novel Food Task Force Report on Safety Assessment of Novel Food

IRAM: Instituto de Racionalización Argentino de Materiales

ISO: International Standard Organization

ITU: Unión Internacional de Telecomunicaciones

JRC: Joint Research Center UE

LMOs: organismos vivos modificados

NLS: señales de localización nuclear

NNT: Nordic Working Group on Food Toxicology and Risk Evaluation

NPT II: gen neomicina fosfotransferasa tipoll

OECD: Organization for Economic Cooperation and Development UE

OGM: organismo genéticamente modificado

P/CL: fenol/cloroformo

PCR: reacción de polimerización en cadena

PEG: polietilenglicol

SAGPyA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación Argentina

SCF: Scientific Committee on Foods

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SDS: dodecil sulfato de sodio

TA: temperatura de apareamiento

UE: Unión Europea

USDA: Departamento de Agricultura de Estados Unidos

Vir: proteínas de virulencia

WHO: World Health Organization

WTO: World Trade Organization

INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1 DEFINICIÓN DE BIOTECNOLOGÍA

La biotecnología tradicional se ha desarrollado por millares de años, probablemente desde el principio de la civilización. Desde la domesticación del perro durante el período Mesolítico de la edad de piedra, la crianza selectiva de animales fue una forma de biotecnología. Durante años los mejores animales y plantas se han criado juntas. Cada generación sucesiva ha tenido una mayor probabilidad de tener los rasgos deseables en la planta o animal. Hace cientos de años los organismos que llevaban ácidos nucleicos con la información para los rasgos deseables eran criados. Otra forma de biotecnología que también se ha desarrollado fue el uso de microorganismos en alimentos. Los microorganismos se utilizan para transformar la leche en queso y yogur; o para fabricar cerveza, vino y pan. La biotecnología se puede definir de varias formas, como por ejemplo "es la aplicación de sistemas biológicos y de organismos para la producción de bienes y servicios útiles", también, "cualquier técnica que utilice organismos o parte de organismos para obtener o modificar productos, mejorar plantas o animales o desarrollar microorganismos para usos específicos" (Zaid y col, 1999). Estas definiciones engloban desde avances en biología, genética y bioquímica hasta procesos técnicos e industriales tan diferentes como desarrollo de drogas, cría de peces, forestación, desarrollo de cultivos, fermentación y limpieza de derrames de petróleo (OTA, 1984). Por lo tanto, biotecnología es el nombre que se da a un amplio rango de tecnologías agronómicas, industriales y médicas, que hacen uso de organismos vivos (microorganismos, plantas o animales), o partes de organismos vivos (células aisladas o proteínas) para proveer nuevos productos y servicios.

Los métodos tradicionales utilizados en el mejoramiento de plantas se basan en:

- técnicas de reproducción selectiva: consisten en reservar semillas de las plantas más vigorosas en el medio ambiente, para sembrarlas un tiempo después. Permiten a lo largo de los años, obtener variedades de mayor rendimiento de cultivo, resistencia incrementada a plagas y mayor compatibilidad con los sistemas de producción. Se basan en la diversidad genética sexualmente transmitida desde una población inicial.
- técnicas de reproducción cruzada, interespecie o intergénica: tanto fortuita como intencional, que permiten la recombinación y selección de genes, proveyendo de esta forma, nuevas fuentes de diversidad genética y rasgos deseables. Con estas técnicas se pueden obtener dos resultados: nuevas especies que contienen todos los genes de los múltiples progenitores o especies donde se produce recombinación, manteniéndose un genoma simple en la descendencia, que consiste en copias elegidas al azar de genes de cada una de las especies parentales.
- técnicas de rescate de embriones: recuperan embriones después de la fertilización que no sobrevivirían fuera del laboratorio, colocándolos en un sistema de cultivo tisular *in vitro*, así el embrión desarrolla hasta una planta madura y fértil.
- técnicas que utilizan radiación ionizante y sustancias químicas para inducir mutaciones y expandir el rango de variación disponible.
- técnicas de variación somaclonal: se llevan a cabo en cultivo de tejidos y producen modificaciones genéticas heredables a las progenies de las plantas obtenidas por cultivo *in vitro*

Estas técnicas convencionales son, por su naturaleza, imprecisas, impredecibles, y pueden conducir a cambios deseables pero también a cambios colaterales indeseables, a pesar de la naturaleza no definida de estos cambios (IFT, 2000).

La "biotecnología moderna" o "tecnología de genes", "tecnología del ADN recombinante" o "ingeniería genética", permite seleccionar uno o unos pocos genes individuales para ser transferidos de un organismo a otro, aún entre especies no relacionadas. Mediante esta tecnología es posible clonar fragmentos de ADN dentro de un plásmido bacteriano, el cual se introduce en una célula bacteriana por transformación. Si el ADN recombinante se integra en un sitio del plásmido que contenga las secuencias regulatorias que dirigen su transcripción se produce un ARN mensajero (ARNm) que se traduce a una

proteína. De esta forma se da origen a los organismos denominados genéticamente modificados (OGM), que pueden definirse como organismos en los que el ADN ha sido alterado de una forma que no ocurre naturalmente. Esta nueva tecnología se caracteriza por romper las barreras entre especies, lo que incrementa mucho la diversidad de genes útiles disponibles para mejorar cultivos y microorganismos.

Esta tecnología se ha utilizado desde hace mucho tiempo para producir un gran número de proteínas de utilidad en terapia y diagnóstico. A pesar de ello, el gran debate actual está centrado en la utilización de plantas genéticamente modificadas. No hay cuestionamientos sobre la utilización de insulina u hormona de crecimiento humano obtenidas también por técnicas del ADN recombinante (Robinson, 1999).

I.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Para la obtención de plantas transgénicas existen dos métodos que son los más utilizados para transferir el ADN dentro de la célula vegetal y generar una planta transgénica, que son los que han sido utilizados para generar los cultivos genéticamente modificados aprobados para la comercialización en la Argentina y la Unión Europea. Estos métodos de transformación se pueden clasificar en:

1. Sistemas de transferencia indirecta utilizando *Agrobacterium tumefaciens*
2. Sistemas basados en transferencia directa empleando bombardeo de partículas

I.2.1 Transferencia mediada por *Agrobacterium*

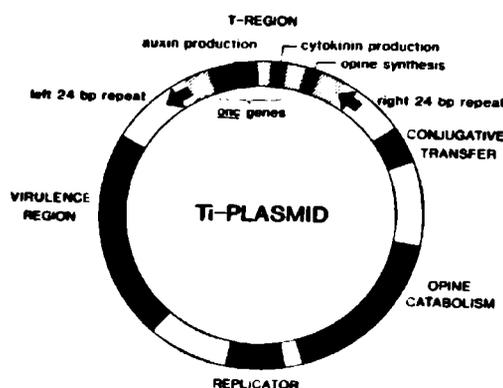


Figura 1: Plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*

En la naturaleza esta bacteria infecta heridas de plantas e induce la formación de tumores o agallas. El mecanismo de inducción del tumor por el *Agrobacterium* incluye la integración de una parte del ADN (ADN de transferencia o ADN-T) de un gran plásmido (plásmido Ti) (figura 1), llevado por la bacteria junto con los genes *vir*, que son necesarios para la producción de proteínas que son esenciales para la transferencia del ADN-T. Las sustancias químicas producidas por las células vegetales dañadas (fenoles y azúcares), activan la expresión de los genes *vir*, que intervienen en el copiado del ADN-T. Este ADN está flanqueado por dos secuencias de 25 bp (bordes derecho e izquierdo) que son reconocidas por estos genes que lo utilizan de

molde para producir una molécula de ADN simple cadena (ADN-T) que se va a transferir a la célula vegetal (figura 2). La bacteria posee también genes que intervienen en la unión de la bacteria a la célula vegetal en la que actúa una proteína que forma un canal, por el que pasa el ADN-T recubierto de proteínas de virulencia (Gelvin, 2003). Entre las proteínas *Vir* se encuentran *Vir D₂* (una endonucleasa que interviene en el corte del plásmido Ti y que se une al extremo 5' del ADN-T), la proteína *Vir E₂*, que posee secuencias que reconocen ADN de simple cadena y señales de localización nuclear (NLS) y que recubre el ADN-T, la proteína *vir B*, que forma un poro en la membrana de la célula vegetal por el cual atraviesa el complejo ADN-*vir D₂*-*vir E₂* e ingresa de esta manera en el citoplasma. Las NLS son reconocidas por una α -importina. En un proceso en el que interviene el citoesqueleto, el complejo es transportado al núcleo (Gelvin, 2003). Una vez dentro del núcleo, el ADN-T se integra al ADN cromosomal de la célula en un sitio al azar, por un mecanismo dependiente de las secuencias de los bordes del ADN-T y de una proteína

modificadora de histonas y cromatina (H2A, codificada por el gen HTA 1) (Mysore y col, 2000). En el proceso de integración se genera la cadena complementaria del ADN-T y se pierden algunas bases en el sitio de integración (Meza y col, 2002; Brunaud y col, 2002).

La transformación con *Agrobacterium* en general se utiliza para transformar dicotiledóneas debido a que las monocotiledóneas son menos sensibles al *Agrobacterium*. Aquellas especies que no son infectadas se denominan recalcitrantes y por distintos métodos se está tratando de hacerlas sensibles: el empleo de distintos métodos que puedan facilitar la penetración de la bacteria (tratamientos con vacío, celulasa, polietilenglicol, etc), la sobreexpresión de genes que intervienen en la unión planta-bacteria, la transferencia al núcleo (genes HTA 1), la integración del ADN-T, etc (Gelvin, 2003). Por este motivo se espera que en el futuro la manipulación de los procesos que tienen lugar sobre o en la célula de la planta incremente la eficiencia de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y permita la extensión de estos métodos a especies recalcitrantes (Gelvin, 2003).

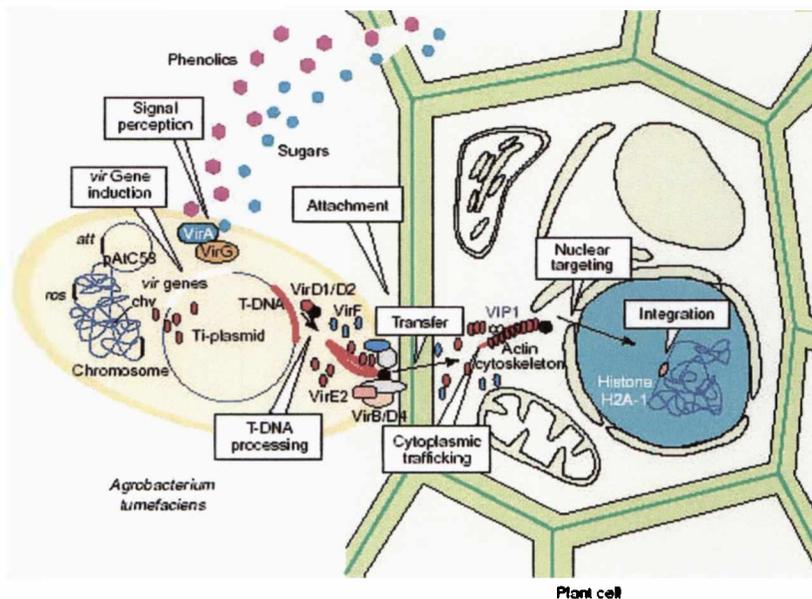


Figura 2: Modelo de transferencia mediada por *Agrobacterium*. Gelvin y col, 2003.

Plant cell: célula vegetal
Phenolics: fenoles
Sugars: azúcares
Signal perception: percepción de señal
Vir-gene induction: inducción de genes vir
Attachment: unión
Transfer: transferencia
T-DNA processing: procesamiento de ADN-T
Nuclear targeting: penetración en el núcleo
Integration: integración

El plásmido Ti ha sido modificado por reemplazo de los oncogenes por *cassettes* que contienen genes de resistencia a antibióticos o tolerancia a herbicidas a ser utilizados en el proceso de selección; y *polylinkers* y/o secuencias promotoras y de terminación de la transcripción donde se inserta el gen que codifica para la característica que se desea introducir. De esta manera se utiliza el *Agrobacterium* como herramienta para modificar cultivos de interés.

El método de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* es ampliamente utilizado en plantas dicotiledóneas como tabaco, tomate, alfalfa, papa, colza, algodón, etc.; también en algunas monocotiledóneas como: arroz y maíz. Tiene la ventaja que el número de copias de ADN-T integradas al genoma de la planta es reducido (1-3) y que no se producen repeticiones en *tandem* como las observadas cuando se emplean métodos directos que generan inestabilidad y silenciamiento génico.

1.2.2 Transferencia por bombardeo de partículas

Otro método es el balístico, el cual usa un cañón para acelerar partículas microscópicas de oro o tungsteno de 1 μm de diámetro, recubiertas con el ADN de interés, lo que permite que este llegue al núcleo de las células donde se integra al ADN genómico por un proceso de recombinación ilegítima.

Las partículas son aceleradas por la liberación de una carga de helio a alta presión, a una velocidad de 430 m/seg (figura 3). El explante se coloca en la línea directa de fuego. Muchas células mueren en este proceso, pero hay una zona concentrada de células donde los proyectiles penetran la célula sin matarla. Una pequeña porción de las partículas penetra no solo en la pared de la célula vegetal, sino también en la membrana nuclear. Como consecuencia del daño causado por el bombardeo se producen rupturas en el ADN cromosomal (en general cortes en ambas cadenas) que activan mecanismos de reparación aleatorios que evitan la muerte celular que se produciría si las lesiones no se repararan. En este proceso de reparación, el ADN plasmídico es unido al azar al ADN cromosomal. Luego del bombardeo, el explante es transferido a un medio de regeneración.

Usando este método, frecuentemente se integran múltiples copias del gen de interés. Dado que la eficiencia del método es baja es necesario seleccionar el tejido transformado utilizando marcadores de selección; por ej. si estos marcadores confieren resistencia a un antibiótico o tolerancia a un herbicida, estos compuestos se agregan al medio de cultivo y tienen un efecto letal en el tejido no transformado.

Este es un método ampliamente usado para monocotiledóneas como maíz, arroz, trigo, cebada, mandioca. También se usa en soja ya que estos cultivos son poco sensibles al *Agrobacterium*.



Figura 3: Cañón para disparar partículas de BioRad y esquema de funcionamiento
 Glass acceleration tube: tubo de aceleración de vidrio, Rupture disk: disco de ruptura,
 Microcarrier launch assembly: ensamblaje del propulsor de las micropartículas, Stopping screen: retentor del disco de ruptura, DNA-coated microcarriers: micropartículas recubiertas de ADN, Target cells: células blanco, Target shell: estante donde se pone la muestra blanco.

El transgen incorporado en el genoma de la planta por cualquiera de los métodos mencionados se integra al azar y con un número no predecible de copias, frecuentemente en forma de repetición, lo que puede influenciar su expresión. El sitio de integración también tiene un profundo efecto en la expresión del transgen, el que es afectado por factores intrínsecos y extrínsecos que pueden impulsar la metilación y reducir la estabilidad de la expresión (Kooter, 1999). Otra desventaja de estos métodos de obtención de

plantas transgénicas es que se requiere del uso de genes marcadores de selección ya que la eficiencia de la transformación de plantas es muy baja (England y col, 1998; Hohn y col, 2001).

Entre estos métodos, la transferencia mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de transformación más sencillo, de menor costo, y el número de copias integradas es más reducido (Gelvin, 2003).

I.3 MEJORAMIENTO DE LOS MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE PLANTAS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Como ya se mencionó anteriormente, si bien la biotecnología moderna tiene mayor precisión en la inserción de genes que la biotecnología convencional, produce inserción de genes en localizaciones al azar y utiliza marcadores de selección. Estos inconvenientes intentan ser mejorados en el futuro.

Los genes marcadores más usados son los que confieren resistencia a antibióticos y tolerancia a herbicidas, pero la presencia de estos genes en los cultivos comerciales ha sido cuestionada porque existe el temor de que los genes de resistencia a antibióticos sean transferidos a bacterias del intestino de humanos y animales y a bacterias del suelo. Por otro lado los genes de tolerancia a herbicidas podrían transferirse a otras especies afines produciéndose supermalezas. En los últimos años se han desarrollado tecnologías que evitan el empleo de estos genes marcadores (Puchta, 2000).

Además, puede ser prudente remover el promotor usado para dirigir el gen de selección, para reducir la chance de silenciar el gen del transgen deseado ligado al mismo promotor (Hohn y col, 2001).

La generación de plantas transgénicas libres de marcadores de resistencia antibiótica es un gran desafío para la ciencia. Dos son las estrategias más importantes para lograr este propósito: cortar o segregar los genes marcadores del genoma hospedador después de la regeneración de plantas transgénicas, y la que está basada en la transformación libre de genes marcadores. Esta estrategia no sólo es efectiva para la generación de plantas transgénicas libres de genes marcadores, sino también tiene gran potencial para mejorar la frecuencia de transformación de especies recalcitrantes (Zuo y col, 2002).

Los métodos que se utilizan para eliminar genes marcadores son:

- Eliminación de genes marcadores por cotransformación

Una forma de separar el gen marcador de selección del transgen de interés es separarlo en el momento de la transformación. Una mejora en el proceso de cotransformación fue introducido por Komari y col (1996) usando plásmidos binarios que contienen dos ADN-T.

- Eliminación de genes marcadores por recombinación sitio-específica

El gen marcador y el transgen son separados por la actividad de una enzima que actúa en sitios específicos de reconocimiento que flanquean el gen marcador a ser removido. Ejemplos de este sistema son el uso de recombinasa Cre del bacteriófago P₁ de *E. coli*, el sistema de recombinación sitio-específico de bacteriófago ϕ C31 de *Streptomyces*, el sistema FLP/FRT de *Saccharomyces cerevisiae* y el sistema R-RS del plásmido pSR1 de *Zygosaccharomyces rouxii* (Hohn y col, 2001).

- Eliminación de genes marcadores por transposasas

Las transposasas, pueden ser utilizadas para la disociación de los genes marcadores y del transgen deseado de dos maneras. En la primera, el gen marcador es puesto en el elemento móvil que se pierde después de la transformación. La segunda posibilidad consiste en la relocalización del gen deseado lejos del locus original del transgen, debido a que es el transgen mismo el que está flanqueado por secuencias específicas requeridas para la transposición (Hohn y col, 2001).

- Selección positiva de plantas transgénicas

Este método emplea una nueva clase de marcadores llamados marcadores de selección positiva (Joersbo y Okkels, 1996). El principio de este sistema es que las células no transformadas no se matan como en el procedimiento que usa genes de resistencia a antibióticos o a herbicidas, sino que estos genes le confieren a las células transformadas ventajas metabólicas o de desarrollo. Esto permite mejorar la eficiencia de regeneración del tejido transformado. Además, este sistema utiliza químicos de selección no tóxicos, en vez de antibióticos y herbicidas. Algunos de los genes de selección positiva utilizados son el gen *uid A* que codifica para la β -glucuronidasa de *E. coli*, gen que codifica para la xilosa isomerasa de *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes*, gen de fosfomanosa isomerasa de *E. coli* y también genes que codifican para enzimas de la síntesis de citoquininas de *Agrobacterium*.

I.4. TIPOS DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

Los primeros vegetales genéticamente modificados aparecieron a mediados de 1980, y los primeros productos fueron liberados para su comercialización 10 años después (Gutterson y Zhang, 2004). Desde entonces más de 100 especies de cultivos han sido modificadas genéticamente (Robinson, 2001), los cuales podrían ser clasificadas como: OGMs que mejoran la productividad, OGMs cuya finalidad es modificar las características de los alimentos y OGMs obtenidos para producir moléculas de mayor valor agregado.

I.4.1 OGM que mejoran la productividad

Uno de los incentivos para introducir OGMs que provocan un incremento de la productividad, es que del 20 al 30% de los cultivos convencionales se pierden debido a daños producidos por insectos, nematodos, virus, hongos, bacterias y factores abióticos como la alta concentración salina del suelo, el frío, las sequías, etc.. Por ejemplo, a pesar del uso de agroquímicos, la disminución en el rendimiento de las cosechas para la remolacha azucarera en África está estimada en un 80% (Robinson, 2001). Otras razones para el desarrollo de estos OGMs son la reducción de la utilización de insecticidas de amplio espectro y también el interés en incrementar la producción para cubrir las necesidades derivadas del incremento de la población mundial (Robinson, 2001).

Las reservas de alimentos tienen una vida útil limitada y su producción fluctúa considerablemente de año a año dependiendo del éxito de las cosechas. Un incremento global de la población ha incrementado la demanda de producción de alimentos; en el futuro será necesario alimentar 10 billones de personas (Robinson, 1999). La producción de alimentos ha acompañado el crecimiento poblacional en los últimos años, la revolución verde en los años 1960-1970, triplicó el alimento del mundo como resultado del aumento de variedades de cultivo, utilización de tratamientos con agroquímicos (fertilizantes y pesticidas), uso de irrigación y mecanización (Dyson, 1999). Sin embargo, esto no ha sido suficiente.

La producción total puede ser aumentada intensificando la agricultura en áreas ya cultivadas o aumentando el área de cultivo a las áreas no cultivadas. La primera promete un gran deterioro de la tierra que ya está dañada, y la segunda resultará en una pérdida del ecosistema con la consecuente pérdida de biodiversidad (Robinson, 2001).

En teoría, el uso de cultivos transgénicos puede intensificar la agricultura conservando el medio ambiente (Robinson, 1999), y podría reducir la pobreza y el hambre y promover la equidad en muchos de los países pobres del mundo (Serageldm, 1997; Ortiz, 1998).

Los OGMs cuya finalidad es incrementar la productividad, comúnmente llamados primera generación de vegetales genéticamente modificados, introdujeron mejoras fundamentalmente para el agricultor, aumentando los rendimientos y/o facilitando el manejo de la cosecha; también redujeron los costos de producción, y la exposición de los trabajadores agrícolas a agroquímicos, así mismo disminuyeron el impacto ambiental de fertilizantes y pesticidas y contribuyeron a la eliminación de los mismos de los alimentos. Un análisis del U.S. National Research Council, (2000) demostró una disminución de 5 millones de acres tratados con insecticida químico de 1998 a 1999. Los OGMs de esta categoría son fundamentalmente dos: cultivos tolerantes a herbicidas y resistentes a insectos (maíz, soja y algodón) (Gutterson y Zhang, 2004; Beachy, 1997). Los que se comercializan actualmente expresan genes derivados de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis*, pero también se están usando otros genes con capacidad insecticida en el desarrollo de cultivos OGM que codifican inhibidores de las enzimas digestivas de organismos causantes de daños en cosechas, como proteinasas y amilasas y enzimas que interfieren con el crecimiento de bacterias y hongos.

En los próximos años aparecerá un gran número de plantas capaces de crecer y/o adaptarse a condiciones adversas como el frío, las sequías, los suelos salinos o con alto contenido de iones pesados, etc. (Cheikh y col, 2000; Sinclair y Purcell, 2004; Gutterson y Zhang, 2004).

1.4.2 OGM cuya finalidad es modificar las características de los alimentos

En países pobres todos los días se producen 24000 muertes debida a una dieta deficiente en micronutrientes, proteínas y energía. La suplementación, fortificación, mejoramiento de plantas, diversificación de la dieta y control de enfermedades son intervenciones no suficientemente efectivas para solucionar este problema, ya que las estadísticas muestran, que a pesar de los esfuerzos e inversiones aún existen 500000 niños ciegos por deficiencia en vitamina A y problemas por malnutrición en hierro, zinc y otros micronutrientes en estas zonas del planeta (Potrykus, 2004).

Esta situación y el aumento del conocimiento del rol de los factores dietarios en la salud, ha promovido el diseño de la segunda generación de productos OGM, que tiende a mejorar o alterar la calidad nutricional de los alimentos. Actualmente, no hay disponibles comercialmente OGM modificados para aumentar las cualidades nutricionales. A pesar de esto, muchos están siendo desarrollados (Robinson, 2001). Éstos pueden producir:

- remoción o disminución de factores antinutricionales
- aumento de sustancias promotoras de la salud
- aumento de vitaminas
- aumento del contenido de minerales
- modificación del contenido de ácidos grasos
- incremento en los niveles proteicos
- incremento del contenido de almidón
- productos con características organolépticas mejoradas
- productos con vida media mejorada

1.4.2.1 Remoción y disminución de factores antinutricionales

Muchas plantas poseen factores antinutricionales que interfieren en la digestibilidad y absorción de los nutrientes. Estos factores pueden ser eliminados empleando métodos del ADN recombinante. Distintos ejemplos son el ácido fítico presente en cereales y forrajes, glicoalcaloides como solanina y chaconina en

papa, cianógenos en la mandioca, inhibidores de tripsina y otras proteasas y taninos en leguminosas. El ácido fítico reduce la absorción de hierro, zinc, fósforo y otros minerales en humanos y animales. Se han obtenido soja y trigo genéticamente modificados (GM) que expresan una fitasa que permite mejorar la absorción de fósforo y disminuir su excreción (Brinch-Pedersen, 1999; Denbow y col, 1998). Otro caso es el del maíz con bajo contenido de fitato que produce un aumento en la retención de fósforo (Spencer y col, 2000). Las lectinas presentes en porotos causan riesgos a la salud, por esta razón se está trabajando en la obtención de variedades de cultivos libres de lectinas o con bajo contenido de las mismas (Pew, 2001). Los glicoalcaloides son factores antinutricionales, que en alta proporción causan irritación del tracto gastrointestinal o deterioro del sistema nervioso. Mediante la inserción de un gen antisentido en papa se bloquea la actividad de la enzima UDP-glucosa glucosil transferasa, obteniéndose así menor cantidad del alcaloide (Wood, 1997).

1.4.2.2 Aumento de sustancias promotoras de la salud

Otra posibilidad es aumentar el contenido de componentes que reducen riesgos para la salud, como por ej. fitoquímicos como los glufosinolatos de frutas y vegetales que disminuyen el riesgo de cáncer, especialmente en el tracto gastrointestinal y respiratorio, flavonoides de frutas y vegetales que reducen el efecto de radicales libres, fitoestrógenos presentes en soja que previenen el cáncer en órganos influenciados por hormonas, etc. (Pew, 2001).

1.4.2.3 Aumento de vitaminas

La mala nutrición en micronutrientes afecta a más del 50% de la población del mundo, que vive con menos de 2 U\$S/día y no puede acceder a estos suplementos (Johnson, 1999). Una forma de administrarlos es aumentar el contenido de los mismos en los alimentos mediante la utilización de la biotecnología. El arroz es el principal alimento en muchos países de África, Asia y América Latina, y es deficiente en micronutrientes en particular vitaminas, lo que causa que medio millón de niños se vuelva parcial o totalmente ciego cada año (Conway y Toenniessen, 1999). Las técnicas de mejoramiento convencional no han podido aumentar la concentración de vitamina A en el arroz, en tanto que mediante biotecnología se han introducido tres nuevos genes en el "arroz dorado" con el consiguiente aumento de producción de β -caroteno (precursor de vitamina A) y coloración amarilla de la semilla (Ye y col, 2000).

Las plantas son la fuente primaria de vitamina E, pero contienen bajas concentraciones de la misma. Por ingeniería genética se podría incrementar el contenido de vitamina E de aceites mediante la incorporación del gen de la enzima que convierte γ -tocoferol en α -tocoferol en semillas de soja, canola y maíz (Shintani y Dellapenna, 1998).

1.4.2.4 Aumento del contenido de minerales

La deficiencia de hierro causa anemia en mujeres embarazadas y niños. Unos 400 millones de embarazadas sufren éste problema y son propensas a parir niños de bajo peso o muertos. Además, las anemias han sido identificadas como factor contribuyente del 20% de muertes maternas después del parto en Asia y Africa (Conway y Toenniessen, 1999). Como se mencionó anteriormente, el arroz es deficiente en varios nutrientes esenciales, entre ellos el hierro (Potrykus, 2004; Johnson, 1999). Para resolver este problema se emplearon los genes codificantes para la proteína complejante de hierro (ferritina) y una enzima que mejora la disponibilidad de hierro para obtener plantas transgénicas de arroz, cuyo contenido de hierro fue entre dos a cuatro veces superior al de plantas no-transgénicas (Goto y col, 1999).

1.4.2.5 Modificación del contenido de ácidos grasos

Enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer están asociados al alto consumo de ácidos grasos saturados y *trans* (Pew, 2001). Para disminuir el riesgo de contraer estas enfermedades se tiende a modificar la composición de ácidos grasos de aceites con el objetivo de incrementar el contenido de ácidos grasos insaturados y disminuir la proporción de ácidos grasos saturados (Kridl y Shewmaker, 1996). Por esta razón se están desarrollando una canola GM que produce aceite rico en laurato (Murphy, 1999), canola y soja GM con un incremento de ácido oleico y esteárico (Ursin, 2000), y soja con contenido de ácido linoleico reducido (Protein Technology Inc, 2001b). También con este propósito, se pueden transferir genes que codifican para ácidos grasos nuevos, de plantas no comerciales a semillas de aceite (Thelen y col, 2001).

1.4.2.6 Incremento de los niveles proteicos

Las proteínas son necesarias para alcanzar los requerimientos nutricionales para el crecimiento, mantenimiento de la salud y desarrollo muscular. En las regiones del mundo donde no crecen los cereales, las personas consumen vegetales que contienen almidón para suplementar las calorías, pero éstos contienen menos de 1% de proteínas (Pew, 2001). Por esta razón se han desarrollado plantas con niveles proteicos aumentados y balance de aminoácidos mejorado (Herbers y Sonnewald, 1999), entre ellas papa con 35-45 % más de proteína y con mayores niveles de aminoácidos esenciales (Chakraborty y Datta, 2000), y soja con alto contenido proteico.

También se han desarrollado análogos de péptidos que mejoran la disponibilidad y farmacocinética de los mismos ya que exhiben una inhibición potencial de la presentación del antígeno por el complejo mayor de histocompatibilidad (Falconi y col, 1999).

1.4.2.7 Incremento del contenido de almidón

El almidón se utiliza como agente espesante, agente de volumen y estabilizante en alimentos (Fennema, 1976). Usando biotecnología se puede modificar la cantidad, largo de las cadenas y el grado de polimerización del mismo. Un ejemplo conocido de este tipo de modificación es la papa transgénica, que contiene genes para una enzima de la síntesis de almidón, con la consecuente producción de un 60% más de almidón que en la papa convencional. Esto hace que absorba menos grasa en el proceso de fritura (Pew, 2001). Otro ejemplo de modificación de almidón es la sobreexpresión de tiorredoxina en el endosperma de cebada. Esto aumenta la actividad de la enzima pullulanasa con la consecuente reducción del tiempo requerido para la rotura del almidón en el proceso de germinación de la cebada (Cho y col, 1999).

1.4.2.8 Productos con características organolépticas mejoradas

Las modificaciones en el flavour podrían producir beneficios indirectos en la salud al hacer los productos más atractivos y de esta manera causar un incremento en el consumo de frutas y vegetales. Se pueden obtener frutas y verduras con lipoxigenasas modificadas que aumentan el flavour y el aroma de estos productos (Pew, 2001). También, frutas que tienen modificada la vía enzimática responsable del pardeamiento que se produce al cortarlas. Así se obtienen productos en los que este proceso está retardado o inhibido (Gachet y col, 1999).

1.4.2.9 Productos con vida media mejorada

La maduración de frutas y verduras produce ablandamiento de las mismas, lo que las hace más susceptibles a la acción de hongos y microorganismos. Para evitar o retardar este proceso, se han desarrollado productos GM en los que se ha bloqueado la expresión de algunos genes que intervienen en el ablandamiento, produciendo así una maduración retardada. Pero esto también conduce a un menor desarrollo del flavour y de la producción de azúcar. Este tipo de tecnología fue inicialmente aplicada en el tomate Flav-sarv en el que se retarda la maduración, pero el mismo es caro y no tiene buen gusto. Luego se utilizó en frutillas, cerezas, melones, bananas, papaya, coliflor y brócoli (McBride, 2000). También se ha usado para la obtención de habas que tienen una textura firme, y una cubierta que no se parte, características que son deseables para el envasado de alimentos (Cornis, 2000).

1.4.3 OGMs obtenidos para producir moléculas con mayor valor agregado

La tercera generación de estos productos ha utilizado a las plantas como biorreactores para la producción de vacunas, anticuerpos, hormonas, enzimas, etc., lo cual permitiría un acceso más fácil a éstos productos y una producción más barata de los mismos (Miele, 1997; Giddings y col, 2000; Daniell y col, 2001; Carter y Langridge, 2002; Twyman y col, 2003; Gomord y Faye, 2004). De esta forma se producirán proteínas que en algunos casos serán purificadas, pero en otros se utilizarán directamente como vacunas orales o para inducir tolerancia en el caso de algunas enfermedades autoinmunes (Carter y Langridge, 2002; Gomord y Faye, 2004). Se han desarrollado anticuerpos anti-cáncer, que se expresan en arroz y semillas de trigo que reconocen células cancerígenas de pulmón, de mama o de colon, y pueden ser útiles en el diagnóstico y terapia de estas enfermedades (Stoger y col, 2000). También anticuerpos de simple cadena (ScFV) para tratar *Candida albicans* vaginal (Beninati y col, 2000). Utilizando plantas se ha logrado producir vacunas multicomponentes que, cuando se administran oralmente, inducen una respuesta de las células T-helpers proporcionando una inmunización activa (Walmsley y Amtzen, 2003; Daniell y col, 2001; Fischer y col, 2004)

Otro aspecto en estudio es la eliminación de alérgenos. En este sentido ya se ha producido una soja GM en la que la expresión de la proteína p34 (el alérgeno principal) ha sido bloqueado empleando una construcción antisentido (Herman y col, 2003). La efectividad de la remoción de este alérgeno está actualmente en evaluación.

Las plantas podrían utilizarse en biorremediación y biopreservación a través, de por ejemplo, la eliminación de metales pesados del suelo como cobre, cadmio, cobalto, aluminio, manganeso, níquel, selenio y zinc y otros contaminantes (Guerinot y Salt, 2001). La habilidad de las plantas para acumular metales pesados puede manipularse mediante la introducción de genes que provoquen la secreción de ácidos orgánicos para aumentar la solubilidad del metal, o que produzcan la liberación de aminoácidos que se unan al hierro soluble de suelos o proteínas de transporte que muevan estos minerales del suelo hacia la raíz (Reeves y Baker, 2000; Guerinot y Salt, 2001).

Muchos materiales utilizados en la industria derivan de cultivos, como algodón, goma, madera, papel, seda, aceite de lino, corcho (Somerville y Bonetta, 2001). La biotecnología ofrece un método para modificar las propiedades de estos materiales y para mejorar sus aplicaciones industriales (Pew, 2001). Por ejemplo, se han obtenido plantas productoras de plásticos, de aceites para manufacturar fluidos hidráulicos y de nylon (Grace, 1997), como así también con capacidad de producción de polímeros similares a fibras naturales como la seda (Pew, 2001).

I.5 BIOSEGURIDAD DE LOS OGM

En USA, aquellos productos que tienen una historia de consumo como alimento independientemente de su origen son considerados por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) como seguros y no requieren ningún tipo de evaluación de seguridad. La Argentina tiene en este sentido una regulación equivalente. En estos países, los alimentos reciben la categoría de "GRAS": generalmente reconocido como seguro (Thompson, 2000). A diferencia de lo que ocurre con medicamentos, los alimentos nunca han sido sometidos a ensayos para analizar su toxicidad, a pesar de que muchas plantas o semillas contienen toxinas que podrían provocar perjuicios para la salud en determinadas circunstancias de exposición. Otro aspecto a considerar es que no todos los individuos responden de la misma manera, ya que por ejemplo, algunas personas son alérgicas al maní, leche, productos de mar, etc..

En contraste con los convencionales, los alimentos derivados de la biotecnología moderna se evalúan respecto de su seguridad antes de ser aprobados para consumo. Para establecer si un OGM es seguro, en primer lugar hay que compararlo con el alimento más similar que tenga una historia de uso seguro. Esta propuesta de sentido común, basada en la familiaridad, es el concepto de "equivalencia sustancial" (FAO/WHO, 2000), que ha sido desarrollado a través de contribuciones de organizaciones internacionales independientes con experiencia en este área y a través de grupos de expertos (FAO/WHO: Food and Agricultural Organization / World and Health Organization, OECD: Organization for Economic Cooperation and Development, ILSI: Europe Novel Food Task Force Report on Safety Assessment of Novel Food, SCF: Scientific Committee on Foods, NNT: Nordic Working Group on Food Toxicology and Risk Evaluation). Es un concepto práctico que considera que si el alimento derivado de un organismo modificado genéticamente es equivalente en composición y valor nutricional al alimento obtenido por métodos convencionales, dentro de los límites de las variaciones biológicas, se lo considera seguro.

Establecer cuando un alimento nuevo es o no sustancialmente equivalente requiere una comparación detallada (ver Tabla1) del nuevo alimento con su "contraparte convencional" (alimento o componente del alimento existente más similar).

Tabla 1: Factores a tener en cuenta para establecer la equivalencia sustancial

Caracterización del OGM	
Organismo hospedador y parental	
Clasificación taxonómica	
Relación con otros organismos	
Historia de consumo del alimento	
Presencia de toxinas y/o alérgenos conocidos	
Nutrientes claves asociados con el alimento derivado	
Sustancias bioactivas y factores antinutricionales	
Transgen y ADN asociado	
Identidad y origen del transgen, secuencia del vector, incluyendo el promotor	
Método de transformación	
Función de la/las proteínas expresadas por el ADN insertado	
OGM	
Características fenotípicas comparadas a las del organismo hospedador o parental	
Características del inserto	
Características de comparación para establecer la equivalencia sustancial con la contraparte convencional	
Plantas	Microorganismos
Morfología	Caracterización taxonómica

Crecimiento	Fisiología
Rendimiento	Presencia de plásmidos
Resistencia a enfermedades, etc	Resistencia antibiótica
	Infectividad
	Rango de hospedadores
	Habilidad para colonizar el intestino
Composición del OGM o producto alimenticio	
Nutrientes (macronutrientes y micronutrientes)	
Metabolitos secundarios, incluyendo tóxicos	
Alergenos	

Fuente: FAO/WHO 1996 y 2000

Según los informes de la FAO/WHO de los años 1996 y 2000, debe considerarse además, cualquier procesamiento al que se someta el alimento, la importancia del mismo en la dieta, los nutrientes que intenta reemplazar el alimento nuevo y sus niveles de consumo. El conocimiento de la composición de los alimentos, y el porcentaje de los ingredientes es importante para evaluar qué modificación en la composición, seguridad y valor nutricional resultan de la modificación genética. Dicha composición puede variar ampliamente debido a que son mezclas complejas de ingredientes. También ocurren diferencias importantes en composición entre variedades de un cultivo, aunque éstas también resultan de las condiciones de crecimiento, cosecha y almacenaje del cultivo. Es importante conocer el procesamiento porque éste incrementa la complejidad química de algunos alimentos (por ej. el café) y disminuye la de otros (por ej. el harina). El calentamiento genera invariablemente nuevas sustancias, para algunos productos, el procesamiento de los mismos elimina las diferencias entre alimentos derivados GM y sus contrapartes, aún cuando el cultivo GM y su contraparte convencional puedan no ser sustancialmente equivalentes. Es importante conocer en detalle los macronutrientes y micronutrientes en los alimentos, además de los tóxicos naturales, y algunos aceites esenciales y alcaloides. También el perfil de metabolitos secundarios de las plantas, ya sean tóxicos o no, que frecuentemente son característicos de especies particulares.

1.6 DEBATE SOBRE LA UTILIZACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA PARA LA OBTENCIÓN DE NUEVAS ESPECIES

A pesar de que en USA se considera a los alimentos derivados de la biotecnología equivalentes a los convencionales, el uso de la tecnología del ADN recombinante para producir alimentos e ingredientes alimentarios es en la actualidad un tema de intenso debate. En él se analizan las consecuencias de las nuevas características, los riesgos, beneficios e impactos, y está ligado al aspecto político de la globalización de la producción y comercialización de alimentos y al interés de consumidores, productores y científicos.

Las preocupaciones de los consumidores desencadenaron una discusión sobre la conveniencia del etiquetado de los alimentos GM que permita una elección consciente; pero el etiquetado, como asegura Moises Burachik (Burachik, 2003), transfiere el proceso de decisión desde los organismos del estado hacia el consumidor, con lo que se acepta que aquellos no cumplan con muchas de sus obligaciones y privilegiando el individualismo, dado que una etiqueta no puede ser un sustituto válido de un marco regulatorio sólido, confiable y basado en la ciencia.

Las preguntas básicas que requieren respuesta en este debate son:

- si los OGM son la solución a la necesidad de alimentar a la población mundial
- si representan un riesgo inaceptable para el medio ambiente y la salud humana

- si constituyen una manera de aumentar equitativamente los beneficios de los avances tecnológicos
- si hay un manejo adecuado de la información

1.6.1 Necesidad de alimentar a la población mundial

Como se mencionó anteriormente el uso de cultivos transgénicos puede permitir intensificar la agricultura conservando el medio ambiente (Robinson, 1999), y de esta manera reducir la pobreza y el hambre, y promover la equidad en muchos de los países pobres del mundo (Serageldm, 1997; Ortiz, 1998). Pero el hambre tiene también otras facetas, como las razones que causan la pobreza, la distribución inequitativa del alimento, la sobrepoblación, el deficiente control de la salud, el bajo nivel educacional. Es por esto que muchos autores critican este principio moral de la biotecnología (Levidow y Carr, 1997).

Además, las deficiencias alimentarias se producen en áreas caracterizadas por escasos recursos económicos, con lo cual los agricultores no pueden acceder a semillas transgénicas y es difícil que las compañías contemplen este problema.

1.6.2 Riesgo para el medio ambiente y la salud humana

Según el Dr Moises Burachick, el argumento sobre la posible afectación del medio ambiente y la salud humana está basado en que "como no se puede predecir el futuro, no habría que arriesgarse a jugar con la naturaleza y la salud consumiendo OGMs". Pero los OGMs aprobados para su comercialización son sometidos a una evaluación de riesgos, que toma en cuenta la bioseguridad de la liberación de un OGM o alimento derivado. Esta evaluación es un proceso basado en la ciencia y llega a una conclusión con respecto a la probabilidad de ocurrencia, en el futuro, de efectos no deseados derivados de tal acción; es decir, esta evaluación predice con el mejor conocimiento disponible a la actualidad, cuáles son las consecuencias más probables de la acción. No es una garantía de riesgo cero, pero dice con una cierta certidumbre, qué eventos son más probables que ocurran o que no ocurran como resultado de la acción (Burachick, 2003). Esta evaluación de riesgo incluirá:

- toda la información científica disponible
- una reevaluación si aparece nueva evidencia
- una posible prohibición de la acción si el proceso no puede predecir las consecuencias futuras
- identificación y realización de nuevas investigaciones para eliminar vacíos de información en sistemas complejos y la prohibición de la acción durante el tiempo que tomen las investigaciones.

1.6.2.1 Preocupación por el medio ambiente

Los temas de preocupación incluyen: la probabilidad de que los genes introducidos por ingeniería genética se transfieran a poblaciones silvestres; la persistencia del gen una vez que el OGM ha sido cosechado y la estabilidad del gen. También se teme un mayor uso de sustancias químicas en la agricultura, el efecto potencialmente perjudicial de las mismas sobre los insectos beneficiosos o una inducción de resistencia a estos productos en insectos y la generación potencial de nuevos patógenos vegetales. Las potenciales consecuencias perjudiciales para la biodiversidad vegetal y la vida silvestre, una menor rotación de cultivos, y el posible desplazamiento de genes de resistencia a otros vegetales son temas que también se encuentran bajo discusión (Kling, 1996; Hardon, 1997).

Hay evidencia de que los genes de cultivos transgénicos se pueden esparcir a través del polen (Brookes, 1998; Cavan y col, 1998), pero la biotecnología moderna puede limitar esta polución genética a través de ingeniería de esterilidad en el transgénico, para asegurar una vasta reducción de esparcimiento de genes en el campo y el medio ambiente. También hay preocupación porque pueda resultar en la evolución de nuevos e infectivos virus (Borja y col, 1999; Rubio y col, 1999), y porque la producción de toxinas por ingeniería genética (Bt toxina) pueda llegar a especies no blanco (Concar, 1999).

A pesar de que existen todos estos cuestionamientos en el uso de cultivos transgénicos, hay un obvio conflicto entre los requerimientos humanos y los de la naturaleza, que son la clave del desarrollo de los cultivos transgénicos (Robinson, 1999). La biotecnología aplicada a la agricultura produce y producirá beneficios como el uso de plantas transgénicas con el propósito de mejorar el medio ambiente mediante la incorporación de genes que intervengan en biorremediación o que produzcan tolerancia a estreses bióticos con la consiguiente reducción del uso de pesticidas (Ortiz, 1998). También puede reducir el uso de fertilizantes a través de la fijación de nitrógeno en la planta, disminuyendo, de este modo el impacto que producen los fertilizantes sobre el suelo y su filtración en las napas de agua. También ha provocado un menor uso de herbicidas y agroquímicos ya que la ingeniería genética ofrece un manejo más preciso de las plagas que afectan a los cultivos (Pimentel, 1995; Robinson, 1999), y ha aumentado la disponibilidad de genes con estas finalidades.

Si bien, todas las acciones son potencialmente riesgosas, no ha habido problemas debidos al uso de cultivos transgénicos, comparando con los encontrados como resultado del mejoramiento tradicional de plantas (Scipioni y col, 2004), como por ejemplo el trigo triticale, que contiene genes extraños que no ocasionan daños ambientales ni a los seres humanos.

1.6.2.2 Preocupación por la salud humana

Los consumidores tienen una gran preocupación sobre si la salud humana puede ser afectada adversamente por el consumo de cultivos transgénicos y productos derivados de ellos. Esta inquietud se basa en el pensamiento público de que los alimentos transgénicos pueden ser tóxicos o alergénicos, provocar transferencia de genes y producir cruzamiento lejano (Coghlan y col, 1999; Anon., 1999b; Anon., 1999a). Esta situación y el desarrollo de crisis alimentarias como la enfermedad de la vaca loca, han provocado que cadenas de restaurantes hayan removido los alimentos derivados de organismos genéticamente modificados de sus menús, las escuelas han proscrito estos alimentos (Ward y Hall, 1999) y ha habido un incremento en la demanda de comida orgánica en los supermercados (Clover, 1999).

Para evaluar éstos posibles riesgos, se debe tener en cuenta:

1. El ADN introducido en el OGM
2. La proteína codificada por el ADN introducido
3. Las modificaciones no intencionales

1 ADN introducido

1-1 Composición, cantidad de ADN recombinante ingerida y procesamiento del mismo

Todos los genes están compuestos por nucleótidos que tienen la misma composición química y sólo difieren en el orden en que se presentan las cuatro bases que los componen. La modificación genética empleando métodos de ingeniería genética dejan la estructura química inalterada; por lo que el ADN recombinante (ADNrec) es estructuralmente idéntico a otros ADNs (ILSI, 2001; St, 2001).

Diariamente se ingieren grandes cantidades de genes intactos a partir de una gran variedad de plantas crudas (ej ensaladas), microorganismos (en yoghurt, algunos quesos, alimentos no procesados y bebidas) y de animales (huevos no procesados o escasamente procesados, pescado y carne). La cantidad de ADN y ARN ingeridos en la dieta depende de la clase de alimentos que ingiere el individuo

(Herbel y Montag, 1987; Lassek y Montag, 1990) y de los efectos que tiene el procesamiento en su composición. Una estimación indica que la cantidad de ADN y ARN de la dieta variará en un rango típico de 0,1-1 g/ persona/ día (Doerfler y Schubbert, 1997). El ADN recombinante representa una porción muy pequeña de ese valor, sin que ello afecte el total del material genético incorporado en la dieta que es asimilado de la misma manera.

Además el proceso de modificación genética produce pequeños cambios en la información genética. Generalmente son incorporados uno o dos genes nuevos y el porcentaje de contribución del ADNrec al ADN total del genoma o del cromosoma modificado es muy baja (ILSI, 2001). Teniendo en cuenta estos porcentajes, y el consumo de diferentes cultivos, se ha estimado la ingesta total *per-cápita* de ADNrec de maíz, soja y papa modificados genéticamente en 0,38 μg / día (ILSI, 2001) que representa el 0,0005% del total de ADN y ARN de estos orígenes o fuentes y el 0,00006 % de una toma típica diaria de ADN de 0,6g (ILSI, 2001). También hay que tener en cuenta que el nivel de expresión de los genes recombinantes es muy baja.

La estabilidad del ADN está influenciada por la ; Lipp y *col*, 2005) en el que está contenido (England y *col*, 1998) y el procesamiento de los alimentos, que puede llevar a su degradación parcial o completa, o a la remoción tanto del ADN, como del ADNrec (Klein y *col*, 1998). Todo lo expuesto sugiere que el ADNrec será sujeto a las mismas condiciones que el ADN no recombinante, dando productos comparables debido a su estructura química equivalente. No hay indicio de que la modificación genética altere su estabilidad o digestibilidad, y todo esto indicaría que la presencia de material genético nuevo en alimentos no constituye un riesgo nuevo inherente (Scipioni y *col*, 2004).

1-2 Transferencia de genes en la seguridad alimentaria

Otro factor a tener en cuenta, referido al ADN introducido en el OGM es la evaluación de la transferencia horizontal de genes, para lo que se debe considerar:

- 1 La degradación y absorción de ADN en el tracto gastrointestinal
- 2 La transferencia horizontal de genes de alimentos GM a células de organismos o bacterias del tracto gastrointestinal, en particular, genes de resistencia a antibióticos usados para seleccionar OGMs.

1-2-1 Degradación y absorción de ADN en el tracto gastrointestinal

El tracto gastrointestinal está constantemente expuesto a ADN, y el proceso de digestión se aplica igualmente a ADN y ADNrec. Las nucleoproteínas ingeridas, son convertidas en ácidos nucleicos en el tracto gastrointestinal por acción de enzimas proteolíticas (Carver y Walker, 1995). Estos ácidos nucleicos son degradados por las nucleasas de las células epiteliales del intestino, junto con las polinucleotidasas y las fosfoesterasas intestinales, a una mezcla de mono-, di-, tri-, oligo- y polinucleótidos. Los nucleótidos liberados, son luego hidrolizados a nucleósidos por fosfatasa alcalina y nucleotidasas, y pueden ser fragmentados aún más por nucleosidasas, que liberan purinas y pirimidinas, y azúcares-fosfatos, que son reutilizados en la síntesis de nucleótidos. Por lo tanto, el ADN, los nucleótidos, los nucleósidos y las bases de la dieta son degradados fácilmente en el estómago y el intestino. Así lo indican investigaciones realizadas en ratones, donde el 1-2% de la ingesta oral de ADN de fago M13mp18 persiste transitoriamente, y se encuentran fragmentos de entre 100 y 400 bp (muy raramente fragmentos de más de 1700 bp) en el intestino y en heces de 1 a 7 hs después de la alimentación (Schubbert y *col*, 1997). La región superior del intestino delgado absorbe la mayor cantidad de ADN. Una vez absorbido, la mayor parte de los nucleósidos y las bases son degradados rápidamente dentro del enterocito, y los productos catabólicos como el ácido úrico son excretados en la orina e intestino (Salati y *col*, 1984). No hay razón para suponer que la hidrólisis *in vivo* y la absorción de ADN y ADNrec sea diferente (ILSI, 2001).

1.2.2 Transferencia horizontal de genes

El intestino delgado y el colon son los lugares más importantes para la transferencia de genes, debido a su alta densidad de microorganismos; además, el contacto directo célula-célula, favorece la conjugación, y la transformación natural está favorecida debido a la alta concentración de ADN en la superficie de las células recipientes (Paul, 1992).

A pesar de toda esta evidencia, la probabilidad de que ADN desnudo sea tomado en el tracto gastrointestinal e integrado establemente dentro del genoma de células bacterianas, por cada gen y por cada pasaje a través del tracto gastrointestinal, es baja. Esto se debe a que el ADN es degradado durante el pasaje por el estómago y el íleo. Por esto, es difícil que moléculas de ADN lineales de suficiente tamaño entren en el colon. Además, para que ocurra recombinación, debe haber homología entre el ADN heterólogo y el ADN de las células bacterianas, y para que se produzca perpetuación de la nueva cualidad, ésta debe conferir a cualquier célula transformada una ventaja competitiva (ILSI, 2001).

Para que exista transferencia e integración de genes de plantas a bacterias, se requiere que haya homología significativa entre el ADN nuclear de la planta y el de la bacteria. Además muchas bacterias tienen enzimas de restricción que cortan el ADN extraño, y aún cuando ocurra la integración del ADN en el genoma bacteriano, la expresión del gen introducido no debería ocurrir, debido a las diferencias en las secuencias regulatorias entre organismos eucariotas y procariotas (ILSI, 2001).

Asimismo, la transferencia de ADN de bacterias a células de mamíferos es improbable ya que se sabe que las células de mamíferos han desarrollado distintos mecanismos contra la toma, integración y expresión del ADN extraño:

- degradación y/o excreción del ADN extraño por ADNsas con acción exonucleasas.
- escisión y pérdida del ADN previamente integrado a partir del genoma hospedador.
- inactivación de los genes extraños por metilación secuencia específica (Doerfler, 1991).

Por otra parte, hay evidencias de que el ADN requiere señales de localización nuclear para la penetración en el núcleo de la célula (Zeimienowicz y col, 1999; Saphire y col, 2000; Popov y col, 1998; Collas y Alestrom, 1997; Gorlick y Mattaj, 1996; Gelvin, 2003).

La transferencia de ADN de los alimentos, incluyendo el ADNrec a células de mamíferos, es muy baja debido a que las cadenas del ADN se rompen con el procesamiento de los alimentos, y durante el pasaje a través del tracto gastrointestinal; además, si fragmentos de ADN o ADNrec de alimentos entran en el torrente sanguíneo, los mecanismos de defensa del organismo ayudarán a eliminarlo; así lo indican los estudios de Schubert y col, (1994), que indican la acción de enzimas para degradar el ADN extraño.

Los primeros alimentos derivados de la biotecnología del ADNrec estaban basados en el uso de genes marcadores seleccionables que conferían resistencia a un antibiótico. Tanto el grupo de trabajo organizado por la OMS en 1993 como la FAO/OMS (2000) consensuaron que no hay evidencia de que los marcadores en uso posean un riesgo para la salud de humanos y animales domésticos.

La FDA permite el uso de genes de resistencia a la kanamicina en varios alimentos ya que este ADN no es distinto a otros ADN en su digestibilidad y no plantea un problema de seguridad alimentaria. El gen marcador que da resistencia a la kanamicina es el gen neomicina fosfotransferasa tipoll (NPTII). La proteína NPTII se degrada rápidamente, como otras proteínas dietarias, cuando está sujeta a condiciones que simulan la digestión por mamíferos. También ha sido probada en estudios de toxicología aguda en los que no se ha encontrado evidencia de que esta proteína tenga acción tóxica. Además, la transformación de bacterias intestinales por la resistencia a la kanamicina es despreciable, con un máximo teórico calculado de 1 en 100.000 comparado con la transferencia de resistencia bacteriana (WHO, 1993). Así, los genes marcadores, tales como el gen NPTII, no presentan una preocupación de seguridad alimentaria y no son considerados tóxicos ni alergénicos.

El riesgo de que el uso de genes de resistencia a antibióticos pudiera llevar a una transferencia de resistencia a las bacterias del tracto gastrointestinal es extremadamente pequeño, debido a que se requerirían una serie de eventos, cada uno de los cuales es altamente improbable. Además, si eso ocurriera, sería necesaria una presión de selección por antibiótico para seleccionar cepas resistentes (Salysers, 2000).

Para reducir cualquier peligro potencial, los expertos de la FAO/OMS recomiendan el uso de tecnología sin genes de resistencia a antibióticos y la no incorporación de material genético adicional que no sea necesario para la expresión de la cualidad deseada; además, existen tecnologías para la remoción (incorporación de recombinaciones sitio-específicas) de genes blanco (Zubko, 2000) y también genes marcadores alternativos (Hohn y col, 2001; Zuo y col, 2002; Puchta, 2000; Kumar y Fladung, 2001).

Como consecuencia de todo lo expresado, se puede decir que:

- el ADN y el ADNrec tienen igual composición.
- la posibilidad de transferencia de segmentos de ADNrec desde alimentos producidos por biotecnología es mucho menor que para el ADN de los alimentos convencionales, simplemente porque el ADN nuevo alcanza a menos del 1/250.000 de la cantidad total consumida (FAO/OMS 2000).
- el procesamiento de alimentos y el pasaje a través del tracto gastrointestinal reduce la probabilidad de que genes intactos, capaces de codificar para proteínas extrañas, sean transferidos a la microflora del intestino o células del organismo.
- la transformación de un microorganismo del intestino, célula epitelial de intestino o células madre humanas por el ADN de alimentos, es un evento muy poco probable y aunque la célula de alguna manera incorpore dicho ADN, es muy improbable que este pueda integrarse por la falta de homología.
- las células de mamíferos poseen métodos para destruir el ADN exógeno
- si la incorporación del ADN heterólogo no es estable y heredable, y cualquier consecuencia sobre la seguridad que surja de la transformación, si ella ocurre, será transitoria.
- ocurrirá incorporación estable y heredable del ADN heterólogo en el genoma de la célula recipiente si la transformación ofrece una ventaja selectiva a la misma.

Las técnicas de ADN recombinante permiten introducir a los organismos cambios genéticos que son más predecibles que los introducidos por las técnicas convencionales de mejoramiento. Los factores anteriormente expuestos permiten llevar a la conclusión de que "el ADN de OGMs es tan seguro como cualquier ADN en alimentos" (Jonas y col, 2001; Scipioni y col, 2004).

2 Proteínas codificadas por el ADN introducido

Como ya fue mencionado, debido a que el ADN y el ADNrec tienen la misma estructura química, no hay inquietud acerca del riesgo de este último. Entonces, es la proteína codificada por los genes introducidos la que necesita ser considerada para determinar los riesgos potenciales en términos de toxicidad, alergenicidad o valor nutricional alterado. Por esta razón es deseable limitar la inserción del ADN necesario para introducir la característica deseada, y evitar la inserción de ADN de función desconocida. La tecnología GM permite limitar el tamaño de los genes transferidos para conferir una característica particular. Ésto está en contraste con las técnicas tradicionales de mejoramiento donde largas regiones de ADN no caracterizado (frecuentemente varios órdenes de magnitud más que los transferidos por biotecnología) son transferidos rutinariamente entre especies relacionadas (Hohn y col, 2001; Zuo y col, 2002; Puchta, 2000; Kumar y Fladung, 2001).

Para evaluar los riesgos potenciales de las proteínas se debe tener en cuenta:

- 2-1 la toxicidad
- 2-2 la alergenicidad
- 2-3 la modificación del valor nutricional del alimento.

2-1 Toxicidad

La mayor parte de los alimentos producen o contienen sustancias que pueden resultar tóxicas; aunque en la mayoría se presentan a niveles muy bajos y no representan una amenaza para la salud

humana (Franck-Oberaspach y Keller, 1997; IFBC, 1990). Ejemplos de sustancias tóxicas de los alimentos son: la solanina y la chaconina de la papa, los glucósidos cianogénicos de la mandioca, las habas y los brotes de bambú, las lectinas de leguminosas, los inhibidores de proteasas de soja, las aflatoxinas producidas en los alimentos por contaminación de los mismos con hongos, las aminas aromáticas, altamente mutagénicas y carcinogénicas, formadas en carnes y otros alimentos por el asado, horneado o cocido convencional. Debido a la presencia de tóxicos en los alimentos hay que tomar precauciones para asegurar que éstos no representen un riesgo para la salud, sean tradicionales o derivados de la biotecnología moderna. Para llevar a cabo este proceso hay que tener en cuenta si la proteína codificada por el gen introducido posee homología de secuencia con toxinas conocidas como también si tiene similitud funcional con otras proteínas de la dieta y su digestibilidad. Esto no es sencillo, ya que los alimentos son mezclas complejas de ingredientes y los componentes a evaluar se encuentran en baja proporción; además no existen aún modelos adecuados, por lo cual muy pocos de los alimentos que se consumen se han sometido a evaluaciones de toxicidad.

2-2 Alergenicidad

Ya que la modificación genética incluye la introducción de genes nuevos dentro de la planta y que estos genes producen nuevas proteínas en las variedades mejoradas, la alergenidad potencial de las mismas es uno de los puntos incluidos en el proceso de investigación de seguridad. En general, para evaluar la alergenidad de proteínas se utiliza un árbol de decisión secuencial reportado por la junta de expertos sobre alergenidad de alimentos derivados de la biotecnología de la FAO/WHO, (2000) (figura4). Cada estadio provee certeza incrementada acerca de la posible alergenidad de la proteína. El primer paso incluye la clasificación del origen del material genético, luego se hace un análisis de la similitud de la proteína (homología de secuencia) con alérgenos conocidos. Esta situación es hipotética, ya que sólo muy pocos alérgenos han sido identificados, y, por otro lado, la alergia está muy influida por los hábitos alimentarios de una población. Si existe similitud, entonces la proteína se asume como alérgica; en caso contrario se la analiza por reacción con suero de individuos con sensibilidad conocida al organismo de donde fue tomado el gen codificante para dicha proteína. Ésto también es hipotético porque no existen bancos de sueros. Si la reacción es negativa, es analizada de la misma forma que las proteínas que no provienen de una fuente alérgica y la proteína es considerada no alérgica.

Si no se encuentra homología de secuencia, se analiza la resistencia de la proteína a la digestión con pepsina y su estabilidad térmica. Si la nueva proteína es fácilmente digerida o degradada por cambio de temperatura o de pH será potencialmente menos alérgica.

A pesar del esquema anterior, es difícil predecir la alergenidad de las proteínas debido a que, como ya se mencionó, muy pocos alérgenos han sido identificados, no existen bancos de sueros y el trabajo en modelos animales es laborioso. Por esta razón, la referencia a tomar en cuenta al evaluar alergenidad será el origen de la proteína (FAO, 1995), ya que se sabe que hay alimentos más alérgicos que otros. También se debe tener en cuenta el procesamiento de los alimentos que incluye tratamientos térmicos (cocción, asado) y modificaciones del pH, que puedan llevar a la desnaturalización parcial o completa de las proteínas y los que utilizan fuerzas de corte (como extrusión) (FAO/WHO, 2000), que pueden causar el clivaje de las mismas. De esta manera los epitopes de las proteínas pueden resultar modificados y aún destruidos, con lo que no serán reconocidos por el sistema inmunológico, reduciéndose así la posible capacidad alérgica de la proteína. Además, esta destrucción parcial o total de la proteína hace que no se puedan ejercer sus posibles efectos tóxicos, si los tuviera.

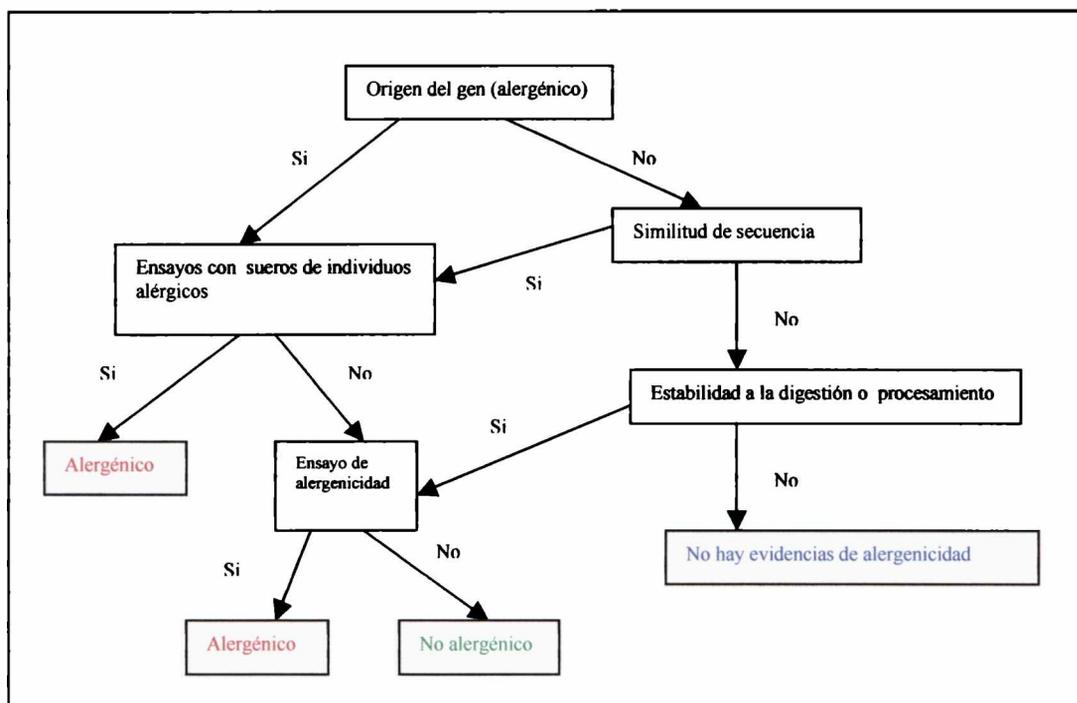


Figura 4: Arbol de decisión para evaluar la alergenicidad de proteínas de la FAO/WHO.

2-3 Modificaciones del valor nutricional del alimento

La modificación genética de un organismo usado en alimentos puede resultar en que la composición final del alimento resulte distinta de la contraparte convencional. Este puede ser el efecto deseado de la modificación (por ejemplo composición alterada de almidón en papas, niveles alterados de nutrientes beneficiosos como antioxidantes en frutas y vegetales, o niveles alterados de ácidos grasos en aceite de semillas oleaginosas), o puede ser no intencional. La evaluación de la seguridad de todos los alimentos GM incluye una consideración de cualquier posible efecto nutricional del nuevo alimento.

El efecto acumulativo de los cambios individuales aún insignificantes en la composición de toda la dieta necesita ser considerada, especialmente para aquellos grupos de población como los infantes cuyas dietas son derivadas de un número limitado de alimentos.

3 Modificaciones no intencionales

Los efectos no deseados de la modificación genética se definen como la expresión no buscada de algún tóxico o factor antinutricional desconocido o no esperado, o la producción aumentada de constituyentes tóxicos conocidos (Royal Society, 1998).

Tanto los métodos tradicionales de mejoramiento genético como los métodos que emplean técnicas de ingeniería genética, tienen una variación no controlada que puede resultar en un cambio no deseado. La inserción aleatoria de un gen puede inactivar o cambiar la expresión de los genes ya presentes o puede activar otro que normalmente es silente (IFT, 2000).

No hay evidencia científica de la ocurrencia de tales efectos no deseados en los alimentos derivados de la biotecnología de ADNrec (Scipioni y *col*, 2004), y en el caso hipotético de que se detectara, ese cultivo no llegaría al mercado. Además debido a la naturaleza más precisa y predecible de los cambios genéticos logrados a través de las técnicas del ADNrec cuando se los compara con los cambios genéticos al azar observados en los cruzamientos convencionales, estos efectos son menos probables. Sumado a ello, debe tenerse en cuenta que efectos no deseados fueron observados pocas

veces en los cruzamientos que se producen en el desarrollo de cultivos convencionales (por ej alta concentración de glicoalcaloides en papa Lenape (Zitnak y Johnston, 1970)).

Para buscar la producción de efectos no intencionales se debe analizar las características fenotípicas del cultivo (morfología, crecimiento, rendimiento), la composición de macro y micronutrientes, la biodisponibilidad, la existencia de toxinas y factores antinutricionales y los perfiles genómicos, proteómicos y metabólicos.

1.6.3 Distribución de los beneficios

Los agricultores en gran escala serán favorecidos por la biotecnología. Sin embargo podrá haber pérdida en los países del tercer mundo, ya que las semillas no pueden ser conservadas al final de un ciclo de cultivo para ser utilizadas en el siguiente. Esto pone a los agricultores en manos de las compañías proveedoras de semillas (Crouch, 1998).

Otra área de debate son los derechos de propiedad intelectual de genes y cultivos transgénicos que impide que la tecnología esté al alcance de todos los que la necesitan.

1.6.4 Manejo de la información

Los argumentos que han surgido en contra de los OGM, como ha dicho Moises Burachick, muchas veces se basan en opiniones que se presentan como hallazgos científicos pero que carecen de prueba de validez. Pero hasta ahora, no existe ningún informe de un incidente de toxicidad, alergenicidad u otra consecuencia indeseable de liberaciones de OGMs o del uso de alimentos derivados de OGM (Scipioni y col, 2004). Solo hay reportes de resistencia a antibióticos, pero ésto se debe a la presión de selección que ocasiona la exposición a los mismos.

Todo lo expuesto sugiere que los OGMs y los alimentos derivados de ellos pueden introducir mejoras en la producción, pero no pueden resolver los problemas de la distribución de la riqueza o la de la inequidad en la distribución de los beneficios. Éstos tienen origen político, y debido a que no existe evidencia científica que avale efectos tóxicos o alergénicos sobre la salud, ni la transferencia de genes de resistencia a antibióticos, la aceptación de la biotecnología y de los alimentos modificados genéticamente dependerá de un cambio en la percepción de los riesgos para la salud humana y el medio ambiente. Ésto dependerá de una comunicación confiable de la información por los científicos, gobiernos, industria y prensa.

1.7 REGULACIONES INTERNACIONALES Y NACIONALES DE LA PRODUCCIÓN Y USO DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS

En la actualidad existe una gran polémica sobre los derechos de los consumidores a saber que consumen y a elegir entre productos OGM y no OGM. Hay dos posturas completamente diferentes, la de la UE, que considera que la mejor forma de proveer la elección al consumidor es el etiquetado de los productos derivados de OGM, y la de USA, que considera que los alimentos derivados de organismos modificados por ingeniería genética no difieren significativamente de los producidos por técnicas de mejoramiento tradicional por lo que no exige el etiquetado de alimentos GM.

Esta situación ha generado un gran número de normas y reglamentaciones que intentan poner orden al debate, es por esto que existen:

- marcos regulatorios internacionales
- marcos regulatorios nacionales
- normas propuestas por empresas y organizaciones

1.7.1 Marcos regulatorios internacionales

Hay seis elementos principales de la regulación internacional relacionadas a la investigación, el comercio y el uso de cultivos GM:

- 7.1.1 Directivas y regulaciones de la Unión Europea y sus policías regionales en agricultura, medio ambiente y OGMs (tabla 2).
- 7.1.2 Regulaciones de USA
- 7.1.3 Acuerdos de la World Trade Organization (WTO), cuyo ánimo es controlar las barreras del comercio internacional. Es dentro de esta estructura que USA y otros estados han contradecido recientemente a la Unión Europea sobre la autorización de cultivos GM.
- 7.1.4 El *Codex Alimentarius*, compuesto por un conjunto de códigos de prácticas internacionales, guías y recomendaciones pertinentes a la seguridad alimentaria.
- 7.1.5 El protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad bajo la Convención sobre Diversidad Biológica (CBD), que es un acuerdo multilateral que alcanza el movimiento a través de las fronteras nacionales de organismos vivos modificados (LMOs) que puedan tener un efecto adverso sobre la diversidad biológica.
- 7.1.6 El tratado Internacional sobre Recursos en Genética de Plantas para Alimentos y Agricultura, que es un acuerdo multilateral relacionado con cualquier material genético de origen vegetal de valor para alimentos y agricultura.

1.7.1.1 Directivas y regulaciones de la Unión Europea

Tabla 2: Disposiciones de las directivas y regulaciones de la Unión Europea

Directiva	Entró en rigor	Contenido
Directiva 90/220/EC	1990	Liberación deliberada en el ambiente de 18 organismos modificados genéticamente, incluyendo variedades de soja, maíz y colza GM, dos de ellas incluyen uso en alimentos de una variedad de soja y otra de maíz habiendo además autorizadas para alimentación animal (una soja, cuatro maíces y tres colzas)
Directiva 90/220/EEC	1998	Prohibición temporaria de siembra de OGM en su territorio si hay evidencia sustancial de riesgo para la salud y el ambiente. Así se declaró la moratoria de 1999. Está vista como una aplicación razonable del principio precautorio pero viola el acuerdo WTO.
Regulación EC 49/2000	Enero de 2000	Establece un umbral mínimo de ADN o proteínas procedentes de OGM autorizados, exigiéndose el etiquetado de los productos alimenticios si la cantidad de ADN se encuentra en un nivel superior al 1% para cada ingrediente individual. En el caso de OGMs no autorizados no existe umbral de tolerancia.
Directiva 2001/18/EC	Octubre de 2001	Introduce: <ul style="list-style-type: none"> - principios de seguridad ambiental - monitoreo post market mandatorio, incluyendo efectos a largo plazo surgidos de la interacción con otros OGMs y el ambiente - información mandatoria al público - requerimiento de los países miembros de asegurar el etiquetado y trazabilidad en todos los estadios de marketing.

		- aprobaciones comerciales para la liberación de OGMs limitadas a un máximo de 10 años.
Regulación 1830/2003/EC	Julio de 2003	- tiene el objeto de controlar y verificar el etiquetado facilitando el monitoreo de efectos potenciales de los OGMs en el ambiente - requiere el etiquetado de todos los alimentos producidos a partir de OGMs. - alimentos y piensos no deben ser etiquetados si la cantidad de material modificado genéticamente está por debajo de 0,9% y si se puede demostrar que su presencia es no intencional y no puede eliminarse técnicamente a pesar de que el criterio primario para etiquetado es la detectabilidad. También, alimentos procesados como los altamente refinados donde no se encuentra material genético del cultivo GM original, deben ser etiquetados. - debe mantenerse la trazabilidad del OGM durante todo el proceso de producción y distribución. - en el caso de variedades no aprobadas por la UE se fija un nivel de tolerancia cero, a menos que hayan recibido una recomendación positiva para su comercialización, siendo en este último caso el nivel de tolerancia 0,5%.
Regulación 1829/2003/EC	Julio de 2003	- los alimentos para animales tienen que seguir los lineamientos de trazabilidad y etiquetado de la regulación anterior - exige de etiquetado mandatorio productos como leche y carne obtenidos de animales alimentados con cultivos GM.

1.7.1.2 Regulaciones en USA

Hay tres agencias gubernamentales que son responsables por la regulación de la biotecnología en USA:

- El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA)
- La Agencia de Protección Ambiental (EPA)
- La Administración de Drogas y Alimentos (FDA)

La FDA es la responsable de la regulación de la seguridad alimentaria, incluyendo la seguridad de nuevas variedades de plantas. En 1992, la FDA se definió sobre el etiquetamiento de alimentos derivados de nuevas variedades de plantas, incluyendo plantas desarrolladas por bioingeniería. No hay requerimientos de etiquetado especiales para alimentos derivados de OGMs, ya que se considera que no difieren de otros alimentos en forma significativa, por lo que tampoco se exige el pedido de autorizaciones diferentes que las pedidas para los alimentos desarrollados por métodos de mejoramiento tradicional de plantas. En algunas situaciones particulares se pide un etiquetado diferencial como por ejemplo:

- Si un alimento derivado de OGM es significativamente diferente de su contraparte tradicional. En este caso, el nombre usual o común no describe adecuadamente al nuevo alimento y debe ser cambiado para describir la diferencia.
- Si existe un problema concerniente al alimento o uno de sus constituyentes, relacionado con su uso, se debe realizar una advertencia en la etiqueta que describa el problema.
- Si un alimento derivado de OGM tiene una propiedad nutricional significativamente diferente, su etiqueta debe reflejar la diferencia.
- Si el alimento nuevo posee genes derivados de especies en las que se han descrito alérgenos, la presencia de derivados de esas especies debe indicarse en la etiqueta para advertir a la población que sea alérgica a dicha especie.

1.7.1.3 Acuerdo de la World Trade Organization (WTO)

El Acuerdo Sanitario y Fitosanitario (SPS) permite a los miembros de la WTO bloquear temporalmente el comercio con el interés de proteger la salud pública, cuando haya evidencias de posibles riesgos en las importaciones. De todas formas estas decisiones deben estar basadas en principios científicos, guías establecidas internacionalmente y procedimientos de aseguramiento de riesgos.

1.7.1.4 Codex Alimentarius

El Codex Alimentarius fue establecido por la Comisión del Codex Alimentarius, un órgano subsidiario de la FAO y de la WHO. Esta Comisión es el cuerpo internacional principal sobre estándares de alimentos representando más del 95% de la población mundial. El principal objetivo del Codex es "guiar y promover la elaboración y establecimiento de definiciones y requerimientos para alimentos, para asistir en su armonización y así facilitar el comercio internacional". Consiste en una colección de estándares de alimentos, guías y otras recomendaciones.

Los estándares para el uso de cultivos GM son:

- principios para los análisis de riesgo de alimentos derivados de la biotecnología
- guías para la conducta del manejo seguro de los alimentos derivados de la tecnología del ADN recombinante de plantas

1.7.1.5 Protocolo de Cartagena

Este protocolo entró en rigor en Setiembre de 2003. Fue firmado por 103 países y al día de hoy ha sido ratificado por 66 países miembros. A pesar de que USA participó en la negociación del protocolo, no es un miembro de la Convención sobre Diversidad Biológica y por lo tanto el protocolo no es aplicable al comercio de USA relacionado a LMOs. Por el contrario la UE ratificó el protocolo el 27 de Agosto de 2002 y en América lo ratificaron 11 países, entre los que no se encuentra Argentina ni Canadá.

Este protocolo rige la transferencia, manejo y uso de organismos vivos modificados por la biotecnología moderna y su objetivo es descartar potenciales conflictos entre las leyes de comercio y el régimen de bioseguridad global. Según este protocolo, antes de exportar LMOs que serán liberados en el medio ambiente, el país recipiente debe ser notificado. La notificación debe incluir una descripción detallada del LMO, adjuntando referencias al aseguramiento de los riesgos existentes reportados. La exportación sólo puede ser realizada después de que el país recipiente dé el consentimiento, y los países decidirán cuando aceptan o no el LMO sobre la base científica disponible, y si ésta es considerada insuficiente, pueden aplicar un principio precautorio y rechazar la importación del LMO.

1.7.1.6 Tratado Internacional sobre Recursos en Genética de Plantas para Alimentos y Agricultura

Fue adoptado por los miembros de la Conferencia de la FAO de 2001, los objetivos del tratado son la conservación y el uso sustentable de las plantas modificadas genéticamente, el reparto limpio y equitativo de los beneficios derivados de sus usos y también la promoción de la agricultura sustentable y de la seguridad alimentaria.

1.7.1.7 Comparación de las propuestas de regulaciones de USA y la Unión Europea

Considerando las diferencias en cuanto a las propuestas de regulación, la más importante es la de etiquetado. En USA, los alimentos derivados de OGMs no se consideran diferentes, *a priori*, de otros alimentos desarrollados a través de otras tecnologías, entonces están sujetos a las mismas legislaciones de seguridad y etiquetado que cualquier otro alimento. Bajo esta legislación, la introducción de un gen de un cultivo a otro, no debería por sí mismo causar una necesidad de evaluación y aprobación antes de que el alimento sea puesto en el mercado, a menos que el gen codifique para un producto que nunca antes haya sido un componente de ningún otro alimento. Si el alimento ha sido modificado de tal forma, que constituye un alimento nuevo, entonces requerirá aprobación.

En USA el etiquetado es legalmente requerido para proveer fundamentalmente información para proteger e instruir al consumidor; mayor información se piensa que crea conflicto, con los derechos del consumidor de elegir en forma conciente, y disminuye la efectividad del etiquetado, ya que si los OGMs no son considerados diferentes de sus contrapartes tradicionales en términos de nutrición, composición y seguridad, el etiquetado como OGM puede ser interpretado como engañoso.

En la UE se ve al etiquetado como una forma de asistir a los consumidores para que hagan una elección con información referente al uso de OGMs o de la presencia de ingredientes derivados de OGMs, así como también presentar los requerimientos de seguridad y nutricionales para el adecuado etiquetado. La pregunta aquí es cómo etiquetar, más que si etiquetar o no.

1.7.2 Marco regulatorio en Argentina

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA) es la institución responsable de la regulación de los OGM en el ámbito agropecuario. La normativa Argentina está basada en las características y riesgos identificados del producto biotecnológico, no en el proceso mediante el cual fue obtenido, y la evaluación para la aprobación se realiza caso por caso y tiene tres etapas previas a su autorización:

1. Evaluación de los riesgos para los agroecosistemas, llevada a cabo por la CONABIA. Es una instancia de consulta y apoyo técnico para asesorar al Secretario de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos en el diseño y administración de la regulación para la introducción y liberación al medio ambiente de OGMs.

La CONABIA evalúa: la capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación, el potencial para la transferencia horizontal o intercambio de genes del OGM con otros organismos, los productos de la expresión de los genes introducidos, la estabilidad fenotípica y genotípica, la patogenicidad para otros organismos, el potencial para producir impactos en el medio ambiente y para producir efectos negativos sobre humanos.

2. Evaluación del material para uso alimentario, humano y animal, llevada a cabo por el SENASA, para asegurar la inocuidad de alimentos con anterioridad a su puesta en el mercado. Éste usa el concepto de equivalencia sustancial, que incluye la comparación entre el alimento obtenido por la biotecnología moderna y su homólogo convencional y asegura que la producción de estos alimentos cuente con controles tras la puesta en el mercado como parte de la estrategia de gestión de riesgos.
3. Dictamen sobre la conveniencia de comercialización, dado por la Dirección Nacional de Mercados Agroalimentarios, mediante el análisis del impacto en los mercados teniendo en cuenta el producto, los países importadores, la participación del producto en nuestras exportaciones y las políticas que tienen los países compradores en relación a los OGMs.

Cuando todos los requisitos se cumplen satisfactoriamente, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos otorga el permiso de comercialización.

I.7.3 Normas propuestas por empresas y organizaciones

La comunidad mundial de normalización es variada y tiene distintos estamentos. En los estamentos basales las normas son específicas y están redactadas por empresas y organizaciones. Estas normas son revisadas a nivel nacional por: el IRAM (Instituto Argentino de Normalización), la ABNT, la UNIT, el INTN; a nivel regional por el CEN (Comité Europeo de Normalización), la AMN, el CENELEC y a nivel internacional por la ISO (Organización Internacional de Estandarización), la IEC (Unión Internacional Electrotécnica) y la ITU (Unión Internacional de Telecomunicaciones), aumentando de esta forma la universalidad y la aplicabilidad de las normas. Todos los estamentos están abarcados por la Comisión del Codex Alimentarius y además existe el Acuerdo de Viena entre el CEN y la ISO.

La ISO está formada por subcomités, uno de ellos es el ISO/TC34, el que cuenta con 587 normas publicadas, conformado por 44 países participantes, 37 países observadores y 81 países vinculados. Su incumbencia es: la normalización en el campo de los productos alimenticios, incluidos los destinados a animales, en particular, la terminología, el muestreo, los métodos de ensayo y análisis, las especificaciones del producto y los requisitos para el empaque, el almacenamiento y el transporte. Se excluyen del alcance los aceites, tratados por el subcomité TC54 y los almidones, tratados por el subcomité TC93. Además el ISO/TC34 tiene distintos grupos de trabajo. Entre ellos el WG7, que trabaja en organismos genéticamente modificados y productos derivados. Este grupo cuenta con 23 países participantes, entre los que se encuentra la Argentina y tiene 7 documentos en estudio; el más avanzado es el documento ISO 21572 sobre detección de OGM y productos derivados mediante métodos basados en proteínas que ya se han establecido como norma.

El IRAM tiene un Comité de Productos Alimenticios con distintos grupos de trabajo, uno de los cuales es el subcomité de productos alimenticios derivados de organismos genéticamente modificados el cual trabaja en las normas del grupo WG7 que se muestran en la tabla 3

Tabla 3: Normas en las que trabaja el subcomité de productos alimenticios derivados de organismos transgénicos

Norma	Nombre de la norma
ISO/DIS 21568. 2	Componentes de alimentos- Detección de OGM y productos derivados- Muestreo
ISO/FDIS 21569	Componentes de alimentos- Detección de OGM y productos derivados- Métodos cuantitativos basados en ácidos nucleicos
ISO/FDIS 21570	Componentes de alimentos- Detección de OGM y productos derivados – Métodos cualitativos basados en ácidos nucleicos.
ISO/FDIS 21571	Componentes de alimentos- Detección de OGM y productos derivados- Extracción de ácidos nucleicos.
ISO 21572	Componentes de alimentos- Detección de OGM y productos derivados- Métodos basados en proteínas
ISO/DIS 21574	Componentes de alimentos- Detección de OGM y productos derivados- Detección específica en semillas oleaginosas
ISO/DIS 21576	Componentes de alimentos- Detección de OGM y productos derivados- Requerimientos generales y definiciones.

I.8 DETECCIÓN DE ADN Y PROTEINA DERIVADOS DE LA BIOTECNOLOGÍA

La presencia de ingredientes derivados de OGMs en productos alimenticios en el mercado fue objeto de un número de regulaciones europeas. Como se mencionó en la sección I-6-1-1, el efecto de estas regulaciones es tal que conlleva a un análisis de todos los aspectos de la cadena alimentaria (Wiseman, 2002).

Si bien en la Argentina no existe una regulación que determine un valor de corte para el etiquetamiento de alimentos que los identifique como OGM, al ser nuestro país productor y exportador de

comóditis OGM y no OGM, y al deber cumplir los requerimientos de los contratos internacionales de exportación, se tiende a trabajar para cumplir con las reglamentaciones europeas, con lo que se debería detectar y cuantificar OGMs en toda la cadena de producción (semilleros, producción, almacenaje, transporte, procesamiento, distribución, etiquetado).

Para este propósito varios métodos han sido desarrollados para detectar productos genéticamente modificados (tabla 4). Éstos incluyen:

- Métodos basados en proteínas que detectan el producto del transgen. La degradación de proteínas de alimentos durante el procesamiento, generalmente desnaturalización por calor, limita el uso de la detección de proteínas derivadas de la biotecnología a los alimentos crudos, y aún en estos casos, dado que la cantidad del transgen es muy baja, será muy difícil detectar la proteína codificada por el mismo.

- Métodos basados en ADN, que detectan el transgen, o los marcadores asociados o las secuencias de ADN regulatorias. La detección se basa en el método específico y altamente sensible Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), que puede identificar y cuantificar la mayor parte de cultivos y alimentos OGM a condición que estos contengan ADN.

Tabla 4: Métodos de detección de productos genéticamente modificados

Parámetro	Métodos basados en proteínas			Métodos basados en ADN			
	Western Blot	ELISA	Tiras de flujo lateral	Southern Blot	PCR cualitativa	PCR cuantitativa competitiva	PCR en tiempo real
Facilidad de uso	Difícil	Moderada	Simple	Difícil	Difícil	Difícil	Difícil
Necesidad de equipamiento especial	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si
Sensibilidad	Alta	Alta	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta
Duración	2 días	30-90 minutos	10 minutos	6 horas	1,5 días	2 días	1 día
Resultados cuantitativos	No	Si	Si	No	No	Si	Si
Prueba aplicable en campo	No	Si	Si	No	No	No	No
Empleo principal	Laboratorio académico	Análisis	Prueba en campo	Laboratorio académico	Análisis	Análisis	Análisis

1.8.1 Métodos de análisis basados en proteínas

Según Ahmed, (2002) y Brett, (1999) la tecnología del inmunoensayo con anticuerpos se puede utilizar para la detección cualitativa y cuantitativa de muchos tipos de proteínas en matrices complejas cuando se conoce el analito blanco. Esto no siempre es así, ya que depende de si la proteína se puede extraer de la matriz y del epítipo que reconozca el anticuerpo, ya que si no reconoce la proteína desnaturalizada no se podrá usar este método, debido a que en la mayor parte de las matrices alimentarias las proteínas están dañadas por el procesamiento. Se pueden usar anticuerpos monoclonales (altamente específicos) y policlonales, dependiendo de la cantidad que se necesite, de la especificidad del sistema de detección (ej: anticuerpos contra proteína entera o específicos de una secuencia peptídica), de la aplicación particular, del tiempo destinado al análisis y de su costo. Basado en la concentración típica de material transgénico en tejido de plantas (más de 10 ug por tejido), el límite de detección del inmunoensayo para proteína puede predecir la presencia de proteína modificada en el rango de 1% de OGM (Stave, 1999).

En la evaluación de material GM mediante la detección de proteínas deben considerarse una serie de factores que pueden alterar el resultado o la sensibilidad del ensayo, debido a que la cantidad de la proteína total o de la proteína específica a detectar varía de acuerdo con las condiciones ambientales o con la parte de la planta analizada. También, las proteínas se desnaturalizan con los tratamientos que se realizan en los granos y sus subproductos, disminuyendo así el reconocimiento por los anticuerpos específicos.

Los límites de detección de los métodos basados en proteínas se presentan en la tabla 5.

Tabla 5: Métodos de análisis basados en proteínas

Método	Límite de detección
Western Blot	0,25% semillas 1% harina *
ELISA	0,25% semilla ProtCP4 1,4% harina EPSPS *
Tiras de flujo lateral	0,5-2% OGM (Bt176 y Mon810) 0,1-0,3% OGM (soja RR) •

*Ahmed, (2002) • Tozzini,(2004)

1.8.2 Métodos de análisis basados en ADN

Los métodos de detección de ADN se basan en la complementariedad de dos cadenas de ADN. El ADN que ha sido introducido en un cultivo consiste, como se mencionó anteriormente, en el gen codificante y varios elementos que gobiernan su funcionamiento. Éstos son: una secuencia promotora, y una secuencia de terminación de la transcripción.

Las ventajas de emplear métodos basados en la detección de ADN en relación al empleo de métodos basados en proteínas, son fundamentalmente su mayor estabilidad frente a los tratamientos físico-químicos y su mayor sensibilidad (Lipp y col, 2005). Por este motivo las técnicas más usadas son Southern Blot y PCR (Sambrook y col, 1989; Ahmed, 1995). Las tecnologías basadas en *microarrays* para la detección de la expresión del gen están en desarrollo (Hertzberg, 2001).

Para realizar la amplificación de un fragmento de ADN es necesario diseñar primers que se apareen a la zona de interés. Existen primers específicos de especie, primers que se utilizan como screening de OGM y los que son específicos del transgen (Miraglia y col, 2004).

El tamaño del amplicón debe ser seleccionado de forma de igualar el rango de pesos moleculares disponibles en la muestra bajo estudio. En alimentos procesados, donde el ADN está degradado, el tamaño del amplicón deberá estar idealmente en el rango de 60 a 150 bp, y para materiales crudos se puede usar un rango de amplicones de hasta 250 bp. El tamaño del amplicón debe ser validado para cada sistema de PCR, (Lipp y col, 2005) y par de primers. También se puede utilizar el recomendado por un método que ya ha sido validado (ISO 21569, 2002).

Cada sistema de PCR tiene su eficiencia, especificidad y capacidad de detección. Existen distintos sistemas de PCR:

- Cualitativa
- Especiales
- Cuantitativa

1.8.2.1 PCR cualitativa

La PCR cualitativa permite evaluar la presencia de la secuencia de ácido nucleico bajo estudio (ISO 21569, 2002). También es posible dosar semicuantitativamente un determinado ADN blanco, si se asegura que la cantidad de producto amplificado en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN inicial.

La PCR se basa en la especificidad de la ADN polimerasa para copiar de manera específica una secuencia de ADN específico que se encuentran en una mezcla compleja (Ahmed, 1995). Se utilizan dos primers (sentido y antisentido), los que están diseñados para aparearse con la secuencia de interés y mediante una serie de ciclos térmicos repetitivos se amplifica la secuencia comprendida entre primers.

Muchos componentes presentes en alimentos (proteínas, lípidos, polisacáridos, polifenoles extractos de cacao y azúcar caramelizada) pueden inhibir la reacción (Gasch y col, 1997).

Para esta técnica, Meyer R., (1999) sugiere que el tamaño promedio mínimo de ADN necesario para el éxito del análisis de PCR es 400 bp.

Existen publicados en la bibliografía una gran cantidad de trabajos sobre reacciones de PCR para detectar un gen de interés en una determinada matriz (Lipp y col, 2005). Cada uno de estos sistemas tiene un límite de detección. A pesar de esto, Yates K., (1999) ha publicado que los métodos cualitativos de PCR pueden detectar ADN blanco en un rango de 20 pg a 10 ng y de 0,0001a 1% de OGMs, lo que permite realizar análisis de alimentos con la sensibilidad adecuada para cumplir con las regulaciones internacionales vigentes. Además, para llevar a cabo este tipo de PCR no es necesario disponer de equipamiento excesivamente costoso.

Una desventaja de la PCR cualitativa es que utiliza un alto número de copias, lo que ocasiona que puedan obtenerse resultados falso-positivos (Wurz, 1999).

Al realizar una PCR pueden aparecer algunos problemas como:

- que el producto no se detecte o que el rendimiento sea bajo.
- la presencia de bandas no específicas debido al pegado inespecífico o la extensión errónea de los primers.
- la formación de dímeros de primers que compiten con el producto deseado por la amplificación.
- mutaciones y heterogeneidad debidas a la incorporación errónea.

Para resolver los problemas anteriores y así optimizar el rendimiento de la reacción se debe tener en cuenta distintos factores cuya optimización será presentada en este trabajo.

1.8.2.2 PCR especiales

Las PCRs especiales han sido desarrolladas para aplicaciones específicas; son ejemplos la Nested PCR en la que se pueden utilizar juegos de primers que encajan unos dentro de otros para mejorar el rendimiento de la secuencia de ADN blanco (van Duijn, 1999). Así, el primer fragmento largo producido en la primera ronda de PCR se usa como templado en la segunda PCR. En ésta está aumentada la sensibilidad, y en especial la especificidad, ya que se elimina cualquier producto de amplificación no específico, debido a que es improbable que los productos no específicos de la primera PCR sean suficientemente complementarios como para servir de molde en la segunda.

La sensibilidad de este tipo de PCR depende de los reactivos utilizados en la reacción. Existen publicados sistemas que detectan hasta 50 pg de ADN blanco.

Otro ejemplo es la multiplex PCR que usa múltiples pares de primers para amplificar varias secuencias simultáneamente, utilizando menos tiempo. La presencia de varios pares de primers en el mismo tubo puede causar varios problemas, como el aumento de productos de PCR no específicos, dímeros de primers y la amplificación discriminada de fragmentos de ADN largos (Innis y col, 1990; Sambrook y col, 1989). Existen publicados distintos sistemas de multiplex PCR. Cada uno tiene su sensibilidad, pero en general trabajan en un rango de 50 a 150 ng de ADN molde (Germini y col, 2004; Permingeat y col, 2002).

1.8.2.3 PCR cuantitativa

La mayor desventaja del sistema de PCR cualitativa, es la dificultad para producir suficiente amplicón para su visualización por coloración en gel de agarosa. Para ello, frecuentemente hay que realizar más de 35 ciclos de amplificación, con lo que la velocidad de reacción deja de ser exponencial, y por lo tanto el método no puede utilizarse para cuantificar. Para superar este problema se desarrollaron dos métodos diferentes, PCR competitiva-cuantitativa (Wurz y *col*, 1999) y PCR en tiempo real (Vaitilingom, 1999), que establecen una relación entre la concentración de ADN blanco y la concentración de producto de PCR generado por amplificación.

1.8.2.3.1 PCR competitiva

La PCR competitiva obvia los problemas mencionados y permite la cuantificación precisa de ADN mediante la co-amplificación de una cantidad conocida de un molde competitivo (estándar interno), que usa el mismo primer que los que usa el ADN blanco, pero que puede ser distinguido del ADN blanco después de la amplificación (Innis y *col*, 1990).

El amplicón que se produce a partir del estándar interno es 20-25 bp mayor o menor que el producido a partir del ADN blanco, haciendo que se puedan diferenciar por electroforesis. (Wiseman, 2002).

Existe dos tipos diferentes de PCR competitiva. La PCR simple competitiva, en la que se produce un par simple de amplicones y se utiliza un ADN estándar interno que se co-amplifica con el ADN blanco. En estos sistemas la presencia de inhibidores afectará tanto al ADN blanco como al estándar interno. En el punto de equivalencia la concentración inicial de estándar interno y blanco es igual. Este método se puede utilizar como análisis cuantitativo haciendo que el punto de equivalencia entre los dos amplicones representen un 1% del contenido de OGM. La PCR doble competitiva es un proceso que se lleva a cabo en dos pasos y toma en cuenta la fragmentación y la amplificación del ADN. Se realiza un primer análisis de la cantidad de ADN especie específico amplificable que se encuentra en la muestra. Luego el ADN a ser analizado es diluido de forma de alcanzar la concentración del gen de especie específico del competidor, y posteriormente se practica una segunda reacción de PCR competitiva para detectar la modificación en cuestión.

8.2.3.2 PCR en tiempo real

Hay una variedad de métodos de PCR en tiempo real y todos monitorean la producción de los amplicones específicos ciclo por ciclo, permitiendo la detección de los productos de amplificación por acoplamiento de colorantes fluorescentes. El ADN blanco se cuantifica midiendo el incremento de fluorescencia durante la PCR, que es proporcional al incremento del número de fragmentos generados durante el proceso. Registrando la cantidad de fluorescencia emitida en cada ciclo es posible monitorear la reacción en su fase exponencial. El primer incremento significativo de fluorescencia se correlaciona con la cantidad inicial de templado blanco (Ahmed, 2002; Miraglia y *col*, 2004).

La sensibilidad de esta PCR depende de los primers, del ADN blanco y de la mezcla de PCR que se utiliza. La bibliografía sugiere que pueden detectarse hasta 2 pg de ADN blanco (Ahmed, 1995; Vaitilingom y *col*, 1999).

La especificidad de la PCR en tiempo real depende del reactivo utilizado para generar y monitorear la reacción de amplificación y del instrumento usado para detectar la señal. Se han usado distintos reactivos para este propósito: agentes intercaladores (bromuro de etidio, SYBR Green I) y sondas de hibridación (sonda Taq Man, sondas de transferencia de energía resonante fluorescente, beacon molecular, escorpiones y sondas Taq Man Minor Groove Binder).

1.8.2.4 Desarrollos futuros

Debido a que las regulaciones se tornan cada vez más estrictas, es necesario desarrollar métodos de screening y de detección más poderosos. Una de las técnicas desarrolladas es la tecnología

microarray que está basada en el principio de hibridación e involucra la inmovilización de sondas (oligonucleótidos) en una superficie en formato *array* que se hibridiza con la muestra. De ésta forma pueden analizarse muchas variedades de OGM en un sólo análisis y sirve para la detección, la identificación y la cuantificación (Kok y col, 2002; Miraglia y col, 2004).

I.9 CULTIVOS AUTORIZADOS PARA LA COMERCIALIZACIÓN EN LA ARGENTINA

Los cultivos que han sido aprobados para la comercialización en la Argentina se presentan en la tabla 6: soja 40-3-2, maíz Bt 176, maíz T25, algodón MON531, maíz MON810, algodón MON1445, maíz Bt11. En consecuencia es esperable que ellos aparezcan como componentes en distintos alimentos.

Tabla 6: Cultivos con permiso de comercialización en Argentina

Especies	Característica introducida	Evento de transformación	Solicitante	Resolución
Soja	Tolerancia a glifosato	"40-3-2"	Nidera S.A.	SAGPyA Nº 167 (25-03-96)
Maíz	Resistencia a lepidopteros	"176"	Ciba-Geigy	SAGPyA Nº 19 (16-01-98)
Maíz	Tolerancia a glufocinato de amonio	"T25"	AgrEvo S.A.	SAGPyA Nº 372 (23-06-98)
Algodón	Resistencia a lepidopteros	"NON531"	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA Nº 428 (16-07-98)
Maíz	Resistencia a lepidopteros	"MON810"	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA Nº 429 (16-07-98)
Algodón	Tolerancia a glifosato	"MON1445"	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA Nº 32 (25-04-01)
Maíz	Resistencia a lepidopteros	"Bt11"	Novartis Argentina S.A.	SAGPyA Nº 392 (27-07-01)
Maíz	Tolerancia a glifosato	NK 603	Monsanto Argentina S.A.I.C.	SAGPyA Nº 640 (13-07-04)

CONABIA. SAGPyA (2004)

OBJETIVOS

OBJETIVOS

En virtud del intenso debate existente sobre la utilización de OGMs, la obligatoriedad de su etiquetamiento y la aparición de reglamentaciones internacionales cada vez más estrictas en la cuantificación de los mismos, el objetivo general de este trabajo es desarrollar un método que permita dosar semicuantitativamente OGM en forma adecuada en alimentos procesados. Este método deberá tener una sensibilidad suficiente para ser utilizado como herramienta para determinar si los mismos satisfacen las cotas impuestas por las reglamentaciones mencionadas, y a su vez, ser accesible para los laboratorios con equipamiento estándar, ser plausible de validación, y que involucre un proceso rápido, sencillo y de bajo costo.

Para desarrollar este objetivo general se fijaron los siguientes objetivos parciales:

- 1- Ajustar los métodos de extracción y purificación de ADN a muestras de distinta complejidad, de manera de obtener preparaciones de ADN de suficiente calidad para su posterior análisis.
- 2- Desarrollar un método nuevo de análisis semicuantitativo de OGM.
- 3- Evaluar el comportamiento del método desarrollado en el análisis de alimentos con distinto grado de procesamiento.
- 4- Realizar un estudio comparativo con otros métodos desarrollados en cuanto a su sensibilidad, costos y aplicabilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MUESTRAS

Las muestras de granos convencionales y modificados genéticamente que se utilizaron en el análisis de distintos métodos de extracción de ADN y como controles positivos y negativos en las distintas reacciones de amplificación de PCR, fueron amablemente donadas por Syngenta y se presentan en la tabla 7.

Tabla 7: Muestras de granos

1	Maíz DK-752-MG Evento MON810 (Monsanto)
2	Maíz DK-752 Convencional (Monsanto)
3	Maíz Convencional Chalten (Syngenta)
4	Maíz Chalten TD Evento 176 (Syngenta)
5	Soja Convencional
6	Soja RR Round Up Ready

Las muestras analizadas de alimentos procesados con un contenido de OGM desconocido fueron compradas en diferentes supermercados de la ciudad y se listan en las tablas 8 y 9.

Tabla 8: Muestras utilizadas para detección de ADN de maíz modificado genéticamente

7	Sopa crema de zapallo Knorr. Lote L08L2F171 13/10/03
8	Polenta instantánea Presto Pronta. Arcor Lote M24 JUN 03
9	Almidón de maíz Maizena. Unilever Bestfoods Brasil LTDA. Importa: Refinerías de maíz SAICF Lote M7.
10	Miel
11	Helado Mini copita Kibon Lote N°L331107
12	Harina de maíz precocida. Nora's Skills.
13	Almidón de maíz. Señor de Sipan
14	Papas fritas Lay's Mediterraneas sabor orégano. Pepsico Snacks
15	Bocaditos de harina de maíz sabor a jamón y queso Cheetos. Pepsico Snacks
16	Triángulos de harina de maíz con sabor a carne 3D Redes. Pepsico Snacks
17	Tubitos de harina de maíz sabor a queso 3D Megafonos. Pepsico Snacks
18	Palitos de harina de maíz sabor a queso Pehuamar Maicitos. Pehuamar
19	Palos de harina de maíz con queso Cheetos. Pepsico Snacks
20	Papas fritas Good Show
21	Papas fritas clásicas Lay's. Pepsico Snacks
22	Pochoclo acaramelado Pop Korn. Pepsico Snacks
23	Alimento a base de cereal Cocoa Blasts. Quaker
24	Palitos salados Good Show

Tabla 9: Muestras utilizadas para la detección de DNA de soja modificado

Muestras de aislados de soja obtenidos en el laboratorio	
25	1º precipitado soja RR
26	1º precipitado soja convencional
27	2º precipitado soja RR
28	2º precipitado soja convencional
29	Sobrenadante soja RR
30	Sobrenadante soja convencional
31	Aislado de soja convencional
32	Aislado de soja RR
33	Concentrado de soja convencional
34	Concentrado de soja RR
Muestras de alimentos	
35	Harina H67. Bunge Argentina
36	Aislado de soja APS 90HI PI058034ES. Bunge Brasil
37	Aislado de soja 90NB APS PI066182ES. Bunge Brasil
38	Jugo de naranja Ades
39	Helado
40	Mayonesa sin huevo. Ades
41	Harina de soja. Bunge Brasil

2. OBTENCIÓN DE AISLADOS DE SOJA

Los aislados de soja se obtuvieron a partir de harina de soja obtenida de porotos de soja convencional y RR Round Up Ready donado por Syngenta. Las harinas fueron desgrasadas con hexano por reflujo en "soxhlet" 24 hs. La harina desgrasada fue disuelta en agua a pH 8.0, alcalinizada con NaOH 2N (relación harina: agua 1:10 p/v) durante dos horas a temperatura ambiente ajustándose el pH periódicamente. La suspensión obtenida se filtró a través de una gasa y el filtrado se centrifugó a 10000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se llevó a pH 4.5 con HCl 2N. El precipitado se separó por centrifugación a 5000 x g durante 15 minutos a 4°C y se resuspendió en agua ajustándose el pH (Petruccelli, 1993). Se tomaron muestras de los diferentes pasos de la obtención, las que fueron liofilizadas (figura 7).

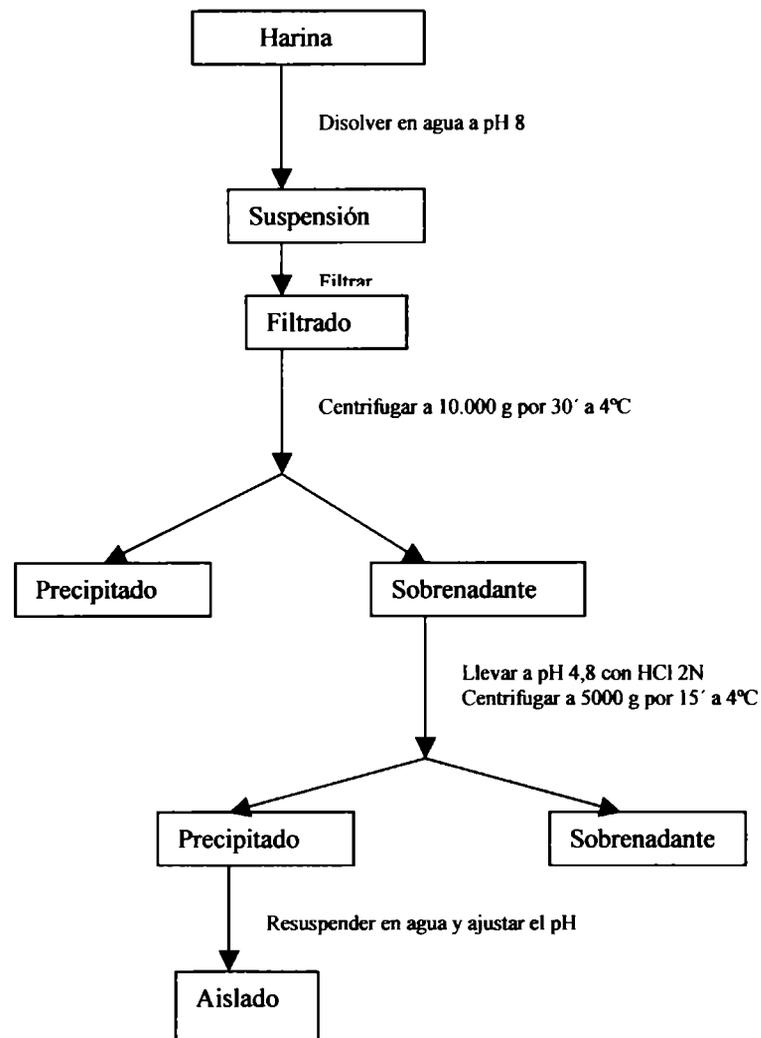


Figura 7: Obtención de aislados de soja en el laboratorio

3. PRIMERS UTILIZADOS

Las distintas PCR se llevaron a cabo utilizando los primers que se listan en la tabla 10.

Tabla10: Primers utilizados en las reacciones de PCR de éste trabajo

Primer	Secuencia de 5' a 3'	Secuencia blanco	Producto de amplificación	Tipo de método
IVR1	5'-CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACC-3'	Invertasa de maiz	226 bp	Específico de especie
IVR2	5'-GGAGCCCCTGTAGAGCATGACGATC-3'			

LE1	5'-AAGCAACCAAACATGATCCTC-3'	Lectina de soja	407 bp	Específico de especie
LE2	5'-ATGGATCTGATAGAATTGACGTTA-3'			
35S-1	5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'	Promotor CaMV 35S	195 bp	Screening
35S-2	5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'			
GMO7	5'-ATCCCACTATCCTTCGCAAGA-3'	Transgen EPSPS	169 bp	Específico de transgen
GMO8	5'-TGGGGTTTATGGAAATTGGAA-3'			
CRY1	5'-ACCATCAACAGCCGCTACAACGACC-3'	Fragmento de delta-endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	184 bp	Específico de transgen
CRY2	5'-TGGGGAACAGGCTCACGATGTCCAG-3'			

4. MÉTODOS

4.1- Métodos utilizados en la extracción de ADN

Para la extracción de ADN se probaron los dos métodos de extracción más utilizados: método de Dellaporta y *col.* (1983) y método de extracción con CTAB (Doyle y Doyle, 1987), y variaciones de estos mismos.

Método 1-1: Método de Dellaporta sin purificación con fenol / cloroformo

- Pesar 70 mg de muestra.

1. Agregar 1 ml de buffer de extracción (Dellaporta) 100 mM Tris pH8; 0.50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM β -Mercaptoetanol.
2. Agregar 50 μ l de SDS 20% y mezclar vigorosamente.
3. Incubar a 65°C por 10 minutos.
4. Adicionar 264 μ l de AcK 5M y mezclar vigorosamente.
5. Incubar en hielo por 20 minutos.
6. Centrifugar a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C.
7. Tomar el sobrenadante.
8. Agregar 35 μ l de AcNa 3M y 1 ml de etanol 95%, mezclar e incubar a -20°C over night.
9. Centrifugar a 15000 rpm 10 minutos, tirar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 ml de etanol 70%. Centrifugar nuevamente.
10. Tomar el precipitado y lavar nuevamente con 1 ml de etanol 70%. Centrifugar nuevamente.
11. Tirar el sobrenadante y secar el pellet sobre papel y luego en estufa a 50°C hasta que se evapore completamente el etanol.
12. Agregar a cada tubo 20 μ l de agua.

Método 1-2: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo

- Realizar los pasos 1 al 8 del método 1-1

9. Agregar 2µl de ARNasa (10 mg/ml) por cada 70 µl de muestra e incubar 10 minutos a 37°C.
10. Hacer una extracción con 200 ó 300 µl de fenol-cloroformo (partes iguales).Luego hacer sucesivas extracciones con cloroformo hasta que la interfase esté limpia de proteínas (transparente). Cada vez centrifugar a 15000 rpm 5 minutos a 4°C.
11. Agregar 35µl de AcNa 3M y 1 ml de etanol 95%, mezclar e incubar a -20°C durante toda la noche.
12. Centrifugar a 15000 rpm 10 minutos, tirar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 ml de etanol 70%. Centrifugar nuevamente.
13. Tomar el precipitado y lavar nuevamente con 1 ml de etanol 70%. Centrifugar nuevamente.
13. Tirar el sobrenadante y secar el precipitado sobre papel y luego en estufa a 50°C hasta que se evapore completamente el etanol. Agregar a cada tubo 20 µl de agua.

Método 1-3: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo y agregado de glicerol

- Realizar los pasos 1 al 10 del método 1-2, luego agregar un 5% del volúmen de la muestra de glicerol, después de esto continuar con los pasos 11 al 15 del método anterior.

Método 1-4: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo y lisis alcalina/ precipitación con PEG

- Realizar los pasos 1 al 15 del método 1-2 y luego:

16. Disolver el pellet en 32 µl de agua y precipitar el DNA con 8 µl de NaCl 4 M y 40 µl de PEG 8000 [13% P/V inicial] .
17. Mezclar, incubar en hielo 20 minutos y centrifugar 15 minutos a 4°C.
18. Remover cuidadosamente el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol 70%. Centrifugar 7 minutos a temperatura ambiente, descartar el sobrenadante y secar.
19. Resuspender en 20 µl de agua.

Método 1-5: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo y previo desgrasado con hexano

1. Tomar 2 g de muestra de harina de soja y agregar 10ml de hexano.
2. Centrifugar a 10.000g , 10 minutos.
3. Agregar al pellet 4 ml de buffer.
4. Centrifugar a 10.000g, 10 minutos
5. Tomar 500 µl de sobrenadante y adicionar 30 µl de SDS 10%
6. Incubar a 65°C por 10 minutos
7. Agregar 51 ul de ACK 5M,mezclar vigorosamente
8. Incubar en hielo por 20 minutos .
9. Centrifugar a 15000 rpm por 20 minutos a 4°C.

10. Tomar 500 μ l del sobrenadante
11. Luego seguir con los pasos 9 al 15 del método 1-2

Método 1-6: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo y agregado de glicerol y RNAsa

- Realizar los puntos 1 al 8 del método 1-2, luego agregar 2 μ l de RNAsa (10 mg/ml) por cada 70 μ l de muestra e incubar 10 minutos a 37°C, posteriormente hacer una extracción con 200 ó 300 μ l de fenol-cloroformo (partes iguales).Luego hacer sucesivas extracciones con cloroformo hasta que la interfase esté limpia de proteínas (transparente). Cada vez centrifugar a 15000 rpm 5 minutos a 4°C, después de ésto agregar un 5% del volúmen de la muestra de glicerol y finalmente seguir con los pasos 11 al 15 del método 1-2

Método 1-7: Método de Dellaporta con purificación con fenol cloroformo y lisis alcalina/ precipitación con PEG , con agregado de glicerol

- Realizar los pasos 1 al 10 del método 1-2, luego agregar un 5% del volúmen de la muestra de glicerol, después de esto continuar con los pasos 11 al 15 del método 1-2, luego continuar con los pasos 13 al 16 del método 1-4.

Método 2-1: Método de extracción con CTAB

1. Se pesaron 150 mg de la muestra a analizar y se le adicionaron 1,5 ml de buffer CTAB pre-calentado a 65°C.
2. Incubar a esa temperatura entre 30 min y 1 h, agitando cada 10 min.
3. Luego se adicionó un volúmen de cloroformo-alcohol isoamílico y agitar el tubo manualmente, o con agitador por 10 min
4. Centrifugar 10 min a 14000 rpm.
5. Transferir la fase acuosa (fase superior) a un nuevo tubo y se repetir la extracción con cloroformo-alcohol isoamílico.
6. Precipitar el DNA con 2,5 volúmenes de etanol 96%, mezclando suavemente el tubo por inversión varias veces
7. Centrifugar a 14000 rpm por 20 min.
8. Lavar el precipitado con 5 ml de etanol 70%
9. Centrifugar y se descartar el sobrenadante, secando el precipitado por inversión del tubo sobre papel y luego en estufa a 37°C hasta que se evapore completamente el etanol.
10. Disolver el precipitado en 200 μ l de agua.

Método 2-2: Método de extracción con CTAB con agregado de glicerol

- Realizar los pasos 1 al 5 del método 2-1, luego agregar 5% del volúmen de la muestra de glicerol y continuar con los pasos 6 al 10 del método 2-1.

Método 2-3: Método de extracción con CTAB, con agregado de glicerol y proteinasa K

- Realizar los pasos 1 y 2 del método 2-1, luego agregar 10 μ l de proteinasa K de 20 Unidades /mg, posteriormente realizar los pasos 3,4 y 5 del método 2-1, después agregar 5% del volumen de la muestra de glicerol y continuar con los pasos 6 al 10 del método 2-1

Método 2-4: Método de extracción con CTAB, con agregado de glicerol, proteinasa K y RNAasa

- Realizar los pasos 1 al 2 del método 2-1, luego agregar 10 μ l de proteinasa K de 20 Unidades /mg y RNAasa a una concentración final de 100 μ g/ml y incubar a 37°C por 30 min, posteriormente agregar 5% del volumen de la muestra de glicerol y continuar con los pasos 6 al 10 del método 2-1.

5. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE ADN OBTENIDO**Tamaño molecular de los fragmentos de ADN**

Las muestras de ADN obtenidas se corren en un gel de agarosa al 0,8% en presencia de bromuro de etidio para analizar el estado físico (grado de degradación, presencia de residuos de ARN) y estimar la cantidad de ADN (Frostegård y col, 1999; Miller y col, 1999).

6. CUANTIFICACIÓN DE ADN**6.1 Cuantificación espectrofotométrica**

La concentración de ADN total de todas las muestras y la concentración de plásmido pRTL202 (Carrington y col, 1991) fue determinada a través de medidas de absorbancia a 260 nm, en espectrofotómetro Agilent 8453 E UV-visible, Agilent Technologies utilizando como referencia una solución de ADN de esperma de salmón (Invitrogen, Argentina). También se midió la absorbancia a 280 nm para luego calcular la relación A260/280 y así ver la pureza (calidad) del ADN obtenido.

Para realizar las medidas espectrofotométricas las muestras se diluyeron 1/100 en agua bidestilada y la concentración se calculó mediante la ecuación 1, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260 nm de ADN de doble cadena representa 50 μ g/ml (Romano, 1998).

Ecuación 1: $[\text{ADN}] = 50 \mu\text{g/ml} \times D \times A_{260}$ D= factor de dilución de la muestra

La pureza de la muestra de ADN puede ser medida por la razón entre las lecturas de A260 y A280. Teniendo en cuenta esto, se puede corregir la concentración de ADN utilizando la ecuación 2 (Wiley y Sons, 2000).

Ecuación 2: $[ADN] = (62,9 \times A_{260} - 36,0 \times A_{280}) \times D \times 50 \mu\text{g/ml}$

6.2 Cuantificación por electroforesis en geles de agarosa

El ADN se cuantificó resolviendo una alícuota en gel de agarosa 0,8% en buffer TAE 1X (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM) y se comparó con un estándar de masa conocida (Lambda DNA/Hind III marker, Promega Biotech, USA).

7. ANÁLISIS DE VARIANZA

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), y se determinaron las diferencias significativas entre los distintos tratamientos mediante el test de Tukey con $\alpha=0,05$ (Pimentel Gómez, 1978), utilizando el programa SigmaStat®, versión 2.0, Jaudel Corporation 1992-1995.

8. REACCIÓN DE PCR

8.1 Mezcla y condiciones de ciclado

Para realizar las reacciones de PCR se extrajo el ADN por el método elegido, se cuantificó mediante comparación con un estándar de masa conocida en gel de agarosa 0,8% y se utilizó la siguiente mezcla de reacción.

Componente	Volúmen	Concentración final
Buffer de PCR 10X	10 μl	1X
Mezcla de dNTPs 10 mM	2 μl	0,2 mM c/u
Cl ₂ Mg 50mM	3 μl	1,5 mM
Mezcla de primers (10 μM c/u)	5 μl	0,5 μM c/u
DNA templado	1-20 μl	—
Taq DNA polimerasa (5U/ μl)	0,5 μl	2,5 Unidades
Agua desionizada autoclavada csp	100 μl	

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un ciclador térmico Mastercycler® gradient Eppendorf en tubos de polipropileno de 0,5 ml, usando un volúmen final de reacción de 10 μl . Para la optimización de condiciones de PCR se usó 20 ng de ADN molde y 1,5 mM de cloruro de magnesio, y para el análisis de alimentos 200 ng de ADN molde y 4 mM de cloruro de magnesio

Los programas de ciclado para las diferentes PCR se llevaron a cabo según los programas listados en las tablas 11 y 12.

Tabla 11: Condiciones de ciclado en los programas con gradiente de temperatura

Paso	35S1/2, LE1/2 y GMO1/2	IVR1/2 y CRY1/2
Desnat inicial	94°C, 10 min	94°C, 10 min
Desnaturalización	94°C, 15 seg	94°C, 15 seg
Apareamiento	50°C, 30seg	65°C, 30 seg
Extensión	72°C, 30 seg	72°C, 30 seg
Gradiente	40°C a 60°C	55°C a 75°C
Extensión final	72°C, 5 min	72°C, 5 min

Tabla 12: Condiciones de ciclado

Paso	35S1/2	LE1/2	GMO7/8	IVR1/2	CRY1/2
Desnat inicial	94°C, 10 min				
Desnaturalización	94°C, 15 seg				
Annealing	55°C, 30 seg	44°C, 30 seg	57°C, 30 seg	68°C, 30seg	71°C, 30 seg
Extensión	72°C, 5 min				

8.2 Determinación de la linealidad de la PCR

Se realizó una primera amplificación de PCR variando el número de ciclos (14, 17, 20, 23 y 26 ciclos) y una reamplificación de 15 ciclos.

Luego se ensayó una primera amplificación de 17 ciclos, variando en número de ciclos de la segunda amplificación de PCR (14, 17, 20, 23 y 26 ciclos), usando en ambos casos las condiciones de ciclado de la tabla 6.

8.3 Análisis de alimentos

Se realizó una amplificación de 35 ciclos y una reamplificación de 35 ciclos, utilizando las condiciones de ciclado de la tabla 6.

9. EVALUACIÓN DE GELES

Los resultados fueron evaluados por observación directa sobre transiluminador UV (Modelo 3UV - UVP) con tubos de longitud de onda 300nm y mediante un sistema de video con cámara CCD, filtro de UV adecuado y software analizador de imagen Kodak 1D (Scientific Imaging Systems, Eastman Kodak Company). Este programa permite adquirir del gel de agarosa una señal biológica y convertirla a una señal digital. Esta imagen puede ser ajustada para realizar un análisis del perfil de la imagen que se muestra en la computadora, en un formato de 2 dimensiones que refleja la

intensidad de las bandas del gel. Esta intensidad es corregida por la intensidad del fondo del gel y estos datos se exportan a otro software de aplicación como Origin o Excel, los que, permiten realizar las curvas de calibración e interpolación de datos de muestras desconocidas en dichas curvas.

CAPÍTULO 1:
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN

1.1 INTRODUCCIÓN

La detección y cuantificación de material GM en ingredientes crudos y alimentos depende de la eficiencia de la extracción y purificación de ADN transgénico de la matriz en estudio. Para permitir este análisis y asegurar su validez es necesario contar con un método de extracción y purificación de ADN apropiado. El objetivo de los procedimientos de extracción es obtener ADN en suficiente cantidad y calidad para ser utilizado como molde en una reacción de PCR. La calidad del mismo depende del largo medio de las moléculas extraídas, la pureza química y la integridad estructural de la secuencia. Estas características dependerán de la matriz de partida, de la historia de almacenaje de la muestra, del grado de procesamiento del alimento y de la técnica de extracción utilizada (Terry y *col*, 2002; Sauders y Parkers, 1999; Hupfer y *col*, 1999).

Existe un gran número de métodos para la extracción de ADN de diferentes especies y/o tejidos vegetales así como de distintos ingredientes y/o alimentos. Las diferencias en la composición bioquímica de las distintas especies de vegetales, y aún dentro de una misma especie entre las hojas y las semillas, hacen que deban introducirse modificaciones en el procedimiento de extracción. Además, en el caso de alimentos (con excepción de los ingredientes crudos y los comóditos), el ADN, muchas veces sufre alteraciones causadas por los tratamientos físicos, químicos y enzimáticos utilizados durante la elaboración. Así, los tratamientos térmicos con bajo pH pueden producir depurinización e hidrólisis del ADN, y tratamientos con presencia de nucleasas producen degradación del mismo. Todas estas diferencias imposibilitan el uso de un único protocolo para todas las matrices (Terry y *col*, 2002).

El objetivo del presente capítulo es analizar la efectividad de distintos métodos de extracción y purificación de ADN en granos y alimentos procesados, para producir un ADN que sea de suficiente calidad para ser utilizado como molde en las reacciones de PCR.

1.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR

El éxito de cualquier método de detección o cuantificación de OGMs dependerá del plan de muestreo. Es importante que la muestra sea tomada al azar, y que se establezca un límite superior en el tamaño de la misma que dependerá de la sensibilidad del método analítico. Cualquier plan de muestreo debe tener en cuenta la variabilidad asociada a cada paso: muestreo, preparación de la muestra y análisis (Anklam y Neumann, 2002). La dificultad para tomar la muestra de análisis es mayor en granos y semillas que en alimentos homogéneos, ya que la distribución en los primeros no es uniforme. Existe una gran discusión a cerca del tamaño de la muestra que se debe tomar para asegurar que ésta sea representativa de un lote. Cuando el muestreo debe ser aceptado por los productores de alimentos, el comprador y el vendedor deben acordar un plan de muestreo que tenga en cuenta el nivel de confianza, costo y la incertidumbre del muestreo al azar (Anklam y Neumann, 2002). Esta incertidumbre es inherente cuando se muestrea cualquier lote y los planes de muestreo deben tener niveles de riesgo satisfactorios, que tomen en cuenta el riesgo del productor (probabilidad de rechazar un lote cercano a "puro") y el riesgo del consumidor (probabilidad de aceptar un lote impuro) (Remund y *col*, 2001). Estos planes de muestreo consensuados entre el comprador y el vendedor pueden ser distintos de los desarrollados con fines regulatorios. A pesar de que se han propuesto muchos planes, muy pocos son implementados debido a su costo y complejidad (Anklam y Neumann, 2002), y al ser tan rigurosos afectan las actividades comerciales entre países. Por ejemplo la norma ISO/DIS 21568.2, (2003), define que el tamaño de muestra óptima para

detectar 0,1% de OGM es 570 kg (100000 partículas), tamaño que es excesivo, difícil de procesar y hace que se requiera gran espacio y costo de almacenaje y transporte.

En el presente trabajo, debido a que para evaluar a los métodos de extracción y purificación de ADN se utilizaron granos conocidos que eran 100% OGM o no-OGM, a que se empleó una metodología no validada y a que en este caso no se está evaluando la contaminación de un lote, se tomaron 100 granos de soja y de maíz OGM y no-OGM separadamente, y se mezclaron en un molino analítico hasta que fueron transformados en harina, las que fueron utilizadas para analizar los distintos métodos de extracción y purificación de ADN. El molino fue limpiado con cepillo hasta que no se observaron partículas visibles de harina y luego lavado, antes de procesar cada lote.

1.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN ANALIZADOS

A pesar de que no hay un protocolo ideal para todas las matrices, todos los procedimientos tienen un paso de lisis celular, uno o varios de extracción, purificación y remoción de inhibidores (que pueden ser simultáneos o consecutivos), un paso de concentración de ADN y uno de lavado para eliminar sales (Terry *y col*, 2002).

Distintos reactivos pueden ser utilizados como lisantes celulares, como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). También se puede usar en la lisis una serie de buffers que contienen dodecil sulfato de sodio (SDS) como detergente y una alta concentración de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (Sambrook *y col*, 1989).

Para la purificación de ADN obtenido a partir de matrices alimentarias pueden utilizarse distintos procedimientos que emplean diferentes combinaciones de solventes como fenol / cloroformo, cloroformo y cloroformo / alcohol isoamílico. Luego de la etapa de purificación, el ADN es concentrado por precipitación con isopropanol o etanol 96%, siendo posteriormente lavado con etanol 70% para la eliminación de sales.

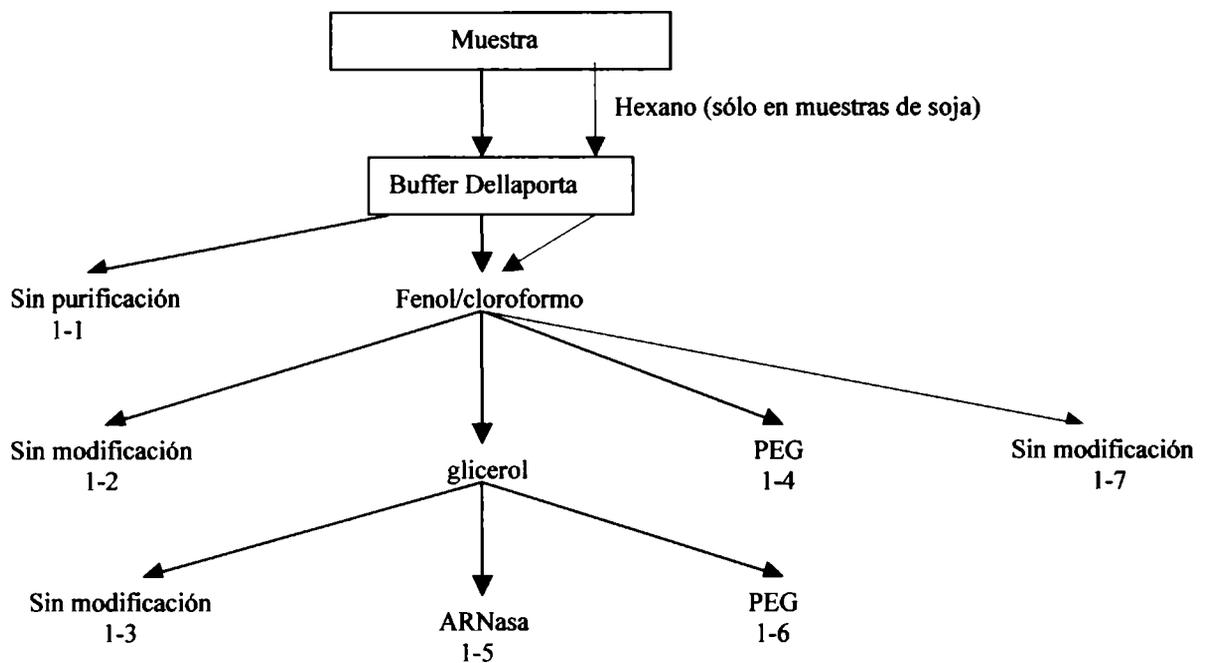
También hay métodos que utilizan una variedad de matrices de adsorción de sílica para mejorar la recuperación y purificación del ADN. Este se une a las resinas en presencia de un reactivo caotrópico (cloruro de guanidinio) que reduce la actividad acuosa y provoca el pegado del ADN a la matriz. Los contaminantes son eliminados de la resina con isopropanol, y finalmente se eluye el ADN de la resina con un buffer de baja concentración salina (Boyle y Lew, 1995). Estos métodos no funcionan bien para matrices ricas en grasas. Existen varios productos comerciales que utilizan este principio, como por ejemplo la resina Wizar™ (Promega Corp., Madison, WI) y DNeasy™ (Qiagen, Crawley, UK). Por otro lado existen también comercialmente métodos de adsorción que utilizan asientos magnéticos.

A pesar del gran número de protocolos disponibles, la mayoría son variaciones de 2 métodos básicos: el descrito por Dellaporta *y col*, (1983), y los que utilizan el buffer de extracción CTAB (Doyle y Doyle, 1987). El método de Dellaporta utiliza un buffer de lisis que contiene dodecil sulfato de sodio como detergente y una alta concentración de ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (Sambrook, 1989) que actúa como quelante de cationes divalentes como Ca^{+2} y Mg^{+2} , inhibiendo de esta forma ADNasas que usan metales como cofactores (Sambrook, *y col*, 1989). Además, utiliza β -mercaptoetanol, ya que éste crea un ambiente reductor que evita la acción de peroxidases y polifenoloxidasas sobre el ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1995). En general, se observa que al aumentar la concentración de β -mercaptoetanol se mejora su calidad pero disminuye el rendimiento (Romano, 1998). El método de Doyle y Doyle, (1987), emplea el buffer de lisis CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) que solubiliza las membranas formando un complejo con el ADN que favorece una posterior precipitación diferencial del complejo (Weising *y col*, 1995).

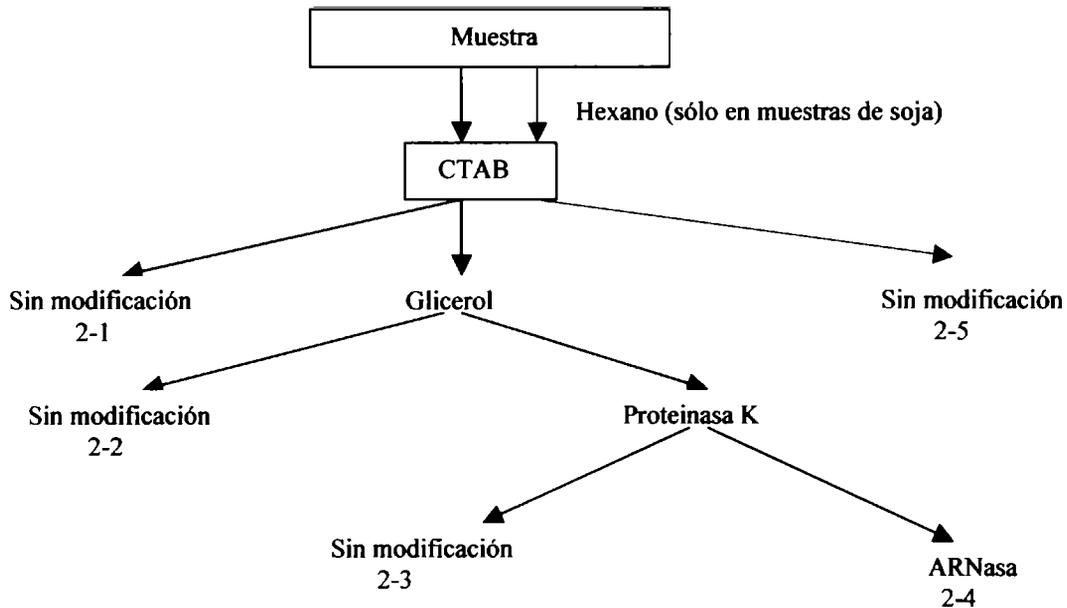
La mayor parte de los métodos de extracción han sido muy utilizados en tejidos vegetales, pero se tiene menos conocimiento de su funcionamiento en alimentos que poseen en general un alto contenido de proteínas y lípidos, que pueden interferir o dificultar la acción de los diferentes reactivos durante la extracción y purificación, además de poseer un mayor número de sustancias que pueden inhibir la reacción de PCR. Muchos investigadores utilizan para la obtención de ADN a partir de matrices alimentarias métodos comerciales de extracción como resina Wizar (Wurz y col, 1999; Van Hoef y col, 1998; Germini y col, 2004), Dneasy (Vollenhofer y col, 1999; Taverniers y col, 2001) y columnas de adsorción (Meyer, 1999; Jaccoud y col, 2003).

En este trabajo se evaluaron los dos métodos más frecuentemente usados: Dellaporta y col, (1983) y el de CTAB (Doyle y Doyle, 1987) y nuevas variaciones a los mismos de simple aplicación y bajo costo, en granos de soja y de maíz, ya que éstos son los cultivos que se encuentran aprobados a nivel comercial en Argentina. Estas modificaciones se presentan en los esquemas 1 y 2 que se muestran a continuación.

Esquema 1: Métodos basados en el procedimiento de Dellaporta y col, (1983)



Esquema 2: Métodos basados en el procedimiento de Doyle y Doyle, (1987)



En los casos en que se utilizó buffer de Dellaporta para la extracción de ADN, independientemente de las modificaciones realizadas al protocolo original que se indican en el esquema, se realizaron dos modificaciones: el buffer se incubó a 65° C durante 30 minutos, en lugar de 10 minutos como indica el protocolo original y se realizaron dos lavados con etanol 70% para la remoción de sales, en lugar de uno como recomienda el protocolo.

Debido a que las muestras analizadas, tienen un alto contenido proteico, se evaluó la aplicación de fenol / cloroformo, cloroformo y cloroformo / alcohol isoamílico, con el objeto de determinar si alguna de estas combinaciones es más eficiente en la eliminación de proteínas. Estos solventes desnaturalizan proteínas que quedan en la interfase y remueven de la fase acuosa moléculas lipídicas, polisacáridos, proteínas y nucleasas, quedando en la fase acuosa los ácidos nucleicos. La desventaja de los solventes es su toxicidad. Además los residuos de fenol inhiben la PCR. A pesar de ésto la separación orgánica se sigue utilizando mucho (Terry y col, 2002).

Además, debido a que el glicerol facilita la desnaturalización de ADN rico en GC y evita la formación de estructuras secundarias que interfieren en la etapa de extensión (Stratagene,1997), se usa como cosolvente en la mezcla de PCR. Por esta razón se incluyó en el procedimiento de extracción, y así obtener un ADN de mayor calidad para utilizarlo en la amplificación por PCR.

Basados en que el PEG se utiliza para la purificación de ADN (Wiley y Sons, 2000), se lo incluyó en el estudio para corroborar su acción.

Para la eliminación de ARNs, se utilizó ARNasa, con el propósito de mejorar la determinación de la concentración de ADN por medida espectrofotométrica.

En los granos que contienen alto porcentaje de lípidos, como los protos de soja (20% de lípidos (Petruccelli, 1993)), se probó una extracción previa de las harinas obtenidas de los mismos con hexano, con el propósito de eliminarlos y facilitar de esta forma que el buffer de lisis y los reactivos utilizados para la

extracción de ADN se pongan en contacto íntimo con los ácidos nucleicos, no quedando éstos atrapados en la fase grasa que no se emulsionaría con la acuosa.

En los métodos que utilizan buffer CTAB, con el objetivo de remover proteínas de la solución de ADN extraída, se utilizó solución de proteinasa K y se evaluó su influencia en la purificación de la muestra.

Una vez purificado y removidos los inhibidores, el ADN se precipita. En todos los protocolos utilizados se precipitó con 2 volúmenes de etanol 96%. Este paso además de concentrar el ADN remueve sales y compuestos orgánicos como el fenol y el cloroformo.

1.4 EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN ANALIZADOS

El efecto de la utilización de todos estos elementos, como por ej. purificación con fenol / cloroformo, glicerol, PEG, proteinasa K, ARNasa, extracción previa de lípidos con hexano, etc. en la extracción y purificación de ADN genéticamente modificado, fue analizado teniendo en cuenta los siguientes criterios:

- Tamaño molecular de los fragmentos de ADN y eficiencia relativa de la recuperación
- Concentración de ADN obtenida por medida espectrofotométrica y pureza medida como relación A260/280.
- Amplificación del ADN obtenido a partir de granos de soja y maíz.
- Amplificación del ADN obtenido de muestras de alimentos

1.4.1 Tamaño molecular de los fragmentos de ADN

Los ADNs extraídos utilizando los todos los procedimientos de extracción en dos muestras de soja: convencional y RR; y 4 de maíz: Maíz DK-752-MG Evento MON810 (Monsanto), Maíz DK-752 Convencional (Monsanto), Maíz Convencional Chalten (Syngenta), Maíz Chalten TD Evento 176 (Syngenta), fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 0,8%, obteniéndose los resultados mostrados en las figuras 8 y 9. La calidad del ADN obtenido fue evaluada teniendo en cuenta la ausencia de degradación, estimando el tamaño de los fragmentos de ADN o su posición relativa después de la electroforesis, en forma análoga al método descrito por Frostegård y col, (1999), Miller y col, (1999) y Peano y col, (2004). La intensidad de la fluorescencia permitió estimar semicuantitativamente el rendimiento de extracción.



Figura 8: Comparación de la distribución de tamaños de fragmentos de ADN. Se sembraron 3 µl de ADN extraído con cada método en gel de agarosa 0,8%. Se muestran los resultados obtenidos con la muestra de soja RR. Imagen similar se obtiene para la muestra de soja convencional. Calle 1: EDTA, SDS; Calle 2: EDTA, SDS, P/CL; Calle 3: EDTA, SDS, P/CL, glicerol; Calle 4: EDTA, SDS, P/C PEG; Calle 5: EDTA, SDS, P/Cl, ARNasa-glicerol; Calle 6: EDTA, SDS, P/Cl, PEG, glicerol; Calle 7: EDTA, SDS, P/Cl, hexano; Calle 8: CTAB; Calle 9: CTAB, glicerol; Calle 10: CTAB, Prot K, Glicerol; Calle 11: CTAB, ProtK, ARNsa, glicerol; Calle 12: CTAB, he; Calle M: marcador de peso molecular

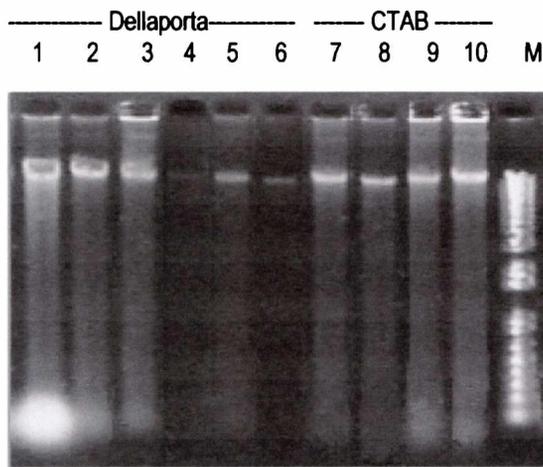


Figura 9: Comparación de la distribución de tamaños de fragmentos de ADN y rendimientos relativos de ADN obtenidos. Se sembraron 3 μ l de ADN extraído con cada método en gel de agarosa 0,8%. Se muestran los resultados obtenidos con la muestra de maíz MON 810. Imágenes similares se obtienen para las muestras Maiz DK-752 Convencional, Maiz Convencional Chalten, Maiz Chalten TD Evento 17f
 Calle1: EDTA,SDS; Calle2: EDTA,SDS ,P/CL;
 Calle3: EDTA,SDS,P/CL,glicerol; Calle4: EDTA,SDS,P/CL,PEG;
 Calle5: EDTA,SDS,P/Cl,ARNsa,Glicerol;
 Calle6: EDTA,SDS,P/Cl,PEG,glicerol; Calle7:CTAB; Calle8:CTAB
 Calle9:CTAB,Prot K ,Glicerol; Calle10: CTAB,ProtK, ARNsa,glicerol
 Calle M: marcador de peso molecular

Las figuras 8 y 9 muestran que la distribución de tamaños de los fragmentos de ADN obtenidos en todos los procedimientos es similar. Los geles muestran un escaso chorreado y presenta fragmentos de alto peso molecular por lo que se puede concluir que sólo hay un grado limitado de cizallamiento del ADN durante la extracción. En estas figuras se observa que el método 1-4 es el que produce menor rendimiento relativo en ADN pero con casi ausencia de degradación del mismo (ausencia de chorreado). Todos los métodos que utilizan ARNasa producen muestras de ADN con poca cantidad de ARN. Por otro lado, en estas figuras puede verse que el ADN obtenido por el método 1-1, que no usa ARNasa, tiene una cantidad de ARN mucho mayor que la observada con el resto.

1.4.2 Concentración de ADN obtenida por espectrofotometría y determinación de pureza como relación A260/280.

La cuantificación del ADN extraído puede realizarse por métodos físicos (por ej. absorbancia a una longitud de onda específica), físico-químicos (por ej. uso de agentes intercalantes capaces de emitir fluorescencia), enzimáticos (por ej. detección de bioluminiscencia) o PCR cuantitativa. El último método es especialmente adecuado para matrices compuestas o para muestras con bajo contenido de ADN o cuyo ADN está degradado (Sambrook y *col*, 1989).

Debido a que uno de los métodos más accesibles para este trabajo es la medida espectrofotométrica de soluciones de ADN, se determinó la absorbancia a 260 y 280 nm de las muestras de ADN obtenidas de las 6 muestras de granos para todos los métodos de extracción. Para la determinación de la concentración se utilizó como referencia una solución de ADN de esperma de salmón (Invitrogen, Argentina). La pureza de la muestra de ADN se midió por la relación entre las lecturas de A260 y A280. Una muestra de ADN puro debe tener una relación de absorbancias 260/280 entre 1,8 y 2,0. Una relación menor indica contaminación con proteínas (Romano, 1998; Peano y *col*, 2004). Debido a esto, se corrigió la concentración de ADN teniendo en cuenta la absorbancia de las proteínas a 280 nm (Wiley y Sons, 2000).

Se realizaron tres extracciones independientes para cada condición y de los resultados obtenidos se hizo un análisis de varianza (ANOVA), y se determinaron las diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Tabla 13: Evaluación de los métodos de extracción y purificación analizados para las muestras de soja

Procedimiento	Tratamiento químico y/o enzimático	Concentración de ácidos nucleicos corregida($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Cantidad de ácidos nucleicos (ng/g harina)	A_{260}/A_{280}
1-1	EDTA, SDS	5,65 \pm 0,29	1,61 \pm 0,07	1,39 \pm 0,12
1-2	EDTA, SDS ,P/CL	2,08 \pm 0,02	0,59 \pm 0,01	1,84 \pm 0,02
1-3	EDTA, SDS, P/CL, glicerol	2,69 \pm 0,78	0,77 \pm 0,18	1,79 \pm 0,04
1-4	EDTA, SDS, P/CL, PEG	0,43 \pm 0,03	0,12 \pm 0,01	1,23 \pm 0,003
1-5	EDTA, SDS, P/Cl, ARNsa, glicerol	1,04 \pm 0,52*	0,30 \pm 0,10*	1,48 \pm 0,06
1-6	EDTA, SDS, P/Cl, PEG, glicerol	0,54 \pm 0,06	0,15 \pm 0,25	1,60 \pm 0,01
1-7	EDTA, SDS, P/Cl, hexano	3,53 \pm 0,24	1,01 \pm 0,05	1,86 \pm 0,11
2-1	CTAB	1,68 \pm 0,10	0,48 \pm 0,02	1,20 \pm 0,0004
2-2	CTAB , glicerol	1,87 \pm 0,36	0,53 \pm 0,08	1,28 \pm 0,04
2-3	CTAB, Prot K , glicerol	2,57 \pm 0,59	0,73 \pm 0,05	1,27 \pm 0,17
2-4	CTAB, ProtK, ARNsa, glicerol	3,40 \pm 0,06*	0,97 \pm 0,14*	1,08 \pm 0,87
2-5	CTAB, hexano	1,90 \pm 0,15	0,54 \pm 0,04	1,37 \pm 0,04

* Concentración de ADN

La tabla 13 presenta la concentración de ácidos nucleicos corregida por la concentración de proteínas, la cantidad de ácidos nucleicos obtenida y la relación A_{260}/A_{280} obtenida con los 12 métodos de extracción y purificación analizados para las muestras de soja. Los métodos de extracción utilizados muestran una gran variabilidad, como puede apreciarse al comparar las desviaciones estándares. Al realizar el análisis de varianza de las concentraciones de ácidos nucleicos, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los métodos 1-1 y 1-2, lo que puede explicarse porque el método 1-1 no usa método de purificación, con lo que a 260 nm se mide la absorbancia de ADN, ARN e inhibidores. También se encontró una diferencia significativa entre los métodos 1-3 y 1-4 y entre los 1-3 y 1-7, lo que sugiere que el agregado de PEG con o sin glicerol disminuye la concentración de ADN, probablemente debido al mayor manipuleo de la muestra, lo que incrementa la probabilidad de perder muestra de interés. Para el resto de los métodos no se encontraron diferencias significativas.

Al realizar el análisis de varianza de la relación de absorbancias A_{260}/A_{280} entre los métodos que usan buffer Dellaporta, se encontró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los métodos 1-7 y 1-4, lo que podría explicarse por una gran pérdida de ADN en el método que utiliza PEG (1-4) (como puede observarse en la figura 8, calle 4, la concentración de ADN obtenida es muy baja). Además se encontraron diferencias significativas entre los métodos 1-2 y 1-1 y entre el 1-2 y el 1-4. Según esto, el método 1-2 purifica más la muestra que el método 1-1, ya que este último, como se mencionó, no se usa ningún método de purificación. También el método 1-2 permite obtener muestras más puras que el 1-4. Esto podría explicarse porque, si bien el PEG se usa para purificar la muestra, se perdería ADN en los numerosos pasos que tiene el método. No se encontraron diferencias significativas entre el resto de los métodos.

Para los métodos que usan buffer CTAB, no se encontraron diferencias significativas entre ningún método, ni para la concentración de ácidos nucleicos, ni para la relación de absorbancias.

Por lo tanto los mejores métodos de extracción para soja son el 1-2 y 1-7 porque dan muestras con mayor grado de purificación y con mayor concentración de ácidos nucleicos. Si bien el método 1-1 proporciona una muestra con alta concentración de éstos, también presenta una relación $A_{260}/280$ baja. Debido a que no hay diferencias significativas entre los métodos 1-2 y 1-7 (el agregado de hexano no mejora significativamente la extracción y purificación de ADN), en lo sucesivo se elegirá el método 1-2 para la extracción de ADN.

Tabla 14: Evaluación de los métodos de extracción y purificación analizados para las muestras de maíz

Procedimiento	Tratamiento químico y/o enzimático	Concentración de ácidos nucleicos corregida ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Cantidad de ácidos nucleicos (ng/g harina)	A_{260}/A_{280}
1-1	EDTA, SDS	$2,72 \pm 0,12$	$0,78 \pm 0,03$	$1,67 \pm 0,08$
1-2	EDTA, SDS, P/CL	$1,05 \pm 0,15$	$0,30 \pm 0,03$	$1,84 \pm 0,12$
1-3	EDTA, SDS, P/CL, glicerol	$0,65 \pm 0,18$	$0,18 \pm 0,04$	$1,61 \pm 0,05$
1-4	EDTA, SDS, P/CL, PEG	$0,30 \pm 0,04$	$0,09 \pm 0,01$	$1,21 \pm 0,03$
1-5	EDTA, SDS, P/Cl, ARNsa, glicerol	$0,67 \pm 0,14^*$	$0,19 \pm 0,02^*$	$1,52 \pm 0,05$
1-6	EDTA, SDS, P/Cl, PEG, glicerol	$0,27 \pm 0,09$	$0,08 \pm 0,01$	$1,47 \pm 0,13$
2-1	CTAB	$0,76 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,04$	$1,62 \pm 0,12$
2-2	CTAB, glicerol	$0,66 \pm 0,18$	$0,19 \pm 0,02$	$1,65 \pm 0,06$
2-3	CTAB, Prot K, glicerol	$0,83 \pm 0,06$	$0,24 \pm 0,04$	$1,63 \pm 0,06$
2-4	CTAB, Prot K, ARNsa, glicerol	$0,15 \pm 0,08^*$	$0,04 \pm 0,02^*$	$1,33 \pm 0,12$

* Concentración de ADN

La tabla 14 presenta la concentración de ácidos nucleicos corregida por la concentración de proteínas, la cantidad de ácidos nucleicos y relación A_{260}/A_{280} obtenida con los 10 métodos de extracción y purificación analizados para las muestras de maíz. Como en el caso de los resultados de la tabla 13, los métodos de extracción utilizados muestran una gran variabilidad como puede apreciarse al comparar las desviaciones estándares. En forma similar a lo observado para las muestras de soja, al realizar el análisis de varianza de las concentraciones de ácidos nucleicos, sólo se encontró una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre el método 1-1 y el 1-2, lo que puede ser explicado porque el primero no realiza ningún método de purificación, por lo que tiene mayor cantidad de proteínas. No se encontraron diferencias significativas entre el resto de los métodos. Iguales resultados se encontraron al realizar el análisis de varianza de la cantidad de ácidos nucleicos obtenida con los diferentes métodos.

Al realizar el análisis de varianza de las relaciones de absorbancia, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) solamente entre los métodos 1-2 y 1-4, lo que sugiere que el PEG purifica la muestra. Sin embargo este tratamiento reduce la cantidad de ADN obtenido notoriamente (figura 9, calle 4).

Para los métodos que usan buffer CTAB, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de ellos, ni para la concentración de ácidos nucleicos, ni para la relación de absorbancias.

Por lo tanto, según los datos obtenidos el mejor método de extracción y purificación para maíz es el 1-2, ya que proporciona la muestra más pura y con la mayor concentración, ya que el método 1-1, si bien proporciona una muestra con una alta concentración de ADN, ésta tiene una relación A_{260}/A_{280} baja.

Resultados similares han sido informados por Vanni y col, (2004), al comparar métodos de extracción de ADN que utilizan precipitación con solventes orgánicos con los que usan tratamiento enzimático. Estos autores informan que el tratamiento enzimático no incrementa la pureza del ADN, mientras que determina una importante degradación. Por el contrario la precipitación con solventes aumenta notablemente la pureza, asociada con el mantenimiento de la integridad inicial del ADN. En concordancia con estos datos, en el presente trabajo los mejores métodos resultaron ser los que utilizan purificación con solventes orgánicos. Además los métodos que emplean enzimas (1-5 y 2-4: ARNasa; 2-3: proteinasa K) presenta una relación $A_{260}/280$ baja, aunque un grado de degradación no muy severo (figura 8, calles 5, 10 y 11; figura 9, calles 5,9 y 10).

Tanto en el caso de maíz como de soja, la extracción de ADN con el método de Dellaporta con purificación con fenol / cloroformo tiene bajo rendimiento (datos no mostrados). Estos resultados están en concordancia con lo publicado por Tozzini y col (2000) que utilizan el método de Dellaporta sin purificación para la extracción de ADN de granos.

1.4.3 Amplificación del ADN obtenido a partir de granos de soja y maíz

Para determinar si se hallan presentes inhibidores de PCR en el extracto de ADN purificado y el grado de fragmentación del mismo y así evaluar la distinta cantidad y calidad de ADN obtenida por los diferentes métodos de extracción y purificación utilizados, se diseñó un ensayo basado en la amplificación de genes endógenos de soja y maíz. Análisis similares realizaron Peano y col, (2004), Vanni y col, (2004) y Rogers y col, (1996).

Se utilizaron en cada reacción de amplificación iguales cantidades (20 ng) de dos soluciones de ADN purificadas por cada método en dos extracciones diferentes y de cada una de estas muestras se realizaron PCRs por triplicados. Para las muestras de soja se amplificó el gen de lectina, utilizando el par de primers LE1/LE2 y para las muestras de maíz el gen de invertasa, usando el par de primers IVR1/IVR2. En ambos casos se utilizaron 35 ciclos de amplificación, ya que en este caso no interesa cuantificar el producto de amplificación, sino solamente analizar de forma cualitativa si las muestras poseían una calidad suficiente de ADN e inhibidores de la reacción de PCR para que ocurra la amplificación. Las reacciones se

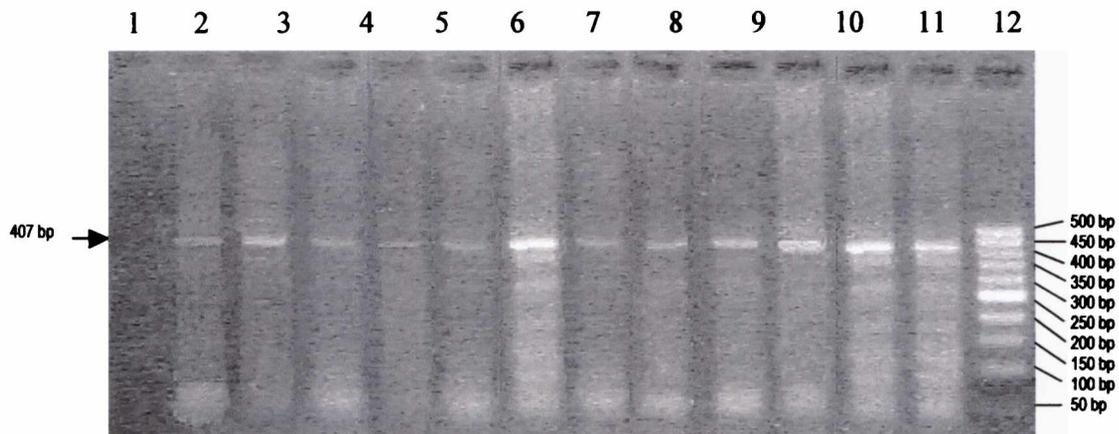


Figura 10: Análisis de los ADN de harina de soja extraído empleando los distintos métodos por PCR. El ADN obtenido fue amplificado con los primers LE1/LE2. Calle1: control de reactivos; Calle 2: EDTA+SDS; Calle 3: EDTA+SDS+P/CL; Calle4: EDTA+SDS+P/CL+glicerol; Calle5: EDTA+SDS+P/CL+PEG; Calle6: EDTA+SDS+P/CL+RNAsa+glicerol; Calle7: EDTA+SDS+P/CL+PEG+glicerol; Calle8: EDTA+SDS+P/CL+hexano Calle9: CTAB; Calle10: CTAB +glicerol; Calle11: CTAB+Prot K +glicerol; Calle12: CTAB+Prot K +RNAsa+glicerol; Calle13: CTAB +hexano; CalleM: marcador de peso molecular

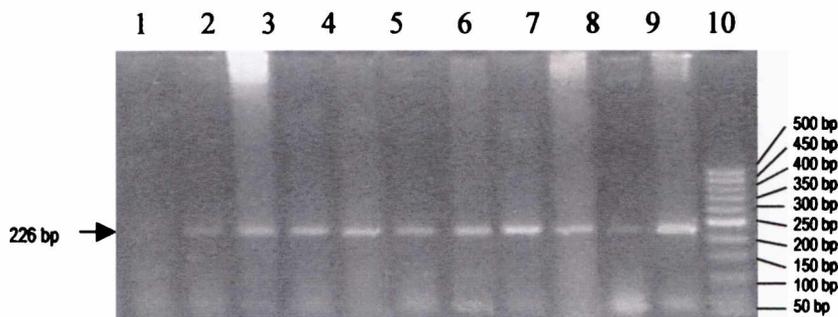


Figura 11: Análisis de los ADN de harina de maíz extraído empleando los distintos métodos por PCR. El ADN obtenido fue amplificado con los primers IVR1/IVR2. Calle1: control de reactivos; Calle2: EDTA+SDS; Calle3: EDTA+SDS+P/CL; Calle4: EDTA+SDS+P/CL+glicerol; Calle5: EDTA+SDS+P/CL+PEG; Calle6: EDTA+SDS+P/CL+RNAsa+glicerol; Calle7: EDTA+SDS+P/CL+PEG+glicerol; Calle8: CTAB; Calle9: CTAB +glicerol; Calle10: CTAB+Prot K +glicerol; Calle11: CTAB+Prot K +RNAsa+glicerol; Calle M: marcador de peso molecular

realizaron utilizando muestras de soja y de maíz extraídas por distintos procedimientos. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 10 y 11.

La figura 10 muestra los resultados obtenidos al amplificar el ADN purificado a partir de harina de soja empleando todos los métodos de extracción utilizados con los primers del gen de lectina de soja. El producto de PCR que se obtiene por el método 1-4 (EDTA, SDS, P/CL, PEG) (figura 10, calle5) es visiblemente más tenue que el obtenido con el resto de las muestras. A pesar de esto, al realizar el análisis de varianza a las intensidades de los productos de PCR obtenidos con los ADN extraídos por los distintos métodos, no se observaron diferencias significativas entre ninguno de ellos.

En la figura 11 se observa que se puede amplificar invertasa de maíz con el ADN obtenido por todos los métodos de extracción y purificación probados. Al realizar el análisis de varianza de las intensidades de los productos de amplificación, al igual que con las muestras de soja, no se observaron diferencias significativas entre ningún método de extracción y purificación analizado.

1.4.4 Amplificación del ADN obtenido de muestras de alimentos

Para el análisis de alimentos procesados, se eligieron algunos que fueran representativos de distintos grupos:

- alimentos con alto contenido proteico: aislados de soja, harina de maíz.
- alimentos con alto contenido de lípidos: mayonesa, aceite.

La obtención de ADN se realizó mediante los métodos 1-1 y 1-2, partiendo de 70 mg de muestra. El ADN extraído fue analizado en gel de agarosa 0,8%, pero sólo fue posible la cuantificación del mismo cuando el ADN fue extraído a partir de harina de maíz (muestra que sólo tiene tratamiento mecánico para su elaboración). En el caso de los otros alimentos no se observaron bandas en el gel de agarosa, por lo que no fue posible cuantificar ADN por este método. Esto puede deberse tanto a que estos alimentos poseen un contenido bajo de ADN, como a que en su procesamiento se produce degradación. Estos resultados son similares a los informados por Peano y col, (2004), que analizan distintos alimentos procesados (galletas de soja y maíz, polenta, tacos y tofu), con cuatro métodos comerciales de extracción [Wizard (Promega), Dneasy Plant Minikit, QIAamp DNA Stool Minikit y Nucleo Spin Food (Macherey-Nagel)]. Por esta razón, con el fin de realizar la cuantificación del ADN extraído de alimentos procesados es necesario realizar la amplificación de los genes endógenos de soja y de maíz del ADN de las muestras de alimentos e interpolar la intensidad del producto de amplificación obtenido en una curva de calibración como se explicará en las secciones 3.6.1 y 3.7.1. Así, el ADN obtenido a partir de matrices alimentarias fue amplificado con primers contra lectina de soja e invertasa de maíz. Al realizar las PCRs con el ADN molde obtenido por el método 1-1, solo se obtuvo el producto de amplificación esperado con la muestra de harina de maíz, (datos no mostrados), y cuando se utilizó el ADN obtenido por el método 1-2, se obtuvieron los resultados que se muestran en las figura 12 y 13.

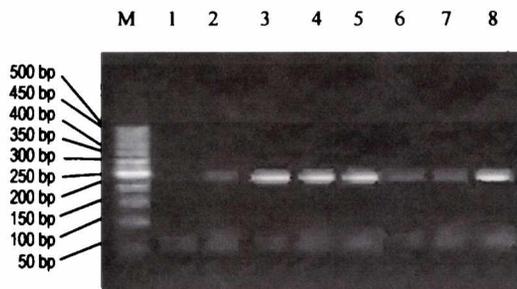


Figura 12: Análisis de invertasa de maíz en alimentos cuando se utilizan 200 ng de ADN molde y el par de primers IVR1/IVR2
 CalleM: marcados de peso molecular; Calle1: control de reactivos de reacción; Calle2: control positivo; Calle3: polenta; Calle4: polenta; Calle5: polenta + 20ng de maíz Bt 176; Calle6: Maizena; Calle7: Maizena; Calle8: Maizena + 20 ng de maíz Bt 176

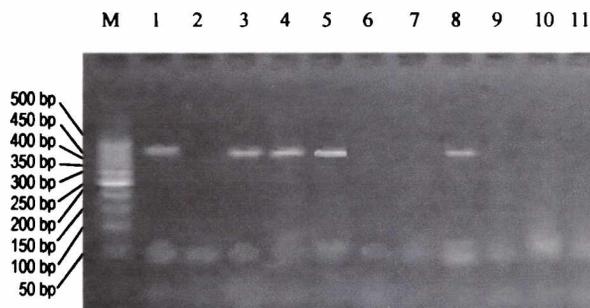


Figura 13: Análisis de lectina de soja en alimentos cuando se utilizan 200 ng de ADN molde y el par de primers LE1/LE2
 CalleM: marcador de peso molecular; Calle1: control positivo; Calle2: control de reactivos de reacción; Calle3: aislado de soja; Calle4: aislado de soja; Calle5: aislado de soja + 20 ng de soja RR; Calle6: aceite de soja; Calle7: aceite de soja; Calle8: aceite de soja + 20 ng de soja RR; Calle9: mayonesa; Calle10: mayonesa; Calle11: mayonesa + 20 ng de soja RR.

En la figura 12 se muestran los resultados obtenidos al amplificar diluciones 1/10 del ADN extraído de polenta y Maizena con el par de primers IVR1/IVR2 empleando las condiciones estándares descritas en el capítulo *Materiales y Métodos* y con 35 ciclos de amplificación. Se realizó un control positivo para cada muestra que consiste en la adición de 20 ng de maíz Bt 176 a la muestra que contiene el ADN extraído de los distintos alimentos. En la figura se observa que fue posible amplificar invertasa de maíz utilizando como molde el ADN obtenido por el método 1-2 en todos los casos probados.

En la figura 13 se muestran los productos de amplificación de PCR utilizando diluciones 1/10 del ADN extraído de aislados, aceite de soja y mayonesa con el par de primers LE1/LE2. También, se realizó un control positivo para cada muestra en el que se agregó 20 ng de soja RR. La figura muestra que se amplifica el gen de lectina en la muestra de ADN preparada a partir de un aislado de soja (calles 3 y 4), pero no en aceite (calles 6 y 7), ni en mayonesa (calles 9 y 10). La ausencia de producto de PCR en la muestra de aceite puede explicarse por la poca cantidad de ADN presente en la muestra de aceite ya que el control de inhibidores de reacción (calle 8) amplifica el fragmento de interés, hecho que pone de manifiesto la ausencia de los mismos. Estos resultados están en concordancia con los de Pauli y col, (1998), Gryson y col, (2002) y Wurz y col, (1998). Para analizar aceite de soja refinado, será necesario entonces, según los resultados obtenidos, partir de una muestra mayor de aceite y así obtener suficiente cantidad de ADN.

El hecho de no obtener amplificación con la muestra de mayonesa (calles 9 y 10), ni en las reacciones que contienen las muestras a analizar, ni en el control de inhibidores de PCR (calle 11), sugiere que el método de extracción y purificación utilizado no remueve de manera eficiente a estos últimos. Esta suposición se confirmó agregando 20 ng de ADN de soja RR a mezclas de reacción conteniendo distintas diluciones del ADN extraído de mayonesa, no observándose amplificación (datos no mostrados). Este

resultado sugiere que debería utilizarse un método de purificación que elimine adecuadamente los inhibidores para este tipo de muestra.

Debido a que con el método 1-2 se pudo amplificar el gen de interés en muestras representativas de alimentos ricos en proteínas y lípidos, salvo en casos particulares como mayonesa y aceite refinado de soja, (donde es necesario usar otro método de purificación o partir de mayor cantidad de muestra respectivamente, con el consecuente encarecimiento y enlentecimiento del proceso), y teniendo en cuenta además que uno de los objetivos de esta tesis es desarrollar un método económico y rápido, en lo sucesivo se utilizará el método 1-2 para la extracción y purificación de ADN de alimentos procesados.

1.5 CONCLUSIONES

En esta parte del trabajo se analizaron distintos métodos de extracción que utilizan como base el procedimiento de Dellaporta y col., (1983) o el de Doyle y Doyle (1987), combinados con tratamientos con solventes orgánicos y tratamientos con enzimas. La efectividad de estos métodos se evaluó analizando la integridad y la pureza del ADN obtenido, el rendimiento del procedimiento y la capacidad del ADN obtenido de ser amplificado. Se observó que los rendimientos de extracción fueron siempre superiores al emplear métodos basados en el procedimiento de Dellaporta que los que empleaban el buffer CTAB tanto cuando se preparaba ADN a partir de muestras de granos como de alimentos procesados. Este método, combinado con extracciones con fenol/cloroformo y con hexano (en el caso particular de granos de soja), permite obtener ADN de mayor pureza sin incrementar el grado de cizallamiento del mismo. Los rendimientos de extracción obtenidos son en general bajos en relación al contenido de ADN de las distintas muestras.

Los ADNs preparados a partir de muestras de semillas por los distintos métodos fueron utilizados como molde en PCRs empleando primers específicos contra genes endógenos de soja y maíz, observándose la presencia de producto de amplificación independientemente del método de extracción y purificación, no habiendo diferencias significativas para la intensidad de producto de PCR obtenido. Este resultado indica que en el caso de muestras de semillas no es necesario emplear métodos de purificación.

Por el contrario cuando se investiga invertasa de maíz y lectina de soja en alimentos, los resultados obtenidos dependen del tipo de alimento que se analiza. El método de extracción de Dellaporta sin purificación sólo puede utilizarse en alimentos cuya composición es parecida a la de los granos de maíz o soja molidos, como es el caso de la polenta, que consiste en una harina de maíz. En el resto de los alimentos analizados en este capítulo no ha sido posible obtener amplificación al emplear el mencionado método.

En el caso de alimentos con algún grado de procesamiento como los aislados de soja se amplifica el fragmento deseado únicamente cuando el ADN se extrae por el método Dellaporta con purificación con fenol / cloroformo. En los alimentos con alto contenido de lípidos como es el caso de la mayonesa es necesario utilizar un método de obtención de ADN con un mejor procedimiento de purificación, ya que no se amplifica el fragmento de interés ni en los tubos con muestra ni en el control de inhibidores de PCR. En alimentos con muy bajo contenido de ADN, como es el caso de aceites refinados de soja, se observa amplificación en el control de inhibidores de la reacción no ocurriendo lo mismo en las muestras. Este resultado sugiere que es necesario partir de una mayor cantidad de muestra para obtener suficiente cantidad de ADN para realizar la reacción de PCR con la sensibilidad adecuada para cumplir con las normas vigentes de etiquetado de OGMs.

Todo esto sugiere, que el mejor método de extracción y purificación, que sirva tanto para maíz como para soja, y tanto para granos como para alimentos procesados, a excepción de casos particulares de los mismos, es el método Dellaporta con purificación con fenol / cloroformo.

CAPÍTULO 2:
OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE
REACCIÓN DE PCR

2.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han incorporado en las legislaciones de distintos países, valores umbrales que determinan si un producto debe ser considerado OGM. Además se han establecido normas que rigen el transporte de OGMs a través de fronteras, por lo que entidades dependientes de gobiernos, industrias de alimentos, laboratorios de análisis y productores han empezado a desarrollar una metodología que permita el análisis de los mismos (Ahmed, 2002). La técnica más utilizada es la PCR, debido a su mayor sensibilidad con respecto a los métodos de detección de proteínas y a que el ADN tiene mayor estabilidad térmica que éstas últimas, las que al ser sometidas a tratamientos térmicos sufren cambios conformacionales que modifican su reactividad frente a anticuerpos (van Duijn y *col*, 2002).

Como se mencionó anteriormente, la reacción de PCR se basa en la complementariedad de las dos cadenas de ADN. Se pueden realizar distintas reacciones de PCR dependiendo del requerimiento del análisis. Si se tiene en cuenta la secuencia blanco de la PCR, ésta puede clasificarse como: métodos específicos de especie, métodos de screening y métodos específicos de OGM (ISO 21569, 2002). Los métodos específicos de especie se utilizan para confirmar la presencia y la calidad (amplificabilidad) del ADN extraído de las muestras. Los métodos de *screening* se basan en la detección de las secuencias regulatorias más comunes, como por ejemplo, el promotor 35S y la secuencia terminadora NOS. Finalmente los métodos específicos de OGM detectan e identifican las distintas líneas transgénicas (Querci y Mazzara, 2002).

La presente sección tiene como objetivo ajustar las condiciones de reacción de PCR para desarrollar una metodología que permita determinar la presencia de OGM en forma semicuantitativa y con una sensibilidad adecuada. Habitualmente la reacción de PCR no es cuantitativa, ya que durante los ciclos tardíos se produce una atenuación del crecimiento de la velocidad de acumulación de producto, inicialmente exponencial, debido a que se empiezan a agotar algunos de los sustratos junto con la producción de productos no específicos, lo que determina que no haya una correlación entre el número de moléculas iniciales de ADN blanco y la cantidad de producto obtenido (Innis y *col*, 1990). Sin embargo, si se reduce el número de ciclos de amplificación es posible encontrar un rango de linealidad entre el número de copias de ADN blanco y la cantidad de producto obtenido.

2.2 ELECCIÓN DE PRIMERS

Para la elección de los pares de primers a utilizar en las distintas PCRs se tuvieron en cuenta distintos factores:

1. el tamaño de ADN de los alimentos procesados
2. las características de los eventos de maíz y soja autorizados para la introducción en el mercado en la Unión Europea y en Argentina.
3. la existencia de distintos sistemas de PCR propuestos por diferentes entidades.

2.2.1 Tamaño del ADN en los alimentos procesados

Ya que el objetivo inicial de este trabajo es desarrollar métodos para determinar en forma semicuantitativa OGMs en alimentos procesados, y es sabido que como resultado de los diferentes procesamientos que se aplican a los alimentos el ADN se fragmenta y sufre reacciones de deterioro, se eligieron primers que amplificaran fragmentos pequeños de ADN, con lo que se aumentaría la probabilidad de encontrar el blanco deseado en el alimento en estudio (Hupfer y *col*, 2000; ILSI, 2001; Meyer, 1999;

Hupfer y col, 1999). Además, se tuvo en cuenta que los productos de la reacción de PCR con los diferentes primers pudieran ser resueltos en un gel de agarosa 2,5%.

2.2.2 Características de los eventos de maíz y soja autorizados en la Unión Europea y Argentina

Existen cuatro eventos de maíz y uno de soja transgénicos aprobados para ser comercializados en la UE, los mismos también están autorizados en Argentina (tabla 15). Como consecuencia, es esperable hallar derivados de estos cultivos en los alimentos, por lo que para su detección y cuantificación se deben utilizar primers que amplifiquen secuencias propias de estos eventos, como por ejemplo secuencias promotoras, del gen introducido y de terminación de la transcripción, etc..

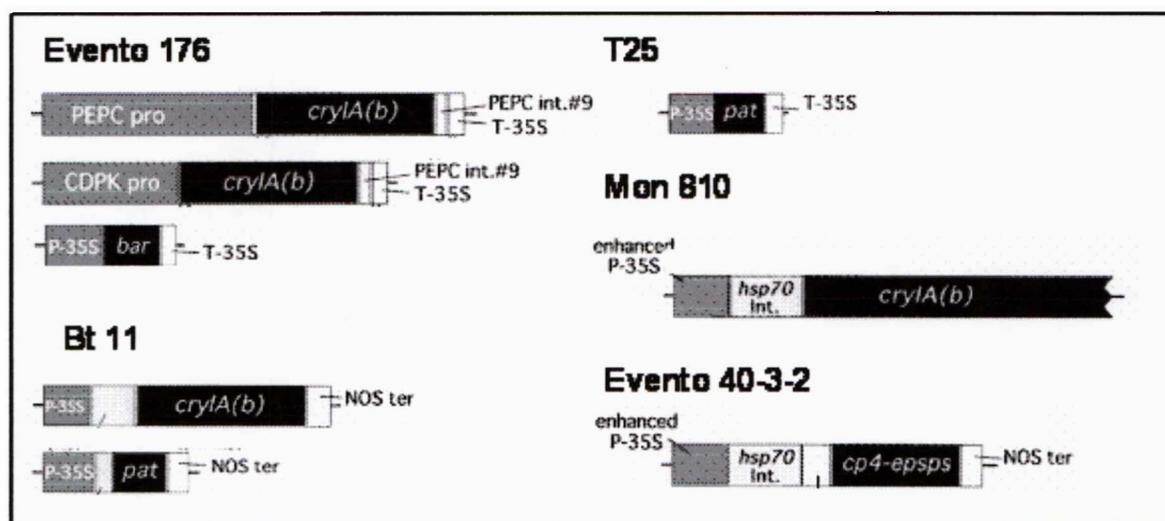


Figura 14: Representación esquemática de las construcciones de las distintas líneas aprobadas. El significado de las abreviaturas utilizadas se indica al pie de la Tabla 15. Tomado de Matsuoka y col, (2002).

Tabla 15: Características de las líneas de maíz y soja autorizadas para la introducción en el mercado de la Unión Europea y Argentina

Cultivo	Nombre	Compañía	Carácter ¹	Promotor ²	Genes y secuencias intrónicas introducidas ³	Terminador ⁴
Maíz	Evento Bt 176	Ciba-Geigy	Bt, bar	P-35S	bar	T-35S
	Línea T 25	Agr Evo	pat	P-35S	pat	T-35S
	Línea Bt 11	Novartis	Bt, pat	P-35S	cryIA(b)/intI V56	T-nos
	Línea MON 810	Monsanto	Bt	E35S	cryIA(b)/int hsp70	-
	Línea MON 810	Monsanto	Bt	E35S	cryIA(b)/int hsp70	-
Soja	Evento 40-3-2 o soja RR	Monsanto	Glifosato	2-E35S	CTP4/CP4 EPSPS	T-nos

1. **Bt**: resistencia a lepidóptero, otorgada por el gen cry IA(b); **bar**: tolerancia a glufosinato de amonio otorgada por el gen de la fosfotricinacetiltransferasa de *Streptomyces higroscopicus*; **pat**: tolerancia a glufosinato de amonio otorgada por el gen de la enzima fosfotricinacetiltransferasa de *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu 494; **Glifosato**: resistencia a glifosato otorgada por el gen CP4 EPSPS.

2. **P-35S**: secuencia promotora del ARN 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV); **PEPC**: promotor de la fosfoenolpiruvatocarboxilasa de maíz; **CDPK**: promotor de la proteinquinasa de maíz; **E35S**: enhancer del promotor CaMV constitutivo del virus del mosaico del coliflor; **2-E35S**: indica una versión duplicada del enhancer del promotor CaMV 35S.
3. **bar**: gen de la fosfotricinacetiltransferasa de *Streptomyces higroscopicus*; **cryIA(b)**: gen sintético, derivado de *Bacillus thuringiensis ssp kurstaki* cepa HD-1 que codifica para una forma truncada de la δ -endotoxina CRYIA(b) que otorga resistencia a la larva del barrenador del maíz europeo; **CTP4**: secuencia de direccionamiento a cloroplastos de la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfosintetasa (EPSPS) de *Petunia hybrida*; **CP4 EPSPS**: gen que codifica para la enzima EPSPS de *Agrobacterium tumefaciens* cepa CP4 que otorga tolerancia a glifosato.
4. **T- nos**: secuencia de terminación de la transcripción del gen codificante para nopalina sintetasa (nos), derivado de *Agrobacterium tumefaciens*. **T-35S**: secuencia de terminación de la transcripción derivada del virus del mosaico del coliflor

2.2.3 Sistemas de PCR propuestos por diferentes entidades y autores

Al inicio de este trabajo no existía ninguna norma oficial que estableciera las condiciones en que debía realizarse la reacción de PCR para amplificar secuencias específicas de especie, secuencias de screening y secuencias evento específicas en maíz y soja. Distintas instituciones, como la Comisión del Codex Alimentarius, la International Standard Organization (ISO), el Joint Research Center (JRC, Ispra, Italia), y distintos autores proponían diferentes primers para llevar a cabo las reacciones antedichas (tabla 16 y 17).

Para el análisis del promotor CaMV35S, tanto Codex como la norma ISO 21569 y el JRC proponen los pares de primers: p35S-cf 3/ p35S-cr4, que amplifica un fragmento de la secuencia de este promotor de 123 bp. Los primers 35S1/35S2 propuestos por Pietsch y col (1997), amplifican también una secuencia de este promotor de 195 bp. El par p35S-cf 3/ p35S-cr4 es propuesto por la ISO para alimentos procesados y el par 35S1/35S2 para alimentos crudos y procesados.

Tabla 16 : Pares de primers sugeridos por distintas instituciones para la detección de soja RR

Primer	Nº de acceso en el GenBank	Especificidad	Amplicón (bp)	Recomendado por	Alimento al que se aplica
Métodos específicos de especie					
LE1 5'-AAGCAACCAACATGATCCTC-3'	K00821 (Vodkin y col, 1983)	Gen de lectina de soja (Le1)	407	(Gachet y col, 1999)	
LE2 5'-ATGGATCTGATAGAATTGACGTTA-3'					
GMO3 5'-GCCCTCTACTCCACCCCATCC-3'	K00821 (Vodkin y col, 1983)	Gen de lectina de soja (Le1)	118	- JRC (Meyer y col, 1996) - ISO 21569	
GMO4 5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTTGTG-3'					
Métodos de screening					
P35S-c f 3 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'	V 00141	Promotor CaMV35S	123	- Codex - JRC (Lipp y col, 2001) - ISO 21569	→ Procesado
p35S-c r 4 5'-TCCTCTCCAATGAAATGAACTCC-3'					
35S-1 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'	V 00141	Promotor CaMV35S	195	- Codex -ISO 21569	→ Crudo y procesado
35S-2 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'					
					(Pietsch y col, 1997)

Métodos específicos de transgen

GMO9 5'-CATGAAGGACCGGTGGGAGAT-3' GMO5 5'-CCACTGACGTAAGGGATGACG-3'		Secuencia del gen CP4 EPSPS y el promotor CaMV35S	447	- JRC (Meyer y Jaccaud, 1997)	
GMO8 5'-TGGGGTTTATGGAAATTGGAA-3' GMO7 5'-ATCCCACTATCCCTCGCAAGA-3'		Gen EPSPS petunia y promotor CaMV35S	169		
GMO8 5'-TGGGGTTTATGGAAATTGGAA-3' GMO7 5'-ATCCCACTATCCCTCGCAAGA-3'		Gen EPSPS petunia y promotor CaMV35S	169	(Meyer y Jaccaud, 1997)	
35S-f2 5'-TGATGTGATATCTCCACTGACG-3' petu-r 1 5'-TGTATCCCTTGAGCCATGTTGT-3'	V 00141 J 02048	Segmento que representa la región de unión entre el promotor CaMV35S y la secuencia del cloroplasto de <i>Petunia hybrida</i> que precede a la secuencia EPSPS de <i>Agrobacterium</i>	172	- ISO 21569 - Codex	Crudo y procesado

En la tabla 16 se observa que tanto el JRC como la ISO proponen para detectar la presencia de soja, el uso de primers especie específicos que amplifican el gen de lectina (primers denominados GMO3/GMO4 que amplifican una secuencia de 118 bp). Gachet y col, (1999), proponen el par de primers LE1/LE2 para amplificar una secuencia de 407 bp de este mismo gen. La Comisión del Codex Alimentarius no propone ningún primer especie específico para soja.

Para la evaluación del transgen que otorga tolerancia al glifosato a la soja RR, la JRC propone un sistema nested de PCR con los pares de primers GMO9/GMO5 que amplifican una secuencia que abarca parte del promotor CaMV35S y del gen CP4 EPSPS dando un producto de 447 bp seguido luego de una reamplificación con los primers internos GMO7/GMO8 que también amplifican un fragmento interno de 169 bp. Tanto el Codex como la norma ISO 21569 recomiendan el uso de los primers 35S-f2/petu-r1 que amplifican un segmento dentro de esta misma región (unión entre el promotor CaMV35S y la secuencia de direccionamiento a cloroplasto que precede a la secuencia EPSPS) de 172 bp. Meyer y Jaccaud, (1997), proponen el par de primers GMO7/GMO8, que amplifica el fragmento de 169 bp antes mencionado. El método propuesto por el JRC, al ser una nested-PCR, tiene mayor sensibilidad que el propuesto por la ISO, ya que utiliza dos juegos de primers que hibridizan uno dentro del otro.

Tabla 17: Pares de primers sugeridos por distintas entidades para líneas de maíz

Primer	Nº de acceso en el Gen Bank	Especificidad	Amplicón (bp)	Recomendado por	Alimento al que se aplica Fuente:ISO21569
Métodos específicos de especie ZEIN 3 5'- AGTGGACCCATATTCAG-3' ZEIN 4 5'- GACATTGTGGCATCATTT-3'	M23537	Gen Zein de maíz (Ze1)	277	- JRC (Studer y col, 1997)	

IVR1 5'-CCGCTGTATCACAAGGGCTGGTACT-3' IVR2 5'-GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC-3'	Nº U 16123	Gen de invertasa de maíz	226	- ISO 21569 - (Ehlers y col, 1997)	→ Ingredientes alimentarios
Métodos de screening					
P35S-c f 3 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' p35S-c r 4 5'-TCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCC-3'	A18053	Promotor CaMV35S	123	- Codex - JRC (Lipp y col, 2001)	→ Procesado
35S-1 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3' 35S-2 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'	A18053	Promotor CaMV35S	195	- Codex - ISO 21569 - (Pietsch y col, 1997)	→ Crudo y procesado
Métodos específicos de OGM					
Detección del gen sintético cryIA(b) de maíz Bt 176, Bt11 y MON 810					
CRYIA 1 5'-CGGCCCCGAGTTCACCTT-3' CRYIA 2 5'-CTGCTGGGGATGATGTTGTTG-3'		Gen cryIA(b)	420	- JRC (Studer y col, 1997)	
CRYIA 3 5'-CCGCACCCTGAGCAGCAC-3' CRYIA 4 5'-GGTGCCACGTTGTTGTTCTGA-3'			189		
CRY03 5'-CTCTCGCCGTTTCATGTCCTG-3' CRY04 5'-GGTCAGGCTCAGGCTGATGT-3'	Nº I 41419	Región de unión del promotor CDPK de Zea mays y el gen de cryIA(b) sintético.	221	- ISO 21569 - Codex	→ Crudo y procesado
CRY1 5'-ACCATCAACAGCCGCTACAACGACC-3' CRY2 5'-TGGGGAACAGGCTCAGCATGTCCAG-3'		Gen cryIA(b)	184	(Ehlers y col, 1997)	
CRY05 5'-CTCTCGCCGTTTCATGTCCTG-3' CRY06 5'-GGTCAGGCTCAGGCTGATGT-3'			134	- Codex	
Q-Cry2-F 5'-CCCATCGACATCAGCCTGAGC-3' Cry2-R+BTSYN 5'-CAGGAAGGCCGCCACTGGC-3'			129	- Codex	
Detección del cassette promotor E35S/exón-intrón hsp 70 del maíz MON 810					
mg1 5'-TATCTCCACTGACGTAAGGATGAC-3'		- Promotor E35S	401		
mg2 5'-TGCCCTATAACCAACATGTGCTT-3'		- Región 1 del intrón hsp 70			
mg3 5'-ACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTC-3'		- Promotor E35S	149	- JRC (Zimmermann y col, 1998)	
mg4 5'-GCATTGAGAGAAACGTGGCAGTAAC-3'		- Región 1 del exón hsp 70			
VW01 5'-TCGAAGGACGAAGGACTCTAACG-3' VW03 5'-TCCATCTTTGGGACCACTGTCG-3'	J 02048	Segmento que representa la región de unión entre ADN genómico del sitio de integración y el promotor CaMV35S	170	- ISO 21569 - Codex	→ Crudo

Los distintos juegos de primers sugeridos para maíz se presentan en la tabla 17. El JRC propone el par de primers ZEIN3/ZEIN4 que amplifica el gen Ze1 de maíz, obteniéndose como resultado un fragmento de 277 bp. Las normas ISO y Ehlers y col, (1997), sugieren el par de primers IVR1/IVR2 que amplifica una parte de la secuencia del gen de invertasa de maíz dando un fragmento de amplificación de 226 bp. En cambio la comisión del Codex Alimentarius no propone ningún par de primers para la detección de taxón de maíz. Los primers propuestos como *screening* de OGM son los mismos tanto para maíz (tabla 17), como para soja (tabla 16).

Para la detección específica del transgen en los distintos eventos de maíz aprobados que poseen genes codificantes para la toxina de *Bacillus thuringiensis* también se han propuesto distintos juegos de primers (tabla 17). El JRC propone un sistema nested de PCR que utiliza los primers CRYIA1/CRYIA2 y CRYIA3/CRYIA4 para amplificar la secuencia del gen cryIA(b) de maíz Bt 176 dando fragmentos de 420 y 189 bp respectivamente. La ISO propone el par de primers CRY03/CRY04 que amplifican la región de unión del promotor CDPK derivado de *Zea mays* y el gen cryIA(b) sintético dando un fragmento de 221 bp. Estos primers pueden ser utilizados tanto en alimentos crudos como procesados. La comisión del Codex Alimentarius propone también los mismos primers que la ISO y además propone otros dos pares de primers: CRY05/CRY06 que amplifica un fragmento de 134 bp y Q-Cry2-F/ Cry2-R+BTSYN que amplifica un fragmento de 129 bp. Ehlers y col,(1997), proponen el par CRY1/CRY2 que amplifica un fragmento de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* de 184 bp para la detección del transgen de MON 810. El JRC propone el sistema nested de PCR con los pares de primers mg1/mg2 y mg3/mg4 que amplifican fragmentos de 401 bp y 149 bp respectivamente. La ISO y el Codex recomiendan para este transgen el par de primers VW01/VW02 que amplifica el segmento que representa la región de unión entre el ADN genómico del sitio de integración y el promotor CaMV35S dando un fragmento de amplificación de 170 bp.

En relación a la amplificación del promotor 35S, que se utiliza como se explicó anteriormente, en los métodos de *screening* de soja y maíz es importante remarcar en primer lugar que existen al menos ocho variantes diferentes de promotores 35S utilizados en cultivos GM (Anklam y Neumann, 2002), y en segundo lugar, que algunas construcciones comerciales con nombres idénticos suelen tener secuencias diferentes como ha sido informado por Matzuoka, (2002), al analizar distintas variantes de maíz GM comerciales. Estas diferencias entre las secuencias blancos y primers pueden modificar las condiciones de reacción, lo que afecta los límites de detección y dificulta el establecimiento de métodos cuantitativos de detección.

2.2.4 Primers elegidos para utilizar en el presente trabajo

En la actualidad, existe una gran diversidad de primers para el análisis de material GM, y su número se incrementará a medida que se aprueben nuevos OGMs. Los primers utilizados en este trabajo se presentan en la tabla 18: 35S1/35S2 (Pietsch y col, 1997); LE1/LE2 (Gachet y col, 1999); IVR1/IVR2 y CRY1/CRY2: (Ehlers y col, 1997) y GMO7/GMO8 (Meyer y Jaccaud, 1997). Los primers 35S1/35S2 son recomendados por el Codex y la ISO; los IVR1/IVR2 únicamente por la ISO y los GMO7/GMO8 por el JRC. Las figuras 15, 16, 17, 18 y 19, muestran las secuencias blanco de estos primers.

Tabla18: Primers utilizados en las reacciones de PCR de este trabajo

Primer	Secuencia de 5' a 3'	Secuencia blanco	Producto de amplificación	Tipo de método
IVR1	5'-CCGCTGTATCACAAAGGGCTGGTACC-3'	Gen codificante para invertasa de maíz	226 bp	Específico de especie
IVR2	5'-GGAGCCCGTGTAGAGCATGACGATC-3'			
LE1	5'-AAGCAACCAAACATGATCCTC-3'	Gen codificante para lectina de soja	407 bp	Específico de especie
LE2	5'-ATGGATCTGATAGAATTGACGTTA-3'			
35S-1	5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'	Promotor CaMV 35S	195 bp	Screening
35S-2	5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'			
GMO7	5'-ATCCCACTATCCTTCGCAAGA-3'	Gen codificante para EPSPS	169 bp	Específico de Transgen
GMO8	5'-TGGGGTTTATGGAAATTGGAA-3'			
CRY1	5'-ACCATCAACAGCCGCTACAACGACC-3'	Gen codificante para CryIA(b)	184 bp	Específico de transgen
CRY2	5'-TGGGGAACAGGCTCACGATGTCCAG-3'			

Para amplificar lectina de soja se decidió utilizar el par de primers LE1/LE2 propuesto por Gachet y *col.*, (1999). Esta elección se debió a que si bien este último par de primers amplifica un fragmento de 407 bp, más grande que el amplificado por el par de primers GMO3/GMO4, este tamaño está dentro del orden esperado para el ADN de alimentos procesados (Meyer, 1999). Si ocurre amplificación del gen de lectina implica que el ADN del alimento, si sufrió rupturas aún posee fragmentos de tamaños de hasta 400 bp, lo que asegura que también estarán presentes fragmentos de 123 y 195 bp, como son los necesarios para detectar promotor CaMV 35S por los métodos de screening.

Para el análisis de invertasa de maíz se eligió el par de primers IVR1/IVR2 que amplifica un fragmento de menor tamaño (226bp) que el del otro juego de primers propuestos (Zein3/Zein4, 277 bp) y que también permite asegurar la presencia de ADN de tamaño suficiente para amplificar el promotor CaMV 35S.

Como método de screening, (tanto en soja como en maíz), se eligió el par de primers 35S1/35S2 porque a pesar de ser el que amplifica el fragmento más grande, es el más ampliamente utilizado (Pietsch y *col.*, 1997; Hübner y *col.*, 2001; Tozzini y *col.*, 2000). Además, según la norma ISO se puede utilizar tanto para alimentos crudos como para procesados, en tanto que el par de primers p35S-cf3 y p35S-cr4 es recomendado por la misma entidad para alimentos procesados solamente.

La región promotora P-35S se encuentra en la secuencia nucleotídica de los eventos Bt 176, Bt 11, T 25, MON 810 y GTS 40-3-2, pero Matzuoka y *col.*, (2002), han observado algunas diferencias entre ellos. Aún así, el par de primers 35S1/35S2 elegido para ser utilizado en este trabajo permite amplificar el fragmento de 195 bp en todas las líneas transgénicas aprobadas para su comercialización.

Para el análisis del transgen de soja se decidió utilizar el par de primers GMO7/GMO8 propuesto por Meyer y Jaccaud, (1997), ya que el método propuesto por la JRC es una nested-PCR, (lo que hace que se

requiera más tiempo para el análisis) y en este trabajo vamos a utilizar una PCR simple. El par de primers propuesto por la norma ISO 21570 y el Codex (35S-f2/petu-r1) amplifica un fragmento más grande que el amplificado por los primers escogidos en este trabajo.

Para la detección del gen cryIA(b), se eligió el par de primers CRY1/CRY2 porque amplifica también un fragmento pequeño (184bp), y al momento de la elección había sido utilizado con éxito en alimentos procesados (Hupfer, 1998; Hurst y col, 1999). El gen cryIA(b) derivado de *B. thuringiensis subesp. Kurstaki* está presente en los Eventos Bt176, Bt11, MON810, aunque existen algunas diferencias de secuencia entre estas líneas, ya que difieren en el uso de codones y en el tamaño del inserto (Matzuoka, 2002).

El mayor uso de los genes cry es en maíz y en algodón. A pesar de que hay variedades comerciales de maíz que expresan las proteínas Cry1Ab, Cry1Ac y Cry9C, la mayor parte de los maíces obtenidos por biotecnología que se comercializan expresan Cry1Ab. Cuatro eventos de maíz comerciales han sido aprobados para exportar a la EU (Bt176, MON810, Bt11, T25) y tres de los cuatro expresan la proteína Cry1Ab. Otros maíces obtenidos por biotecnología han sido aprobados en USA, o están en distintos estadios de aprobación (CBH351, DBT418, GA21, MON810, NK603). Un caso particular es el maíz StarLink de Aventis (evento CBH351) que expresa las proteínas Bt Cry9C y PAT, y el maíz Roundup Ready GA21. Ambos eventos han estado en producción comercial en USA. El GA21 está aprobado para ser importado dentro de la UE. El maíz StarLink no está aprobado ni en la UE ni en Japón. La presencia de todas éstas variantes de maíz hace que para detectar y cuantificar maíz transgénico se deba utilizar un mayor número de primers. A pesar de esto, el par de primers CRY1/CRY2 utilizado en este trabajo amplifica el fragmento de 184 bp en las tres líneas de maíz mencionadas (Bt176, Bt11, MON810).

Tanto los primers utilizados para amplificar invertasa de maíz como los usados para amplificar lectina de soja, están diseñados en una zona codificante conservada del gen correspondiente. Utilizando esta zona se buscaron secuencias homólogas empleando el BLAST (Altschul y col, 1997), observándose que el par de primers IVR1/IVR2 podría amplificar secuencias similares en arroz, situación que puede ocurrir en los alimentos procesados, en los que hay una mezcla de ingredientes. Esto implicaría que la utilización del par de primers IVR1/IVR2 en alimentos pueda sobrestimar la cantidad de ADN de maíz presente en el alimento, lo que produciría una subestimación del contenido de OGM si el mismo se expresa en relación a la cantidad de ADN de maíz.

```

1  ccgctgtatcacaagggtgtaccacctcttctaccagtggaacccggactccgcgta
      IVR1
61  tggggcaacatcacctggggccacgccgtctcgcgcgacctcctccactggctgcacct
122  ccgctggccatggtgcccgatcaccgtagcagcgaacggcgtctggtccgggtcggc
182  acgcgcctgcccgacggccggatcgctcatgctctacacgggctccacggcggagtcgctcg
      IVR2
242  gcgcaggtgcagaacctcgcgagccggccgacgcgctccgacctgctgctgctgctgctg
302  gtcaagtcggacgccaacccggtgctggtgcccgc

```

Figura 15: Secuencia parcial del gen de invertasa de maíz en la que se señalan las regiones de apareamiento de los primers IVR1 y IVR2 tomando la numeración correspondiente al primer nucleótido de la región codificante (Nº de acceso en el GenBank: U 16123).

```

133 ccgagcaaccaaacatgatcctccaaggagacgctattgtgacctcctc
      LE1
183 gggaaagttacaactcaataaggttgacgaaaacggcaccctcaaacct
233 cgtctcttggtcgcgcctctactccacccccatccacatttgggacaaa
283 gaaaccggtagcgttgccagcttcgccgcttccttcaacttcaccttcta
333 tgcccctgacacaaaaaggcttgacagatgggcttgcttctttctcgcac
383 caattgacactaagccacaaacacatgcaggttatcttggcttttcaac
433 gaaaacgagctcgtgatcaagtcgctcgtgttgagttgacactttccg
483 gaactcttgggatccaccaaaccacacatcggaat taacgtcaattcta
      LE2
533 tcagatccatcaaaacgacgtcttgggatttgccaacaataaagtagcc
      LE2
583 aaggttctcattacctatgatgcctccaccagcctcttggttgcttctt

```

Figura 16: Secuencia parcial del gen de lecitina de soja en la que se señalan las regiones de apareamiento de los primers LE1 y LE2 tomando la numeración correspondiente al primer nucleótido de la región codificante (Nº de acceso en el GenBank: K00821)

El análisis de homología de la parte de la secuencia del gen de lecitina amplificada por el par de primers LE1/LE2 con las secuencias de ADN del Genbank muestra que solamente amplificarán el gen de lecitina de soja, por lo que el uso de estos primers en alimentos procesados detectará y cuantificará ADN de soja en forma específica.

```

1021 acctcctcggattccattgccagctatctgtcacttcatcgaaaggacagtagaaaagg
1081 aaggtgg ctcctacaaatgccatcattgcgataaaggaaaggctatcattcaagatgcct
      35S1
1141 ctgccgacagtggtcccaaagatggacccccaccacgaggagcatcgtggaaaagaag
1201 acgttccaaccacgtcttcaaagcaagtggttgatgtgacatctccactgacgtaaggg
1261 atgacgcacaatcccactatccttcgcaagacccttcctctatataaggaagttcatttc
      35S2
1321 attggagaggacacgctgaaatcaccagctctctctataaatctatctctctctat
1381 aacc

```

Figura 17: Secuencia parcial del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV), en la que se señalan las regiones de apareamiento de los primers 35S1 y 35S2 (Nº de acceso en el Genbank: A18053)

El par de primers 35S1/35S2 (Pietsch y *col.*, 1997) permite la amplificación de una secuencia de 195 bp del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (P-35S). Algunas de las líneas transgénicas aprobadas poseen una versión mejorada de este promotor (e-P-35S) que contiene una secuencia de nucleótidos duplicada (posiciones 1116-1368) del P-35S, descrito con el número de acceso del GenBank AF078810 (Fischhoff y *col.*, 1996). Esta secuencia posee un segundo sitio de apareamiento para el primer 35S-1, produciéndose la amplificación de un fragmento de 457 bp junto con el de 195 bp. El análisis de homología de secuencia en el BLAST muestra que este par de primers puede amplificar secuencias provenientes del virus del mosaico del coliflor que puede encontrarse infectando crucíferas como la colza y el brócoli.

```

551 tcgacgccgccaacatcaacagccgctacaacgacctgaccgacctgatcggaactaca
      CRY1
611 ccgaccacgccgtgcgctggtacaacaccggcctggagcgctgtgggggtcccgacagcc
671 gcgactggatcaggtacaaccagttccgcccgcgagctgaccctgaccgtgctggacatcg
      CRY2
731 tgagcctggtccccaactac
      CRY2
    
```

Figura 18: Secuencia parcial del fragmento de δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* en la que se señalan las regiones de apareamiento de los primers CRY1 y CRY2 tomando la numeración correspondiente al primer nucleótido de la región codificante (Nº de acceso en el GenBank: I41419)

El mismo análisis realizado para los genes cryIA(b) presentes en los maíces Bt176, Bt11, MON810, no mostró homología con otros genes diferentes al cryIA(b), por lo que la amplificación es específica, debido a esto, otras endotoxinas de la familia cry no interfieren en la determinación con este juego de primers. El gen EPSPS presente en la soja RR no muestra homología con otras secuencias, por lo que el método es también adecuado.

Este análisis se realizó utilizando la información existente actualmente en las bases de datos mencionadas, y se debe tener en cuenta que, en algunos años habrá mayor información sobre secuencias de ADNs de otros cultivos, lo que permitirá nuevos análisis para determinar la presencia de otras secuencias amplificables por los primers IVR1/IVR2. Con la información disponible actualmente estos primers amplificarían el gen de invertasa de maíz y arroz (ambas monocotiledóneas) y es muy probable que también amplifique el mismo gen de otras monocotiledóneas de las que actualmente no existen secuencias disponibles en el Genbank.

```

1951 aaacaagaaaacttgaagatttaggaacttggggtttatggaaattggaa
      GMO8
2001 ttgggattaagggtttgatcccttgagccatggttgtaatttggtgccat
2051 tcttgaaagatctgctagagtcagcttgctcagcgtgtcctctccaaatga
2101 aatgaacttcttatatagaggaagggctctgccaagatagtgggattg
      GMO7
2151 tgcgtcatcccttacgtcagtgagatatcacatcaatccacttgctttg
    
```

Figura 19: Secuencia parcial del transgen EPSPS de la soja RR de Monsanto de acuerdo a la patente WO 92/04449, en la que se señalan las regiones de apareamiento de los primers GMO7/GMO8.

2.3 AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN DE PCR

Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizaron las condiciones de reacción recomendadas por el fabricante de la polimerasa (Life Technologies, 2000).

Para las condiciones del ciclado, se utilizaron los programas presentados en la tabla 12 de la sección de *Materiales y Métodos*. Uno de los inconvenientes de utilizar ADN cromosomal como molde es que es más difícil de desnaturalizar que el plasmídico debido a su gran tamaño. Por este motivo algunos autores realizan una desnaturalización previa a la reacción de PCR, mientras que otros modifican la duración de la etapa inicial de las reacciones de PCR. En este trabajo se analizaron ambas estrategias obteniéndose mejores resultados con la segunda, por lo que en todas las reacciones de PCR realizadas se utilizó una desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos. Este tratamiento inicial también es recomendado por la norma ISO/FDIS 21570. El empleo de una desnaturalización prolongada también ha sido informada por Vollenhofer y col, (1999) quienes la realizan a 95°C durante 12 minutos, y también por Germini y col, (2004), que emplean esta última temperatura por 10 minutos. En cambio Tozzini y col, (2000) y Jaccaud y col, (2003) recomiendan 3 minutos y 40 segundos a 94°C y 95°C respectivamente, y Zimmermann y col, (1998) utilizan 4 minutos y 30 segundos y Van Hoef y col, (1998) 5 minutos, ambos a 95°C.

2.3.1 Optimización de la concentración de Cl_2Mg

La mezcla de PCR debe contener de 0,5 a 2,5 mM de Cl_2Mg por encima de la concentración total de dNTPs, ya que la presencia de EDTA y otros quelantes en el stock de primers o en el ADN molde pueden modificar la concentración óptima de magnesio (Innis y col, 1990). Teniendo en cuenta lo anteriores ensayaron distintas concentraciones de Cl_2Mg .

Tomando el protocolo anterior como base se evaluó un rango de concentración de MgCl_2 de 1- 4 mM para determinar la concentración óptima. Con este fin se amplificaron con el par de primers 35S-1/35S-2, 20 ng de ADN plasmídico purificado que contiene el promotor 35S, y ADN extraído y purificado a partir de maíz Bt 176 y de soja RR.

La intensidad de producto de amplificación de PCR aumenta al aumentar la concentración de Cl_2Mg de 1 a 1,5 mM y disminuye, cuando ésta se aumenta de 1,5 a 4 mM (datos no mostrados). Ésto sugiere que una concentración de 1,5 mM produce los mejores resultados, por lo que para las subsecuentes amplificaciones se utilizó esta concentración.

La misma concentración de magnesio es utilizada por Tozzini y col, (2000), para 15-20 ng de ADN molde y por Zimmermann y col, (1998), para 5 pg a 50 ng de ADN. Por el contrario Vollenhofer y col, (1999), utilizan una concentración de cloruro de magnesio de 2,5 mM para 50 ng de ADN molde, Germini y col, (2004) recomienda 3,5 mM para 150 ng de ADN, Jaccaud y col, (2003) 2,5mM y Van Hoef y col, (1998), 2mM para 1-2 ul de ADN obtenido de 200 ng de harina.

2.3.2 Optimización de las temperaturas de apareamiento para cada juego de primer

Para determinar las óptimas temperaturas de apareamiento de cada par de primers se hicieron reacciones de PCR con programas de gradientes de temperatura en el rango correspondiente a la temperatura de apareamiento (TA) calculada con el programa Vector NTI, que tiene en cuenta la concentración de magnesio y la cantidad de bases G y C presentes en el primer (tabla 19).

Tabla 19: Temperaturas de apareamiento de los primers utilizados en este trabajo calculadas con el programa Vector NTI

Primer	TA
35S-1	56°C
35S-2	60°C
LE1	60°C
LE2	64°C
IVR1	80°C
IVR2	80°C
CRY1	78°C
CRY2	80°C
GMO7	62°C
GMO8	58°C

Las reacciones de PCR se realizaron variando la temperatura a intervalos de 2°C, desde 10°C por debajo de la temperatura de apareamiento calculada hasta 10°C por encima de la misma. Aquella temperatura que produce mayor cantidad de producto de reacción con menor intensidad de dímeros de primers fue considerada como la temperatura de apareamiento óptima.

La figura 20 muestra los resultados obtenidos cuando se optimizó la temperatura de apareamiento de los primers 35S1/35S2 utilizando como molde el plásmido pRTL202 (Carrington y *col.*,1991); se observan dos productos de amplificación de 195 bp y 457 bp. El primero corresponde al tamaño esperado para el promotor 35S del virus del mosaico de coliflor. El producto de 500 bp esta presente en aquellas construcciones que tienen una versión duplicada del "enhancer" de promotor 35S (Fischhoff y *col.*, 1996). Estos resultados son coincidentes con los informados por Tozzini y *col.*, (2000). Como se observa la calle 12 presenta las dos bandas del tamaño esperado (Carrington, 1991) y la menor proporción de productos de reacción inespecíficos y de dímeros de primers, por lo que la temperatura de apareamiento óptima es 60°C.

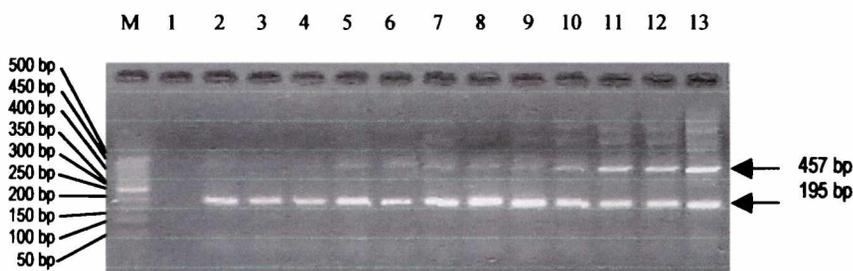


Figura 20: Efecto de la temperatura de apareamiento en la amplificación del promotor 35S del plásmido pRTL202 con los primers 35S1/35S2. Los productos de amplificación de 195 y 500 bp corresponden al promotor simple y duplicado respectivamente. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control negativo; Calle2: 40,7°C; Calle3: 40,7°C; Calle4: 41,7°C; Calle5: 43,5°C; Calle6: 45,9°C; Calle7: 48,7°C; Calle8: 51,6°C; Calle9: 54,4°C; Calle10: 56,9°C; Calle11: 58,9°C; Calle12: 60,1; Calle13: 60,3°C

En la figura 21 se presentan los resultados obtenidos cuando se optimizó la temperatura de apareamiento amplificando el ADN extraído de soja RR con el par de primers 35S1/35S2 utilizando un gradiente entre 44,7°C y 64,2°C. Puede observarse que se obtienen productos de amplificación únicamente cuando se utilizan como temperaturas de apareamiento 49,8°C, 52,6 y 55,5°C (figura 21, calles 6, 7 y 8 respectivamente), siendo la banda obtenida a 55,5°C más definida. Por lo tanto ésta es la temperatura de apareamiento óptima. Resultados similares se obtuvieron al emplear ADN de maíz Bt 176 y MON 810 como molde y este mismo juego de primers (datos no mostrados). Las muestras de maíz que tienen una versión mejorada del promotor 35S, en el caso de la figura 21 el maíz MON810, deberían presentar dos bandas de amplificación (457bp y 195bp), sin embargo éstas no se observan. Una posible explicación de esto sería que, como informan Anklam y *col*, (2002), existen al menos ocho variantes diferentes de promotores 35S que se utilizan en cultivos GMs. Además Matzuoka y *col*, (2002), encuentran que construcciones comerciales con el mismo nombre tienen secuencias diferentes. Existen variaciones en las condiciones de amplificación utilizadas por distintos autores para este mismo juego de primers por ej. Pietsch y *col*, (1997) y Carolyn y *col*, (1999) utilizan temperaturas de apareamiento de 54°C mientras que Ehlers y *col*,(1997) usan 59°C y Tozzini y *col*, (2000) 62°C. A pesar de estas diferencias estos autores obtienen resultados similares a los de este trabajo, obteniendo únicamente el producto de amplificación de 195 bp cuando emplean ADN extraído de maíz.

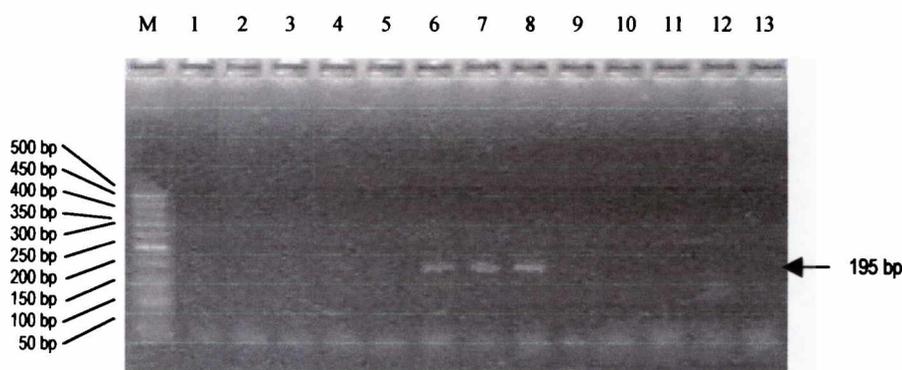


Figura 21: Efecto de la temperatura de apareamiento en la amplificación de ADN de soja RR con los primers 35S1/35S2. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control negativo; Calle2: 44,7°C; Calle3: 44,7°C; Calle4: 45,6°C; Calle5: 47,4°C; Calle6: 49,8°C; Calle7: 52,6°C; Calle8: 55,5°C; Calle9: 58,3°C; Calle10: 60,8°C; Calle11: 62,8°C; Calle12: 64,0°C; Calle13: 64,2°C

La figura 22 muestra los resultados que se obtuvieron al optimizar la temperatura de apareamiento de los primers LE1/LE2 usando como molde ADN extraído de soja RR, con una temperatura media de 50°C y un gradiente de temperaturas en un rango de 40,7°C a 60,3°C. Se observa que se obtiene el producto de amplificación esperado entre las temperaturas de 40,7°C y 54,4°C (figura 22, calles 2 - 9). Se eligió una temperatura de 44°C (figura 22, calle 4) ya que ésta es la temperatura que produce la banda más intensa con menor cantidad de dímeros de primer. En cambio, Carolyn y *col*,(1999) utilizaron una temperatura más elevada (60°C) para estos primers.

Los resultados obtenidos en la optimización de la temperatura de apareamiento de los primers GMO7/GMO8 usando como molde ADN extraído de soja RR, se muestran en la figura 23. Puede observarse que la amplificación del fragmento de interés se obtiene entre 51,6°C y 60,3°C (figura 23, calles 7 a 12). No se observan diferencias entre las bandas de amplificación obtenidas entre las calles 8-12, por

lo que el rango óptimo es 54-60 °C; arbitrariamente se decidió trabajar a 57°C. A diferencia de esto, Meyer y Jaccaud, (1997) llevaron a cabo las amplificaciones de lectina de soja con este par de primers realizando reacciones de PCR con una temperatura de apareamiento de 60°C.

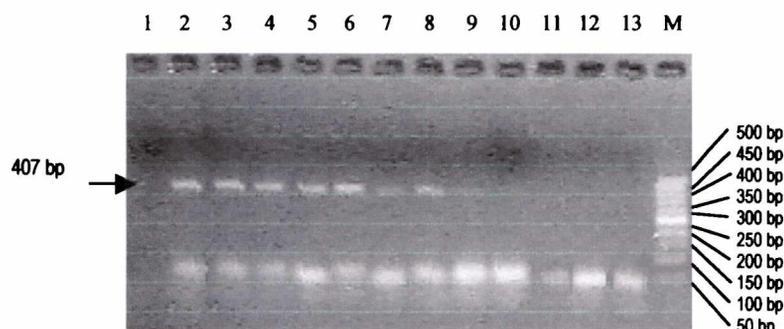


Figura 22: Efecto de la temperatura de apareamiento en la amplificación de lectina de soja cuando se utilizan los primers LE1/LE2 y soja RR. Calle1: 40,7°C; Calle2: 40,7°C; Calle3: 41,7°C; Calle4: 43,5°C; Calle5: 45,9°C; Calle6: 48,7°C; Calle7: 51,6°C; Calle8: 54,4°C; Calle9: 56,9°C; Calle10: 58,9°C; Calle11: 60,1°C; Calle12: 60,3°C; Calle13: control negativo; Calle M: marcador de peso molecular

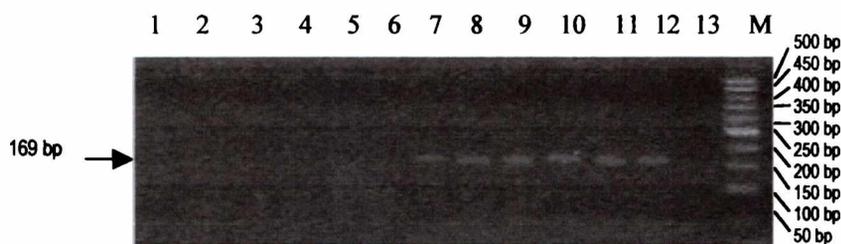


Figura 23: Efecto de la temperatura de apareamiento en la amplificación del gen EPSPS cuando se utilizan los primers GMO7/GMO8 y ADN de extraído de soja RR. Calle 1: 40,7°C; Calle2: 40,7°C; Calle3: 41,7°C; Calle4: 43,5°C; Calle5: 45,9°C; Calle6: 48,7°C; Calle7: 51,6°C; Calle8: 54,4°C; Calle9: 56,9°C; Calle10: 58,9°C; Calle11: 60,1°C; Calle12: 60,3°C; Calle13: control negativo; Calle M: marcador de peso molecular

Para el par de primers IVR1/IVR2 se optimizó la temperatura de apareamiento usando como molde maíz DK-752 convencional Monsanto, con una temperatura media de 70°C y un rango de temperaturas de entre 60,5°C y 79,7°C. Los resultados se presentan en la figura 24. El producto de amplificación se obtiene entre las temperaturas 60,5°C y 68,4°C (figura 24, calles 2 a 6), y las bandas mejor definidas se obtienen entre las calles 4 a 6, por lo que se eligió como temperatura de apareamiento óptima 68°C. También emplean los primers IVR1/IVR2 Ehlers y *col*, (1997) y Carolyn y *col*, (1999) a una temperatura menor a la utilizada en este trabajo (64°C), y James y *col*, (2003), que usan una temperatura aún menor (61°C).

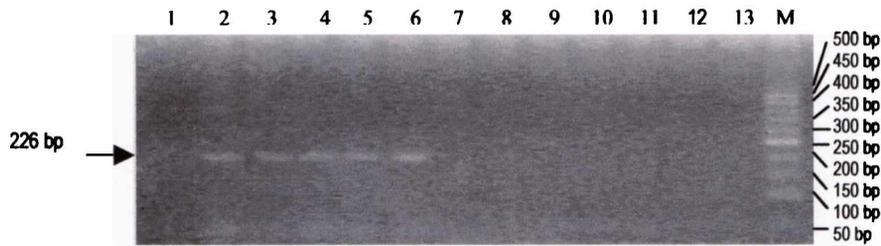


Figura 24: Efecto de la temperatura de apareamiento en la amplificación de invertasa de maíz cuando se utilizan los primers IVR1/IVR2 y maíz DK- 752 convencional. Calle1: 60,5°C; Calle2: 60,5°C; Calle3: 61,5°C; Calle4: 63,3°C; Calle5: 65,6°C; Calle6: 68,4°C; Calle7: 71,2°C; Calle8: 74,0°C; Calle9: 76,5°C; Calle10: 78,5°C; Calle11: 79,7°C; Calle12: 79,7°C; Calle13: control negativo; CalleM: marcador de peso molecular

El mismo rango y temperatura media se utilizaron para determinar la óptima temperatura de apareamiento para el par de primers CRY1/CRY2 con maíz Bt 176. Los resultados se muestran en la figura 25, donde se observa claramente que se amplifica el fragmento deseado entre 65,6°C y 71,2°C (figura 25, calles 6 a 8), y la banda más intensa y con menor cantidad de dímeros de primers se obtiene en la calle 8 para 71,2°C, por lo que la óptima temperatura de apareamiento fue 71°C. Este par de primers fue utilizado con una temperatura menor (64°C) por Ehlers y col, (1997) y por Carolyn y col, (1999).

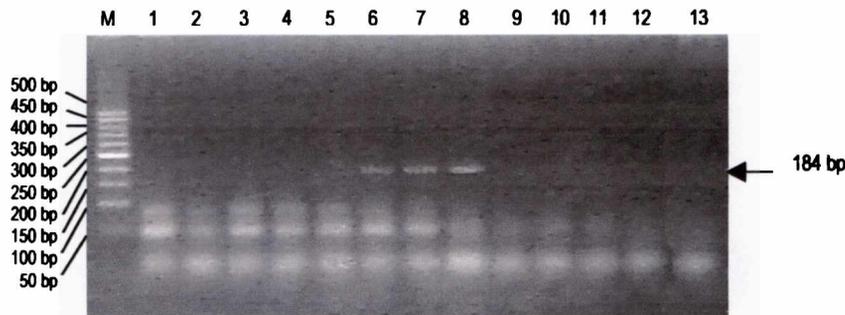


Figura 25: Efecto de la temperatura de apareamiento en la amplificación de transge de maíz cuando se utilizan los primers CRY1/CRY2 y maíz Bt 176. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control negativo; Calle2: 60,5°C; Calle3: 60,5°C; Calle4: 61,5°C; Calle5: 63,3°C; Calle6: 65,6°C; Calle / : 68,4°C; Calle8: 71,2°C; Calle9: 74,0; Calle10: 76,5°C; Calle11: 78,5°C, Calle12:79,7°C; Calle13: 79,9°C:

Como resultado de estas experiencias, se fijaron como condición de trabajo las temperaturas de apareamiento experimental (T_a) de la tabla 20.

Se ve claramente que las temperaturas óptimas determinadas experimentalmente siempre estuvieron por debajo de la temperatura de apareamiento más baja calculada (T_A) para cada juego de primers. Esto muestra que es necesario optimizar esta temperatura ya que la concentración de sales puede variar en la muestra que se utiliza como molde. Además es esperable que la temperatura no sólo dependa del contenido de bases G y C en el primer sino también del orden que tengan las mismas en el primer.

Se puede observar que para los primers que tienen 50% o menos de bases GC en su secuencia, la T_a experimental difiere de la T_A en 1°C (primers 35S y GMO), en tanto que para los primers que tienen más de 50% de bases GC, la temperatura difiere en 8, 12 y 6 °C (primers LE, IVR y CRY respectivamente).

Tabla 20: Temperaturas óptimas de apareamiento de los distintos juegos de primers utilizados en éste trabajo.

Primer	TA ¹ (°C)	Ta experimental (°C)	Porcentaje de GC
35S-1	56	55	47,3
35S-2	60		50,0
LE1	52	44	44,4
LE2	64		33,3
IVR1	80	68	60,0
IVR2	80		60,0
CRY1	78	71	56,0
CRY2	80		60,0
GMO7	62	57	47,8
GMO8	58		38

1: Temperatura de apareamiento calculada con el programa Vector NTI

2.3.3 Optimización del uso de DMSO, glicerol, BSA y formamida en la mezcla de PCR

Para tratar de aumentar el rendimiento de la reacción de PCR se usaron cosolventes como dimetilsulfóxido (DMSO) y glicerol, los que promueven la desnaturalización del ADN rico en GC y evitan la formación de estructuras secundarias, favoreciendo de esta manera la extensión (síntesis de ADN por la ADN polimerasa). El glicerol también actúa como estabilizador de la enzima (Stratagene, 1997). Las concentraciones de estos cosolventes se eligieron según los rangos recomendados. Para DMSO, el rango sugerido es entre 1 y 10% (v/v) (Stratagene,1997). En este caso se eligió usar 1-5%, ya que se sabe que 10% de DMSO inhibe la actividad de la Taq polimerasa en un 50%. Por esto, el uso de altas concentraciones no es recomendable para la mayoría de los protocolos (Innis y col, 1990). Para glicerol se recomienda un rango de 5 a 20% (Stratagene,1997). En este caso se utilizó una concentración de 5-10%. Así, se incluyó en diferentes mezclas de PCR 5-10% (v/v) de glicerol y 1-5% (v/v) de DMSO y se probó la reacción con 2 y 20 ng de maíz DK-752 convencional Monsanto y Chalten convencional Syngenta, y el par de primers IVR1/IVR2. Se observó que la reacción se inhibe en presencia de todas las concentraciones de glicerol analizadas (datos no mostrados) y para concentraciones de 1-4% de DMSO, en tanto que con 5% de DMSO se amplifica el gen IVR (figura 26). Se realizó el mismo análisis con los distintos juegos de primers, obteniéndose resultados análogos (datos no mostrados).

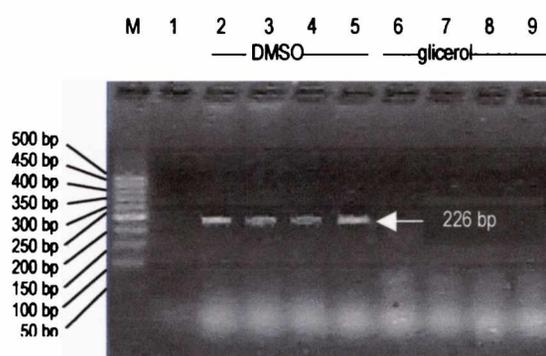


Figura 26: Efecto del uso de DMSO y glicerol en la mezcla de PCR en la producción de productos de amplificación de 226 bp con los primers IVR. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control negativo; Calle2: maíz DK-752(20 ng); Calle3: maíz DK-752(2ng); Calle4: maíz Chaltén(2 ng); Calle5: maíz Chaltén(20 ng); Calle6: maíz DK-752(20 ng); Calle7: maíz DK-752(2ng); Calle8:maíz Chaltén(2 ng); Calle9: maíz Chaltén(20 ng).

Con igual fin, se analizó el efecto del uso de albúmina de suero bovino (BSA) y formamida. La BSA actúa como estabilizador no específico de la enzima, al tiempo que une algunos inhibidores; el manual de la Pfu (Stratagene, 1997), recomienda una concentración óptima entre 10 y 100 µg/ml, pero se eligió probar la menor concentración. La formamida facilita algunas reacciones de apareamiento entre primer y molde, y también disminuye la temperatura de desnaturalización de algunos ADNs resistentes a la desnaturalización. El mismo manual sugiere un rango de uso de 1,25 a 10% (v/v). En este caso se analizó 2-10% (v/v). Se utilizó como ADN molde maíz DK-752 convencional Monsanto y soja convencional con los pares de primers IVR1/IVR2 y LE1/LE2 respectivamente. Ambos cosolventes inhibieron la reacción de PCR (datos no mostrados). Este resultado es diferente de los informados por Zimmermann *et al.*, (1998), y Jaccaud *et al.*, (2003), que utilizan 0,2 µg/ml de BSA en la mezcla de reacción.

Por lo tanto, se decidió usar en las reacciones subsiguientes de PCR, una concentración de 5% de DMSO en la mezcla de PCR..

2.4 ESPECIFICIDAD DE LA REACCIÓN DE PCR

Para mostrar la especificidad de cada primer en las muestras se extrajo ADN de granos de maíz y de soja por el método de Dellaporta, y una alícuota de 20ng de este ADN se amplificó con los distintos juegos de primers. Con el par de primers LE1/LE2 se obtuvo el producto de amplificación de 407 bp esperado para las muestras de soja convencional y RR, como se muestra en la figura 27 en las calles 6 y 7 respectivamente, en tanto que con las 4 muestras de maíz no se obtiene el producto de PCR. Estos resultados sugieren que este par de primers es específico para el gen codificante para lectina de soja.

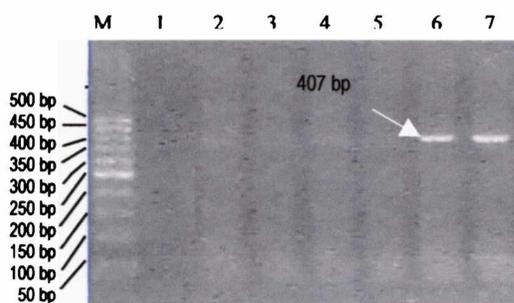


Figura 27: Especificidad de la reacción de PCR cuando la amplificación se realiza con los primers LE1/LE2
 Calle M: marcador de peso molecular
 Calle 1: control negativo
 Calle 2: Maiz DK-752-MG Evento MON810 (Monsanto)
 Calle 3: Maiz DK-752 Convencional (Monsanto)
 Calle 4: Maiz Convencional Chalten (Syngenta)
 Calle 5: Maiz Chalten TD Evento 176 (syngenta)
 Calle 6: Soja Convencional
 Calle 7: Soja RR Round Up Ready

Al realizar la reacción de PCR con el par de primers IVR1/IVR2 se amplificó el producto de 226 bp esperado con las cuatro muestras de maíz (figura 28, calles 2, 3, 4 y 5) y no se obtuvo producto con las muestras de soja (figura 28, calles 6 y 7).

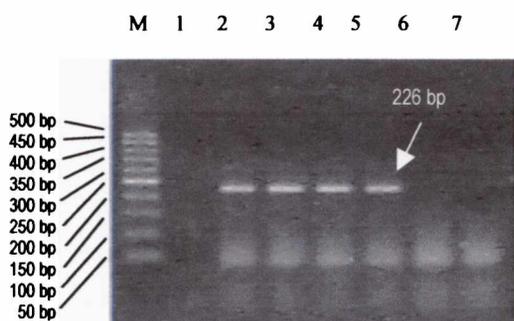


Figura 28: Especificidad de la reacción de PCR cuando se realiza la amplificación con los primers IVR1/IVR2
 Calle M: marcador de peso molecular
 Calle 1: control negativo
 Calle 2: Maiz DK-752-MG Evento MON810 (Monsanto)
 Calle 3: Maiz DK-752 Convencional (Monsanto)
 Calle 4: Maiz Convencional Chalten (Syngenta)
 Calle 5: Maiz Chalten TD Evento 176 (syngenta)
 Calle 6: Soja Convencional
 Calle 7: Soja RR Round Up Ready

En la figura 29 se muestran los resultados obtenidos con el par de primers 35S1/35S2. Puede observarse en las calles 2, 5 y 7, que se produjo la amplificación del fragmento de 195 bp con las muestras OGM (maíz DK-752 MON 810, maíz Chaltén evento Bt 176 y soja RR respectivamente) y no se amplificó con las muestras no-OGMs correspondientes (figura 29, calles 3, 4 y 6).

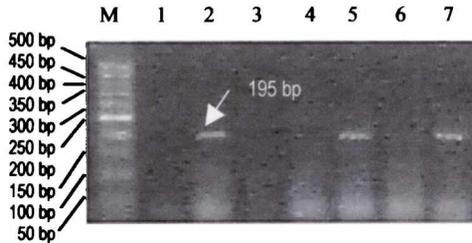


Figura 29: Especificidad de la reacción de PCR cuando se realiza la amplificación con los primers 35S1//35S2

Calle M: marcador de peso molecular
 Calle1: control negativo
 Calle2: Maíz DK-752-MG Evento MON810 (Monsanto)
 Calle3: Maíz DK-752 Convencional (Monsanto)
 Calle4: Maíz Convencional Chalten (Syngenta)
 Calle5: Maíz Chalten TD Evento 176 (syngenta)
 Calle6: Soja Convencional
 Calle7: Soja RR Round Up Ready

Al analizar el par de primers CRY1/CRY2 se obtuvo el producto de amplificación de 184 bp con las muestras de maíz transgénico (maíz DK-752 MON810 y maíz Chaltén evento Bt176), como se puede observar en las calles 2 y 5 de la figura 30, y no se obtuvo el producto esperado con las muestras de maíz convencionales, ni con las muestras de soja (figura 30, calles 3, 4, 6 y 7).

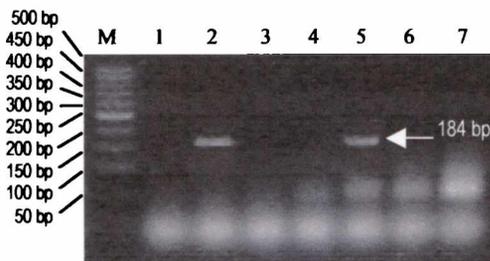


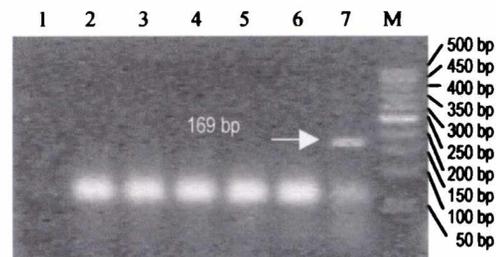
Figura 30: Especificidad de la reacción de PCR cuando la amplificación se realiza con los primers CRY1/CRY2

Calle M: marcador de peso molecular
 Calle1: control negativo
 Calle2: Maíz DK-752-MG Evento MON810 (Monsanto)
 Calle3: Maíz DK-752 Convencional (Monsanto)
 Calle4: Maíz Convencional Chalten (Syngenta)
 Calle5: Maíz Chalten TD Evento 176 (syngenta)
 Calle6: Soja Convencional
 Calle7: Soja RR Round Up Ready

Finalmente, se hizo la reacción con el par de primers GMO7/GMO8. Los resultados se muestran en la figura 31. Se observa que se obtiene la banda de 169 bp con la muestra de soja RR (calle 7), mientras que con las muestras de maíz y con la muestra convencional de soja no hay amplificación (calles 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente).

Figura 31: Especificidad de la reacción de PCR cuando la amplificación se realiza con los primers GMO7/GMO8

Calle M: marcador de peso molecular
 Calle1: control negativo
 Calle2: Maíz DK-752-MG Evento MON810 (Monsanto)
 Calle3: Maíz DK-752 Convencional (Monsanto)
 Calle4: Maíz Convencional Chalten (Syngenta)
 Calle5: Maíz Chalten TD Evento 176 (syngenta)
 Calle6: Soja Convencional
 Calle7: Soja RR Round Up Ready



En ningún caso se amplificaron fragmentos inespecíficos bajo las condiciones de trabajo. Todos estos datos muestran claramente la especificidad de cada sistema de PCR para cada primer y cada muestra.

2.5 SENSIBILIDAD DE LA REACCIÓN DE PCR

Otro parámetro importante en la puesta a punto del sistema es su sensibilidad. Para su estudio se extrajo ADN de maíz y de soja por el método de Dellaporta y se separó en un gel de agarosa 0,8% junto con distintas cantidades de un patrón. Por comparación de las intensidades de las muestras problema con el patrón se determinó la cantidad de ADN presente. Se analizó la sensibilidad de la reacción de PCR con todos los pares de primers usados en este trabajo, utilizando una concentración 1,5 mM de MgCl₂ y un rango de ADN molde de 0,05 a 400 ng. Como se puede observar en las figuras 32A, 33A, 34A y 35A, se obtiene el producto de amplificación esperado entre 0,1 y 25 ng de ADN (calles 5-9 de dichas figuras). Cuando se emplearon cantidades de ADN molde comprendidas entre 50-400 ng no se observó amplificación (figuras 32A, 33A, 34A y 35 A, calles 2, 3 y 4). Este hecho puede deberse a que esta cantidad de ADN puede secuestrar al magnesio interfiriendo con la reacción. Luego, se repitió el análisis para estas cantidades de ADN, usando 4mM de MgCl₂ en la mezcla de reacción, observándose en estas condiciones la amplificación del producto deseado (figuras 32B, 33B, 34B y 35B, calles 2, 3 y 4).

Los mismos resultados se obtuvieron cuando se utilizó el par de primers CRY1/CRY2 (datos no mostrados).

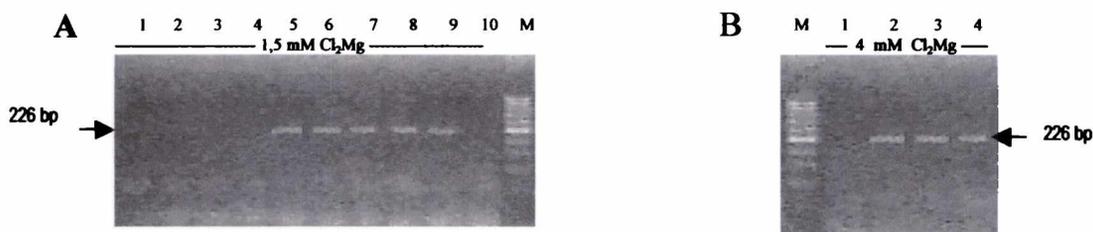


Figura 32: Sensibilidad de la reacción de PCR cuando se realiza la amplificación de distintas cantidades de ADN molde con los primers IVR1/IVR2. A: Calle1: control negativo; Calle2: 400 ng; Calle3: 200 ng; Calle4: 50 ng; Calle5: 25 ng; Calle6: 6,25 ng; Calle7: 1,56 ng; Calle8:0,39 ng; Calle9: 0,1 ng; Calle10: 0,05 ng; Calle M: marcador de peso molecular B: Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control negativo; Calle2: 400 ng; Calle3: 200 ng; Calle4: 50 ng

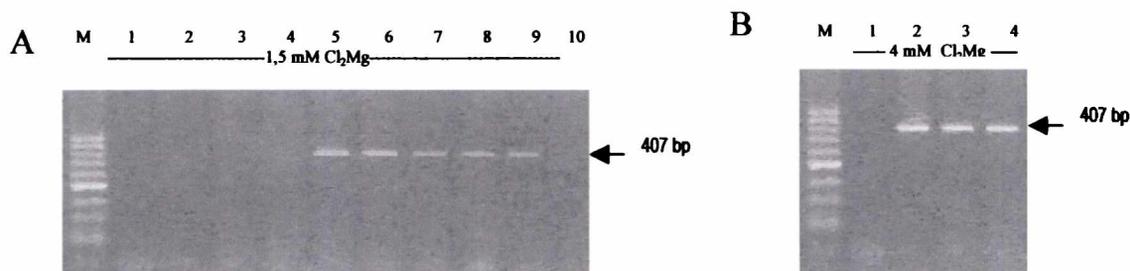


Figura 33: Sensibilidad de la reacción de PCR cuando se realiza la amplificación de distintas cantidades de ADN molde con los primers LE1/LE2. A: Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control negativo; Calle2: 400 ng; Calle3: 200ng; Calle4: 50 ng; Calle5: 25 ng; Calle6: 6,25 ng; Calle7: 1,56 ng; Calle8:0,39 ng; Calle9: 0,1 ng; Calle10: 0,05 ng B:Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control negativo; Calle2: 400 ng; Calle3: 200 ng; Calle4: 50 ng

Para cantidades de ADN en el rango de 25-50 ng se puede amplificar el fragmento de interés, con todos los primers para concentraciones de magnesio en el rango de 2-3,5 mM.

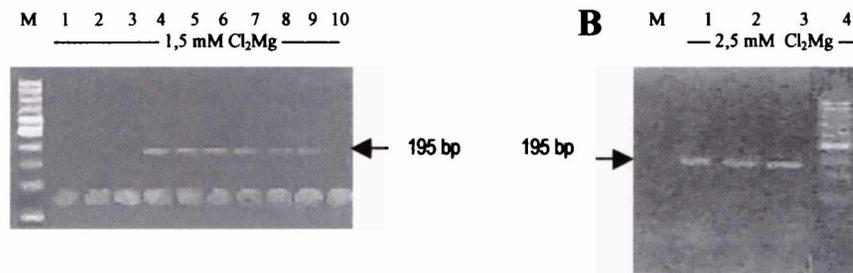


Figura 34: Sensibilidad de la reacción de PCR cuando se realiza la amplificación de distintas cantidades de ADN molde con los primers 35S1/35S2. A: Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control negativo; Calle2: 400 ng; Calle3: 200ng; Calle4: 50 ng; Calle 5: 25 ng; Calle6: 6,25 ng; Calle7: 1,56 ng; Calle8: 0,39 ng; Calle9: 0,1 ng; Calle10: 0,05 ng B: Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control negativo; Calle2: 400 ng; Calle3: 200 ng; Calle4: 50 ng

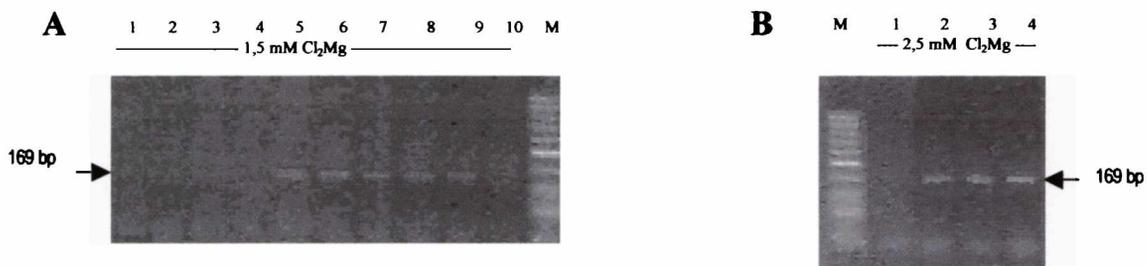


Figura 35: Sensibilidad de la reacción de PCR cuando se realiza la amplificación de distintas cantidades de ADN molde con los primers GMO7/GMO8. A: Calle1: control negativo; Calle2: 400 ng; Calle3: 200 ng; Calle4: 50 ng; Calle5: 25 ng; Calle6: 6,25 ng; Calle7: 1,56 ng; Calle8:0,39 ng; Calle9: 0,1 ng; Calle10: 0,05 ng; Calle M: marcador de peso molecular B: Calle M: marcador de peso molecular; calle1: control negativo; Calle2: 400 ng; Calle3: 200 ng; Calle4: 50 ng

Debido a que todos los primers utilizados amplifican fragmentos de aproximadamente 200 bp (excepto el par LE1/LE2, que amplifica una región de 407 bp), se espera que todos tengan un rango de trabajo similar, ya que el mismo depende de la disponibilidad de sustratos necesarios para que la reacción progrese. Cuanto más grande es la secuencia a amplificar, más cantidad de dNTPs se usarán en cada ciclo, con lo que disminuirá su concentración en la mezcla de reacción rápidamente. Como las secuencias blanco son todas de un tamaño similar, se puede suponer que los dNTPs se consumirán al mismo tiempo. Los resultados obtenidos confirman lo esperado, ya que con todos los primers se obtiene el producto de amplificación en un rango de 0,1 ng a 25 ng de ADN molde, utilizando una concentración de cloruro de magnesio 1,5 mM, y en un rango de 50 ng a 400 ng de ADN con una concentración de cloruro de magnesio de 4 mM.

2.6 AJUSTE DE LAS CONDICIONES DE LINEARIDAD DE LA REACCIÓN DE PCR

A fin de desarrollar un método semicuantitativo para el análisis de OGM en alimentos es necesario asegurar que la cantidad de producto amplificado en la reacción de PCR sea proporcional a la cantidad de ADN blanco. La cantidad de producto obtenido depende de condiciones de reacción tales como: cantidad de molde, primers, dNTPs, número de ciclos utilizados, etc. Por lo tanto, para ajustar las condiciones de manera de que la cantidad de producto sea proporcional a la cantidad de molde, es necesario fijar las otras

variables que afectan la reacción. Por este motivo en primer lugar se utilizaron las concentraciones de primers y dNTPs mencionadas anteriormente y se modificó la cantidad de molde. En relación al número de ciclos, al inicio de la reacción la cantidad de producto obtenido es proporcional a la cantidad de molde, pero a medida que transcurren los ciclos de amplificación, algunos de los sustratos empiezan a agotarse por lo que la cantidad de producto empieza a aumentar más lentamente. Además en cada ciclo se forman productos no específicos (Innis y col, 1990). Debido a esto, a medida que se incrementa el número de ciclos la relación entre el producto y molde deja de ser lineal. Entonces, para lograr una proporcionalidad entre el producto de amplificación obtenido y la cantidad de molde es necesario tener en cuenta el número de ciclos de amplificación.

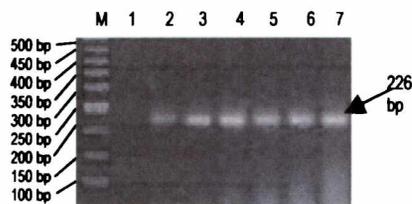
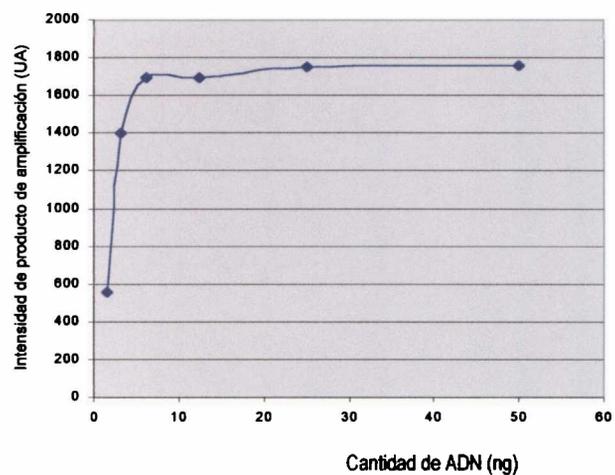


Figura 36
A: Efecto del incremento de la cantidad de DNA sobre la producción de producto de PCR cuando se utilizan los primers IVR1/IVR2 en maíz Bt 176
 Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control de reactivos de reacción; Calle2: 1,5 ng; Calle3: 3 ng; Calle4: 6,25 ng; Calle5: 12,5 ng; Calle6: 25 ng; Calle7: 50 ng
B: Intensidad de producto de amplificación de reacción de PCR en función de la cantidad de ADN para 35 ciclos de amplificación (ng)
 UA: unidades arbitrarias



Con este objetivo se evaluó la intensidad del producto de amplificación cuando se realiza la reacción de PCR con el par de primers IVR1/IVR2 con cantidades crecientes de ADN molde y 35 ciclos de amplificación (figura 36A), Los datos de intensidad de producto de amplificación obtenidos se graficaron en función de la cantidad de ADN utilizado como molde (figura 36B). En este gráfico se observa que con 35 ciclos, el producto de amplificación no es proporcional a la cantidad de ADN de partida. El mismo comportamiento fue hallado para el resto de los primers (datos no mostrados). Para determinar el rango de linealidad de la reacción de PCR, se estudió la variación de la intensidad de producto con distintas cantidades de ADN y para diferentes números de ciclos de amplificación. Para esto, primeramente se realizaron reacciones de PCRs con cantidades de maíz y de soja en el rango 0,02 a 250 ng, empleando los distintos juegos de primers, y un número de ciclos de amplificación comprendidos entre 15 y 30. Al analizar los resultados de estos ensayos en gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio se observó que no se obtienen productos visibles cuando el ADN molde (0,02-250 ng) es amplificado durante 15 y 20 ciclos, que los productos son tenues para 25 ciclos y fácilmente visibles para 30 ciclos (datos no mostrados). En consecuencia, para poder incrementar la sensibilidad de esta reacción y poder trabajar con estas cantidades de ADN molde, se decidió reamplificar los productos de reacción obtenidos. Para optimizar las condiciones de estas dos reacciones de PCR consecutivas se trabajó de la siguiente manera. En primer lugar se analizaron distintas cantidades de ADN molde, con los distintos juegos de primers variando el número de ciclos de amplificación de la primer PCR. Los productos de cada una de estas reacciones se reamplificaron empleando una segunda PCR que se efectuó a un número fijo de 15 ciclos. Así se

analizaron distintas cantidades de ADN de maíz Chaltén evento Bt 176 (rango 0,02-250 ng) con el par de primers IVR1/IVR2 empleando un número de ciclos comprendido entre 15 y 40 para la primer reacción de PCR y 15 ciclos para la segunda reacción. No se trabajó por debajo de 15 ciclos de amplificación en la primer PCR para asegurar una cantidad de producto que pudiera ser detectada. Los productos de PCR se separaron en un gel de agarosa 2,5% (figura 37A) y se analizaron sus intensidades. Los datos de intensidad del producto de reacción se graficaron en función del número de ciclos de la primera PCR (figura 37B1) y en función de la cantidad de ADN (figura 37B2). La figura 37A muestra el efecto del incremento del número de ciclos de la primera PCR sobre la cantidad de producto obtenido al amplificar el fragmento del gen codificante para invertasa en las condiciones mencionadas anteriormente. En ella se observa que la intensidad de producto aumenta al aumentar el número de ciclos cuando se emplea una cantidad de ADN molde comprendida entre 0,25-250 ng (figura 37A, calles 2-31). Puede observarse que no se obtienen productos para 0,02 ng de ADN molde, lo que sugiere que este sistema de PCR no es suficientemente sensible para amplificar el fragmento de interés a estos bajos niveles. Cuando se grafica la intensidad del producto de reacción en función del número de ciclos, se observa (figura 37B1) que se produce un aplanamiento de las curvas de intensidad a partir de los 20 ciclos para 83,2 ng y 250 ng de ADN; para el rango de 0,25 ng a 2,5 ng se mantiene la linealidad hasta los 40 ciclos, y para 27,8 ng hasta los 25 ciclos. Por este motivo, en las sucesivas reacciones de PCRs se analizarán 14-26 ciclos, con una segunda PCR de 15 ciclos. No se incluirán en el análisis más de 26 ciclos ya que la reacción debe ser optimizada para trabajar con cantidades de ADN mayores a 2,5 ng.

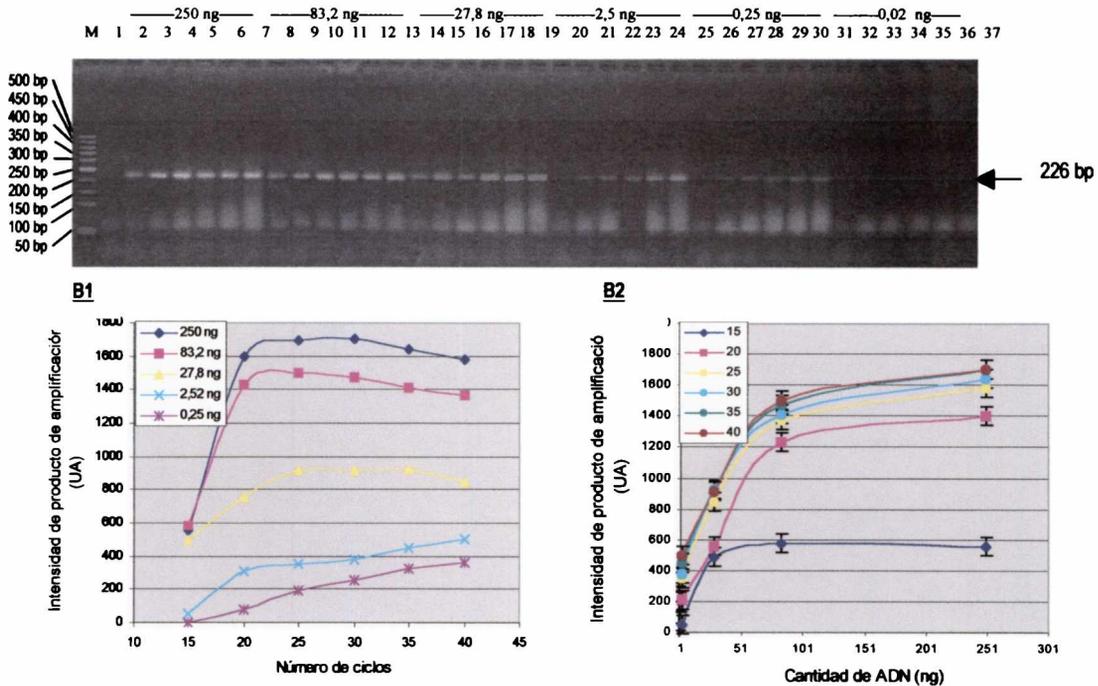


Figura 37. A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la primera reacción de PCR cuando se amplifica el gen IVR empleando distintas cantidades de ADN de maíz Bt 176 como molde. Calle M: marcador de peso molecular; Calle 1: control de reactivos de reacción; Calles: 2,8,14,20,26 y 32: 15 ciclos; Calles: 3,9,15,21,27 y 33: 20 ciclos; Calles: 4,10,16,22,28 y 34: 25 ciclos; Calles: 5,11,17,23,29 y 35: 30 ciclos; Calles: 6,12,18,24,30 y 36: 35 ciclos; Calles: 7,13,19,25,31 y 37: 40 ciclos. B: Intensidad de producto de amplificación de reacción de PCR cuando se amplifica el gen IVR en función del número de ciclos de la primer PCR (B1) y en función de la cantidad de ADN (B2)

Dado que uno de los objetivos de este trabajo es determinar en forma semicuantitativa la presencia de material transgénico en alimentos y, como ya se mencionó, la cantidad de ADN presente en muchos casos es pequeña, se disminuyó el límite superior del rango de cantidades de ADN a analizar a 50 ng; además, como se observa en la figura 37A, la reacción de PCR no es suficientemente sensible para amplificar 0,02 ng de ADN molde, por lo que se tomó 1,5 ng como límite inferior del rango de ADN a investigar. Cabe aclarar entonces, que en lo sucesivo se realizarán PCRs con cantidad de ADN molde comprendidas entre 1,5 ng y 50 ng, y se emplearán 14-26 ciclos en la primera PCR y 15 ciclos en la reamplificación. Los pares de primers IVR1/IVR2, CRY1/CRY2 y 35S1/35S2 se probarán utilizando como molde maíz Bt 176 y los juegos de primers LE1/LE2 y GMO7/GMO8 con soja RR.

Las figuras 38A, 39A, 40A, 41A y 42A muestran que para los primers IVR, CRY, LE, GMO y 35S respectivamente, en todos los casos se observa que se obtienen productos de amplificación para cantidades de ADN comprendidas en el rango entre 1,5-50 ng (calles 2 a 31), y que la cantidad de producto aumenta al incrementarse el número de ciclos de 14 a 26. En las figuras 38B1, 39B1 y 42B1 se observa que la intensidad de producto de amplificación es proporcional al número de ciclos de PCR realizados hasta los 17 ciclos para todas las cantidades de ADN probadas, y luego se observa un aplanamiento de la curva debido posiblemente al agotamiento de los sustratos. Esto indica que el sistema se comporta de la forma esperada, en tanto que en la figuras 40B1 y 41B1 la reacción sigue siendo lineal hasta los 20 ciclos para todas las cantidades de ADN molde.

Al analizar la variación de la intensidad de productos de reacción de PCR con la cantidad de ADN (figuras 38B2, 40B2, 41B2 y 42B2), se observa que la misma aumenta con la cantidad de molde, y luego se aplana para el rango de 6 ng a 50 ng de ADN, por lo tanto, se puede decir que estos cuatro sistemas se comportan de la forma esperada.

Por otra parte, la figura 39B2 (primers CRY) muestra que la intensidad de producto aumenta con la cantidad de ADN entre 1,5 - 12,5 ng hasta los 17 ciclos de amplificación. Con cantidades mayores de ADN, la reacción se aplana después de los 20 ciclos.

Estos resultados permiten determinar que la linealidad de la reacción se pierde después del ciclo 17 de amplificación para casi todas las concentraciones de ADN y primers probados. Así mismo, la velocidad de producción de producto es proporcional a la cantidad de molde para todos los primers de 1,5 ng a 6 ng de ADN.

Teniendo en cuenta estos resultados, en lo sucesivo se usarán 3-23 ng de ADN molde, los mismos primers y muestras, y 17 ciclos para la primer reacción de amplificación, con reamplificación variando el número de ciclos de 14 a 26. Los productos de amplificación se analizaron de igual forma a la utilizada en las PCRs anteriores. En las figuras 43A a 47A se observa que para los primers IVR, CRY, LE, GMO y 35S respectivamente, se obtienen los fragmentos de interés de 226 bp (figura 43A), 184 bp (figura 44A), 407 bp (figura 45A), 169 bp (figura 46A) y 195 bp (figura 47A), cuando se emplean cantidades de ADN molde comprendidas entre 3-23 ng y un número de ciclos de amplificación comprendido entre 14 y 26. Al analizar los resultados obtenidos con el par de primers 35S1/35S2, se observa que se obtiene un producto de 195 bp correspondiente al fragmento de interés, para todas las cantidades de ADN y todos los ciclos probados (figura 47A), aunque se obtienen bandas muy tenues con 14 ciclos de amplificación y cantidades de ADN molde entre 3-6 ng (figura 47A, calles 17 y 22 respectivamente).

Cuando se grafica intensidad del producto en función del número de ciclos, se puede observar que la linealidad se conserva hasta 17 ciclos para todos los primers y con todas las cantidades de ADN analizadas (figura 43B1, 44B1, 45B1, 46B1 y 47B1) y luego la cantidad de producto disminuye. También se observa que la reacción es lineal hasta los 20 ciclos de amplificación para:

- lectina de soja, cuando se analizan 18 y 23 ng de ADN molde (gráfico 45B1)
- transgen de soja RR, cuando se amplifican 23 ng de ADN molde (gráfico 46B1)

- promotor 35S, cuando se utilizan 3-23 ng de ADN molde (gráfico 47B1)

Al graficar la intensidad del producto de PCR en función de la cantidad de ADN utilizados en la reacción, se puede observar que la intensidad aumenta en el rango comprendido entre 3-13 ng y luego disminuye para los primers IVR, CRY, GMO y 35S (figura 43B2, 44B2, 46B2 y 47B2 respectivamente), en tanto que para el primer LE la intensidad de producto de reacción de PCR disminuye entre 18 y 23 ng de ADN (gráfico 45B2).

Se debe señalar que si bien para los primers IVR la intensidad disminuye a partir de los 13 ng de molde (gráfico 43B2), luego aumenta nuevamente. Además para 3, 8 y 13 ng de ADN se obtiene mayor intensidad para 20 y 23 ciclos que para 26 ciclos, ambas situaciones deben ser atribuidas a errores no analíticos.

Estos valores muestran nuevamente que la linealidad se pierde después de los 17 ciclos de amplificación para todas las concentraciones de ADN analizadas y para todos los primers. Por este motivo, para contar con un método semicuantitativo para dosar OGM con los distintos primers, se realizó una primer reacción de PCR de 17 ciclos y una reamplificación también de 17 ciclos.

Así se pueden realizar curvas de calibración para 17 ciclos de amplificación y 17 ciclos de reamplificación (Figura 48, partes A,B,C,D y E).

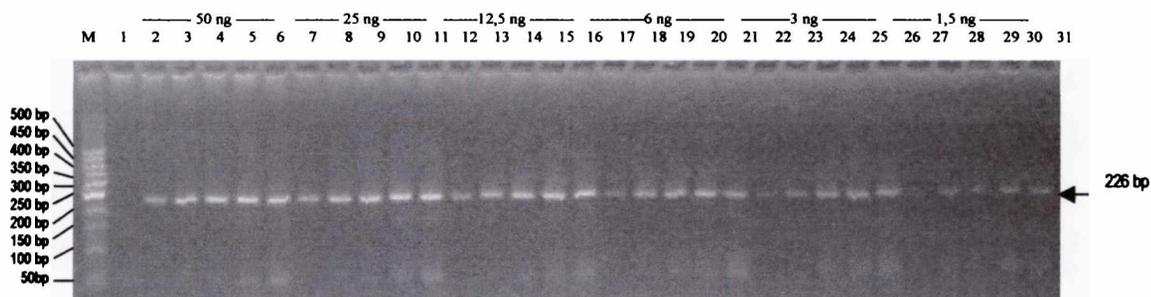


Figura 38A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la primera reacción de PCR cuando se amplifica el gen IVR empleando distintas cantidades de ADN de maíz Bt 176 como molde y el par de primers IVR1/IVR2. Calle M: marcador de peso molecular; Calle 1: control de reactivos de reacción; Calles 2, 7, 12, 17, 22 y 27: 14 ciclos; Calles 3, 8, 13, 18, 23 y 28: 17 ciclos; Calles 4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; Calles 5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; Calles 6, 11, 16, 21, 26 y 31: 26 ciclos; 4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; 5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; 6, 11, 16, 21, 26 y 31: 26 ciclos

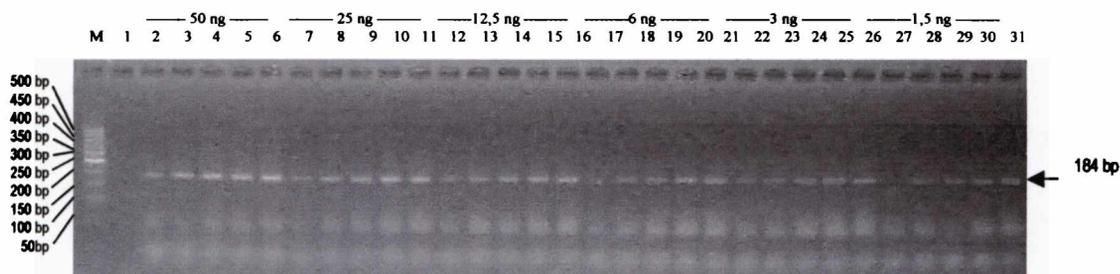


Figura 39A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la primera reacción de PCR cuando se amplifica el transgen de maíz empleando distintas cantidades de ADN de maíz Bt 176 y los primers CRY1/CRY2. Calle M: marcador de peso molecular; Calle 1: control de reactivos de reacción; 2, 7, 12, 17, 22 y 27: 14 ciclos; 3, 8, 13, 18, 23 y 28: 17 ciclos; 4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; 5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; 6, 11, 16, 21, 26 y 31: 26 ciclos.

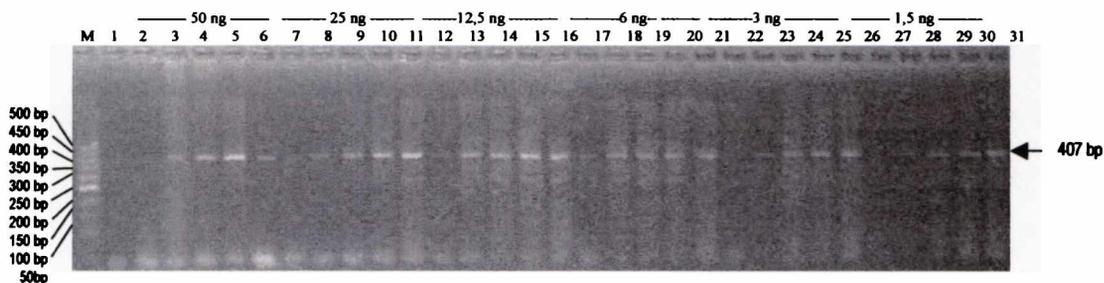


Figura 40A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la primera reacción de PCR cuando se amplifica el gen de lectina de soja empleando distintas cantidades de ADN de soja RR y el par de primers LE1/LE2. Calle M: marcador de peso molecular; Calle 1: control de reactivos de reacción; 2, 7, 12, 17, 22 y 27: 14 ciclos; 3, 8, 13, 18, 23 y 28: 17 ciclos; 4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; 5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; 6, 11, 16, 21, 26 y 31: 26 ciclos; 4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; 5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; 6, 11, 16, 21, 26 y 31: 26 ciclos

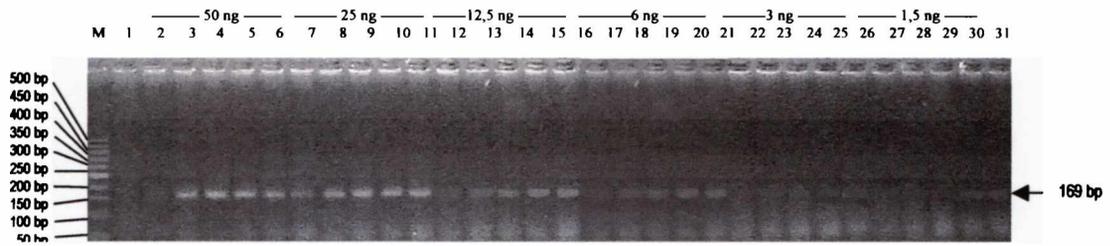
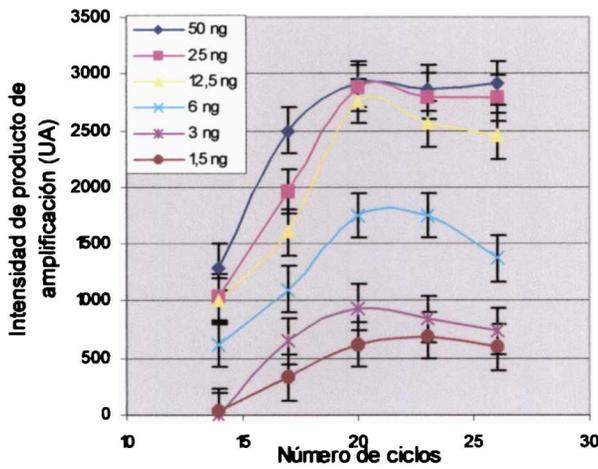


Figura 41A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la primera reacción de PCR cuando se amplifica el transgen de soja empleando distintas cantidades de ADN de soja RR y el par de primers GMO7/GMO8. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control de reactivos de reacción; Calles2, 7, 12, 17, 22 y 27: 14 ciclos; Calles 3, 8, 13, 18, 23 y 28: 17 ciclos; Calles4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; Calles5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; Calles6, 11, 16, 21, 26 y 31: 26 ciclos

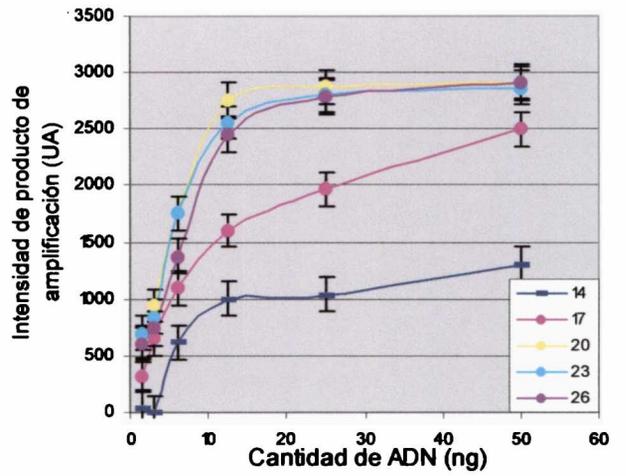


Figura 42A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la primera reacción de PCR cuando se amplifica el promotor 35S empleando distintas cantidades de ADN de maíz Bt176 como molde y el par de primers 35S1/35S2. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control de reactivos de reacción; Calles2, 7, 12, 17, 22 y 27: 14 ciclos; Calles3, 8, 13, 18, 23 y 28: 17 ciclos; Calles4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; Calles5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; Calles6, 11, 16, 21, 26 y 31: 26 ciclos

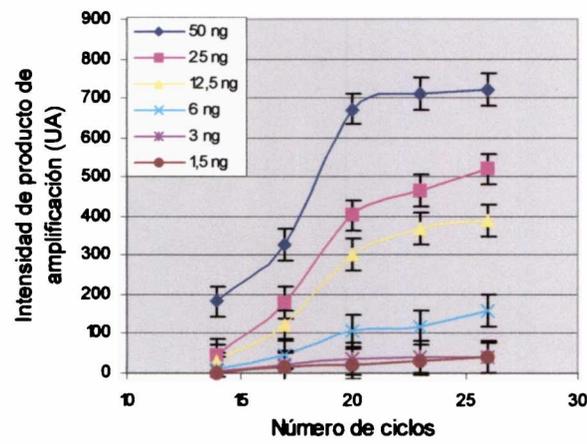
38B1



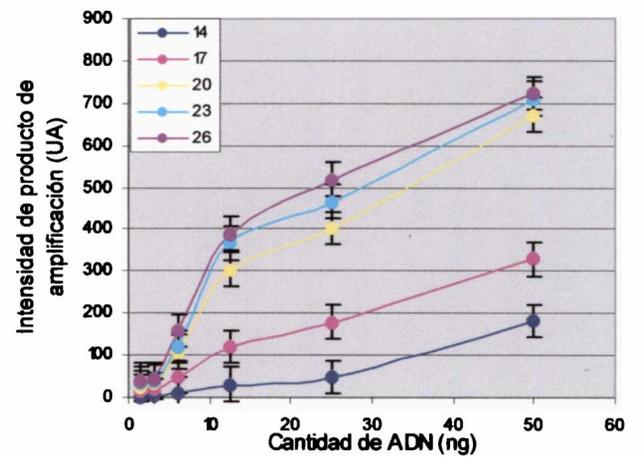
38B2



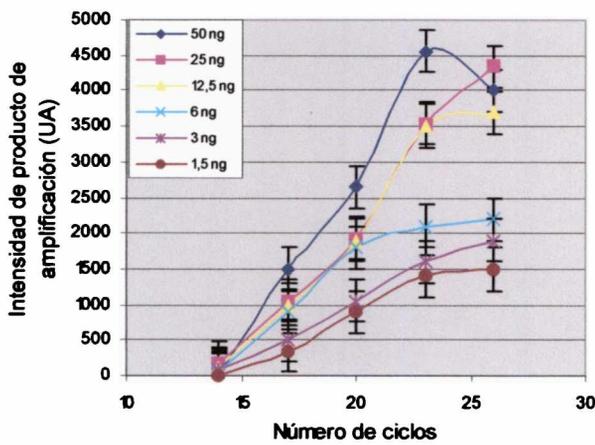
39B1



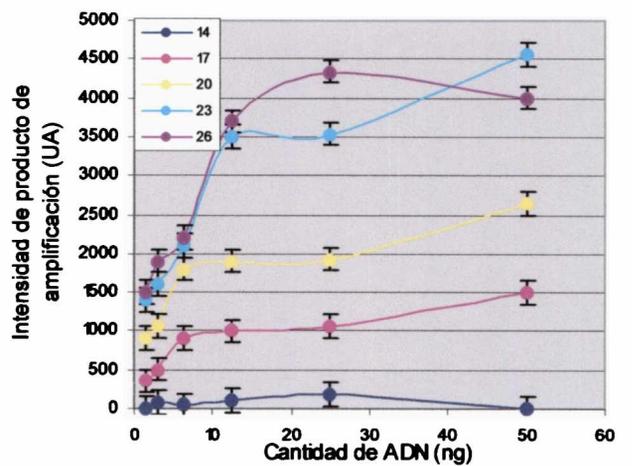
39B2



40B1

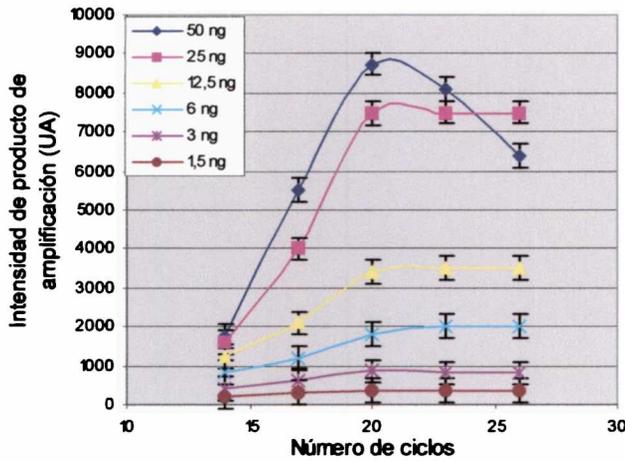


40B2

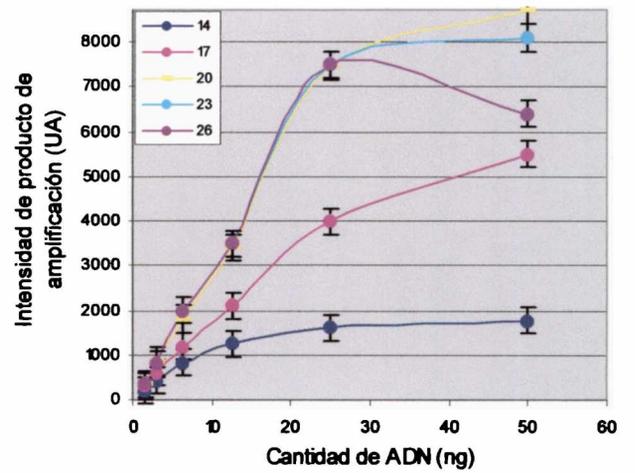


Intensidad de producto de amplificación de reacción de PCR en función del número de ciclos de la primera PCR (B1) y de la cantidad de ADN molde (B2): 38: primers IVR; 39: primers CRY; 40: primers LE; 41: primers GMO y 42: primers 35S
 UA: unidades relativas

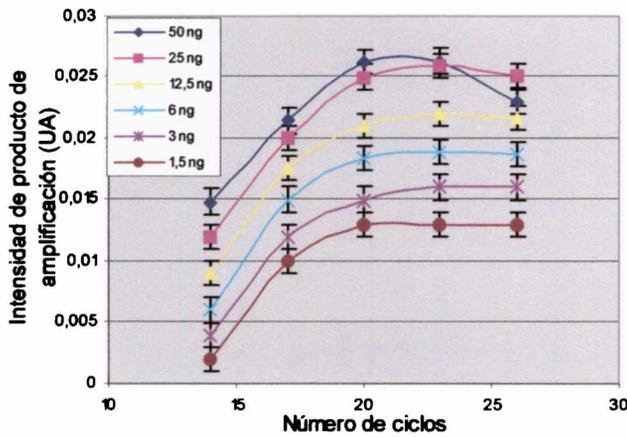
41B1



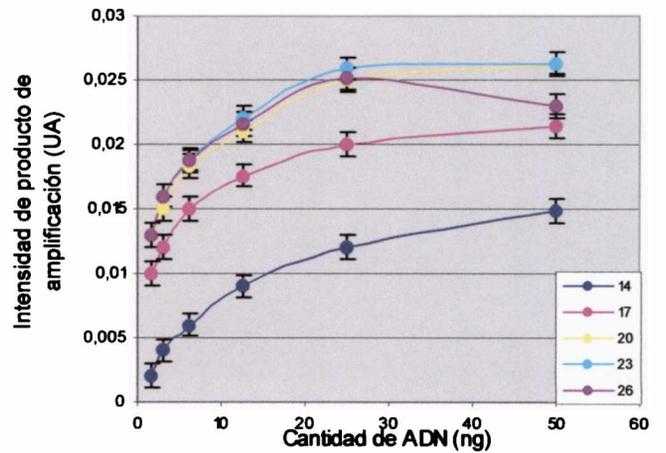
41B2



42B1



42B2



Intensidad de producto de amplificación de reacción de PCR en función del número de ciclos de la primera PCR (B1) y de la cantidad de ADN molde (B2): 38: primers IVR; 39: primers CRY; 40: primers LE; 41: primers GMO y 42: primers 35S
 UA: unidades relativas

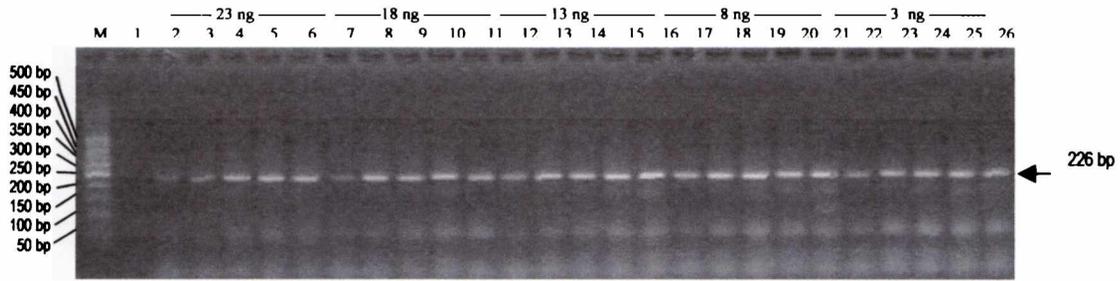


Figura 43A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la segunda reacción de PCR cuando se amplifica el gen IVR empleando distintas cantidades de ADN de maíz Bt 176 como molde y el par de primers IVR1/IVR2. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control de reactivos de reacción; Calles 2, 7, 12, 17, 22 y 27: 14 ciclos; Calles 3, 8, 13, 18, 23 y 28: 17 ciclos; Calles 4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; Calles 5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; Calles 6, 11, 16, 21, 26 y 31: 26 ciclos

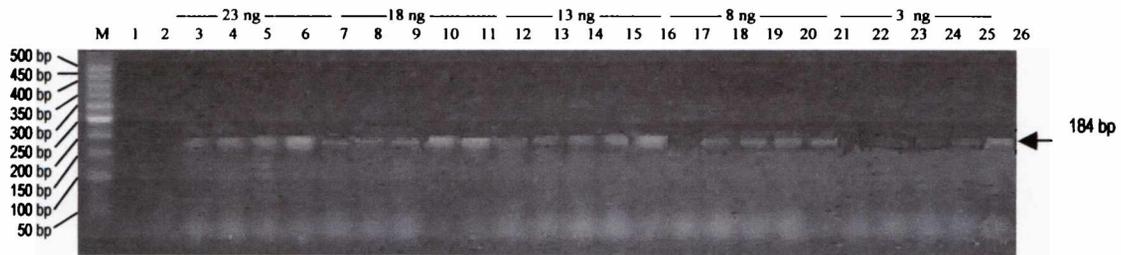


Figura 44A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la segunda PCR cuando se amplifica el transgen de maíz empleando distintas cantidades de ADN de maíz Bt 176 como molde y el par de primers CRY1/CRY2. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control de reactivos de reacción; Calles 2, 7, 12, 17, 22 y 27: 14 ciclos; Calles 3, 8, 13, 18, 23 y 28: 17 ciclos; Calles 4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; Calles 5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; Calles 6, 11, 16, 21, 26 y 31: 26 ciclos

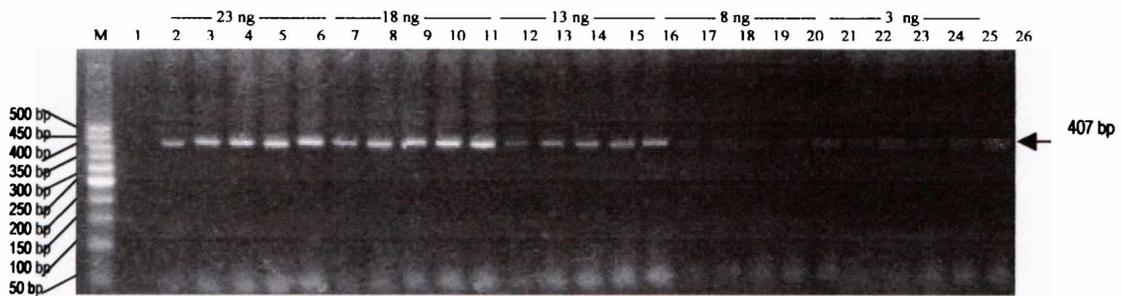


Figura 45A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la segunda reacción de PCR cuando se amplifica el gen de lectina de soja empleando soja RR como molde y el par de primers LE1/LE2. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control de reactivos de reacción; Calles 2, 7, 12, 17, 22 y 27: 14 ciclos; Calles 3, 8, 13, 18, 23 y 28: 17 ciclos; Calles 4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; Calles 5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; Calles 6, 11, 16, 21, 26 y 31: 26 ciclos

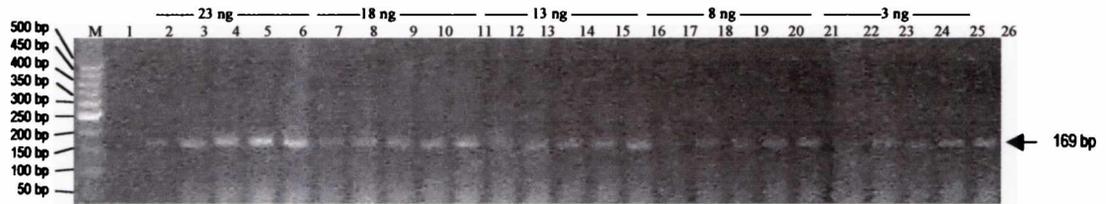


Figura 46A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la segunda reacción de PCR cuando se amplifica el transgen de soja empleando distintas cantidades de ADN de soja RR como molde y el par de primers GMO7/GMO8. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control de reactivos de reacción; Calles 2, 7, 12, 17, 22 y 27: 14 ciclos; Calles 3, 8, 13, 18, 23 y 28: 17 ciclos; Calles 4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; Calles 5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; Calles 6,11,16,21,26 y 31: 26 ciclos

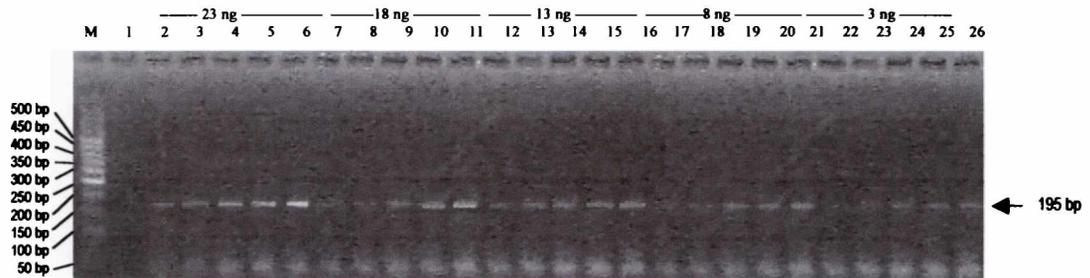
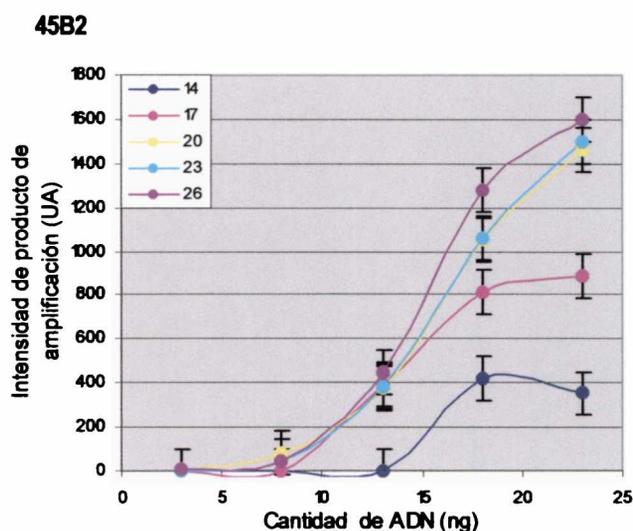
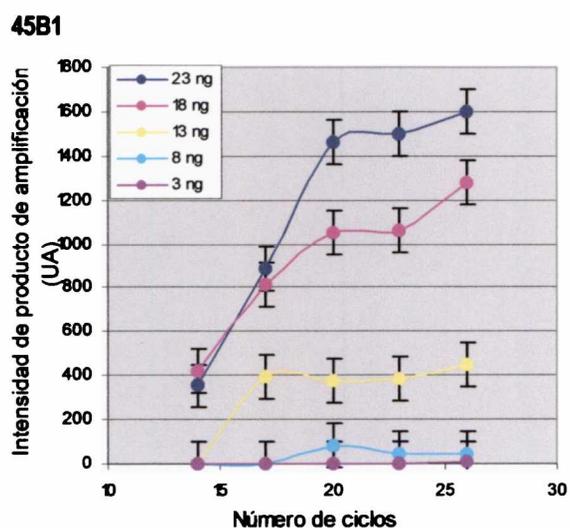
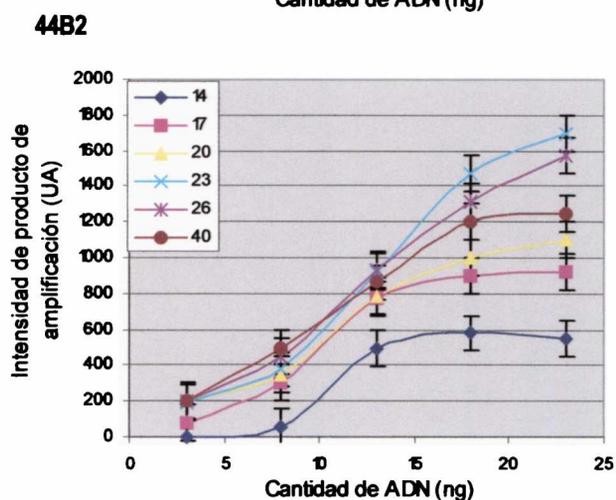
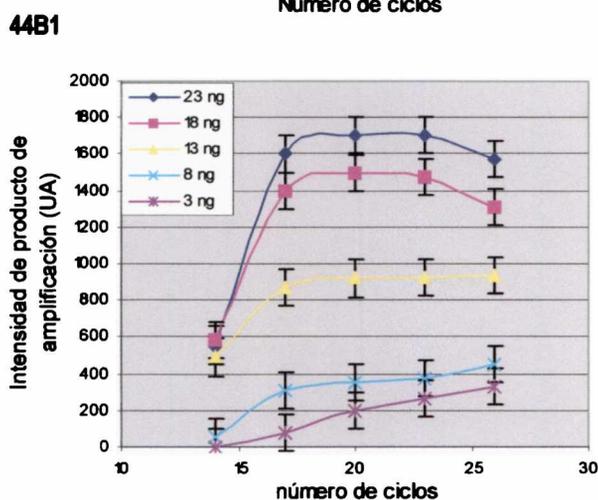
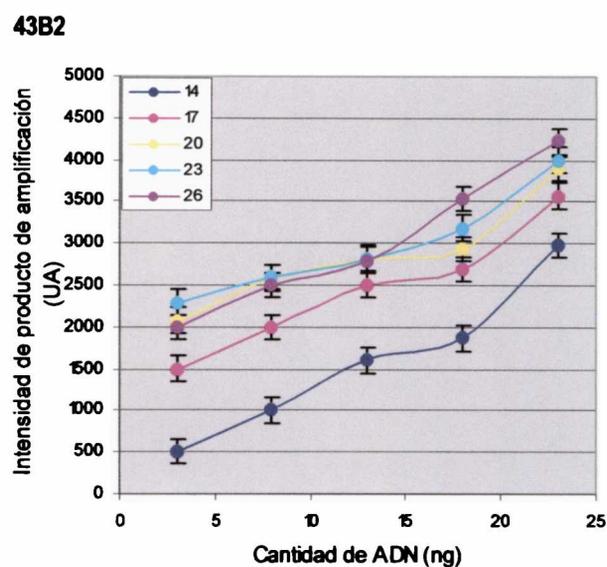
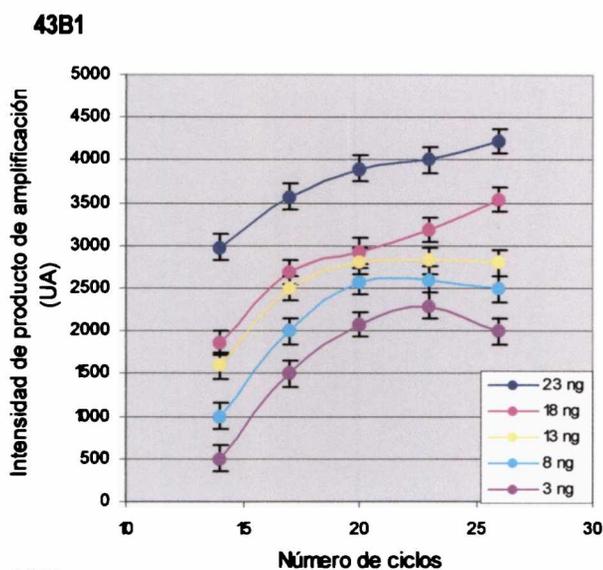
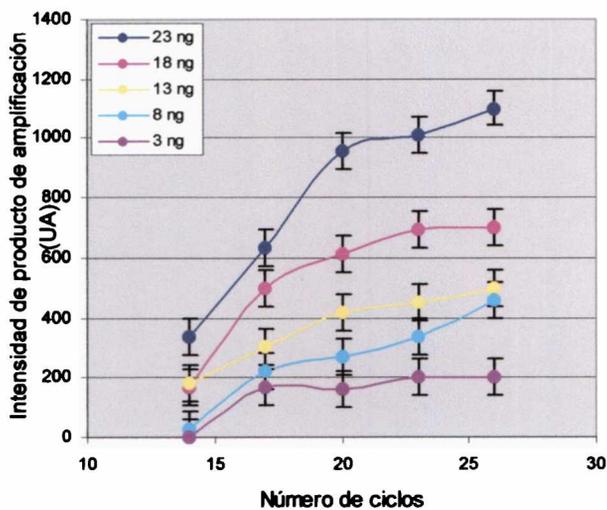


Figura 47A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la segunda reacción de PCR cuando se amplifica el promotor 35S empleando distintas cantidades de ADN de soja RR como molde y el par de primers 35S1/35S2. Calle M: marcador de peso molecular; Calle1: control de reactivos de reacción; Calles 2, 7, 12, 17, 22 y 27: 14 ciclos; Calles 3, 8, 13, 18, 23 y 28: 17 ciclos; Calles 4, 9, 14, 19, 24 y 29: 20 ciclos; Calles 5, 10, 15, 20, 25 y 30: 23 ciclos; Calles 6,11,16,21,26 y 31: 26 ciclos

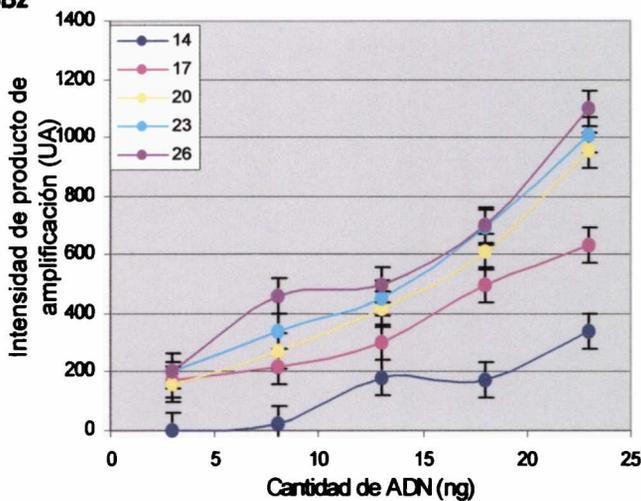


Intensidad de producto de amplificación de reacción de PCR en función del número de ciclos de la segunda PCR (B1) y de la cantidad de ADN molde (B2): 43: primers IVR; 44: primers CRY; 45: primers LE; 46: primers GMO y 47: primers 35S
 UA: unidades relativas

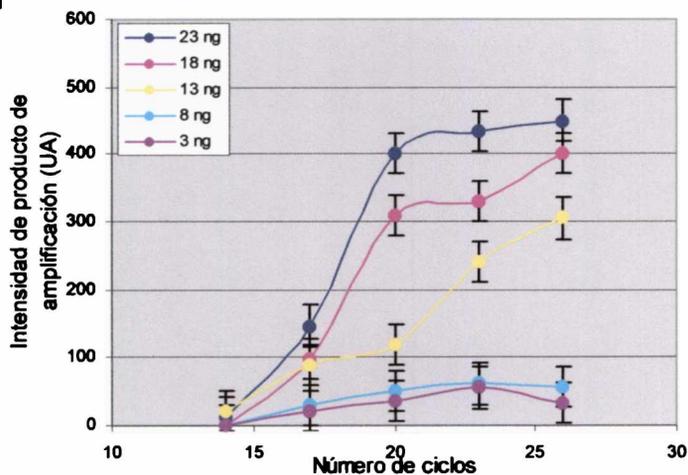
46B1



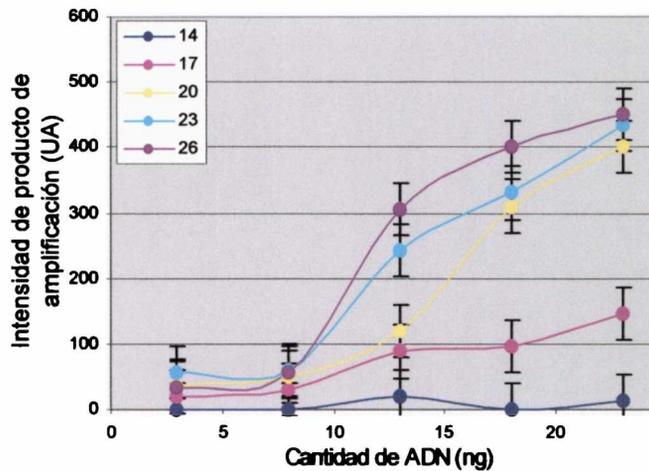
46B2



47B1



47B2



Intensidad de producto de amplificación de reacción de PCR en función del número de ciclos de la segunda PCR (B1) y de la cantidad de ADN molde (B2): 43: primers IVR; 44: primers CRY; 45: primers LE; 46: primers GMO y 47: primers 35S
 UA: unidades relativas

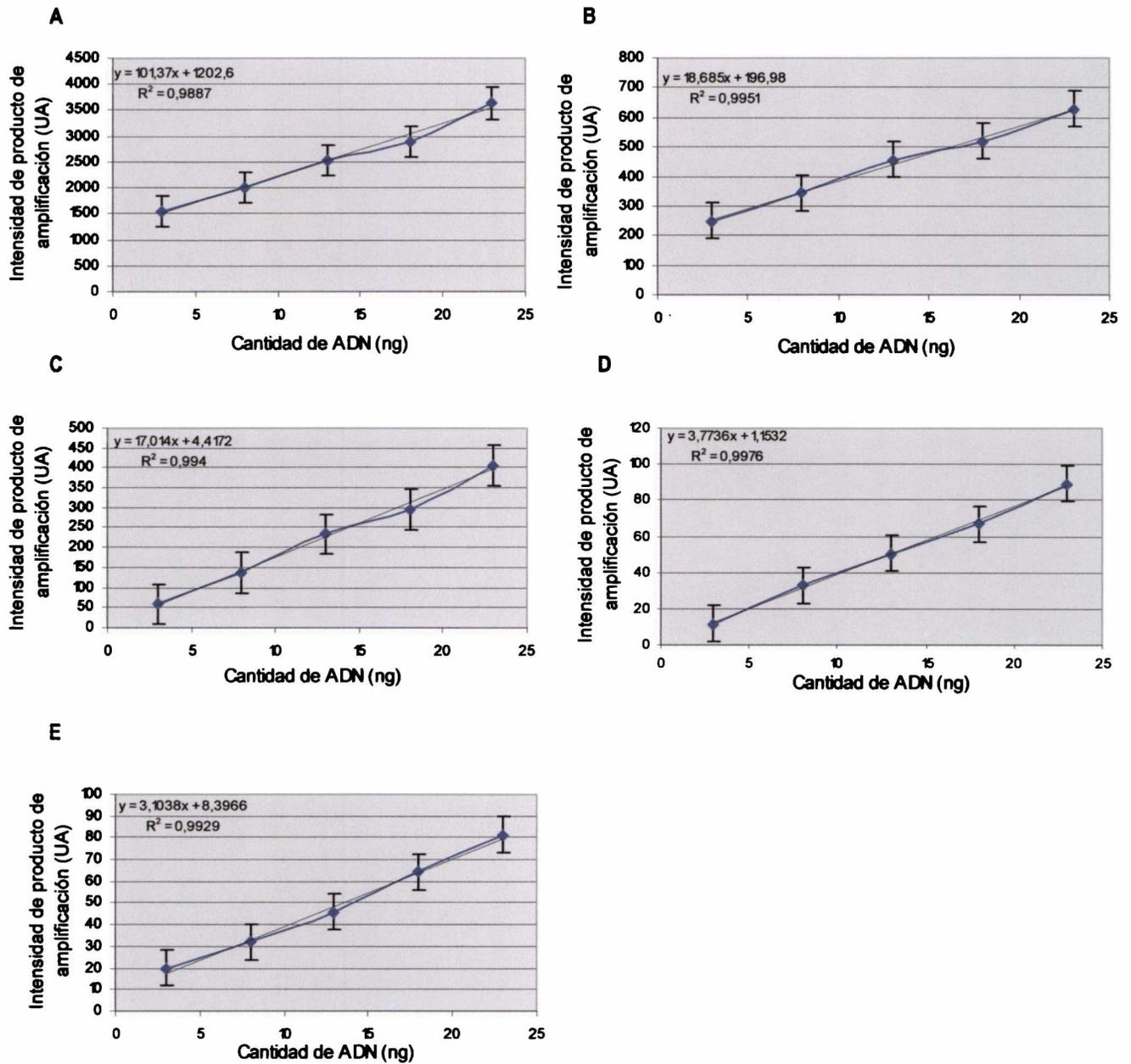


Figura 48: Curvas de calibración cuando se amplifican 3-23 ng de ADN molde, en reacciones de PCR con 17 ciclos de amplificación y 17 ciclos de reamplificación A: primers IVR; B: primers CRY; C: primers LE; D: primers GMO; E: primers 35S

2.7 CONCLUSIONES

Se puso a punto un método semicuantitativo de dosaje de OGM. Para llevar a cabo este método se optimizaron las temperaturas de apareamiento de todos los primers utilizados, siendo para el par IVR1/IVR2 68°C, para LE1/LE2 44°C, para 35S1/35S2 55°C, para GMO7/GMO8 57°C y para CRY1/CRY2 71°C. Además se analizó la especificidad de cada uno de ellos, demostrando ser específicos de invertasa de maíz IVR1/IVR2, específicos de lectina de soja LE1/LE2, específicos de promotor CaMV 35S el par 35S1/35S2, en tanto que fueron específicos de transgen EPSPS GMO7/GMO8 y específicos de gen cryIA(b) CRY1/CRY2.

Con el fin de desarrollar este método semicuantitativo también se optimizó la concentración de DMSO y de magnesio a utilizar en la reacción de PCR. Los resultados obtenidos sugieren que la concentración óptima de DMSO es 5% v/v. En cambio, la cantidad de magnesio depende de la cantidad de ADN total utilizada como molde. Para un rango de ADN de 0,1-25 ng es necesario utilizar 1,5 mM de MgCl₂, y para cantidades de ADN molde comprendidas entre 50-400 ng se debe utilizar una concentración de 4mM.

El método consiste en dos reacciones de PCR consecutivas de 17 ciclos cada una, seguidas de la separación y análisis de la intensidad de los productos de la segunda reacción en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Se trabajó con un rango de linealidad comprendido entre 3-23 ng de ADN molde y la sensibilidad es de 0,1 ng cuando el ADN empleado proviene de granos 100% OGM, se extrae con el método Dellaporta con purificación con fenol/cloroformo y la cantidad obtenida se cuantifica en gel de agarosa por comparación con un estándar de masa conocida (Lambda DNA/Hind III marker, Promega Biotech, USA).

Considerando que el tamaño del genoma de maíz es 2,292 Mb, y suponiendo que el número de copias del promotor 35S que se ha integrado en el genoma es una, 0,1 ng de ADN total (que es la menor cantidad de ADN que se pudo amplificar y dosar de manera semicuantitativa con el método de este trabajo) correspondería a 8,51 fg de ADN blanco. Este límite de sensibilidad será tenido en cuenta en el próximo capítulo donde se analizarán alimentos procesados y harinas mezclas en vez de harinas 100% OGM como las empleadas en esta parte del trabajo.

CAPÍTULO 3:
ANÁLISIS DE ALIMENTOS

3.1 INTRODUCCIÓN

La presencia de ingredientes derivados de OGM en productos alimenticios en el mercado fue objeto de un número de regulaciones europeas que ya fueron mencionadas en la introducción general (Scipioni y col, 2004; Anklam y Neumann, 2002; Miraglia y col, 2004). El marco regulatorio actual sobre el etiquetado, la trazabilidad de OGM y sus derivados en la UE es alcanzado por las reglamentaciones 1829/2003 *“sobre alimentos y piensos modificados genéticamente”* y 1830/2003 *“relativa a la trazabilidad y etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos.”* Dado que las condiciones en que se comercializan los productos alimenticios pueden dar lugar a casos de presencia accidental y técnicamente inevitable de OGMs, estas regulaciones definen un umbral debajo del cual no regirán las obligaciones de trazabilidad ni las de etiquetado. Este umbral excluye de estas obligaciones a *“los alimentos o piensos en los cuales el contenido de OGM aprobados en la Unión Europea no supere el 0,9% de los ingredientes del alimento considerados individualmente o de los alimentos consistentes en un solo ingrediente y a condición de que esta presencia sea accidental o técnicamente inevitable.”* También las regulaciones fijan un umbral de tolerancia *“de hasta 0,5% para la presencia accidental o técnicamente inevitable de eventos no aprobados en la Unión Europea, siempre que estos hayan sido sometidos a una evaluación de riesgo y su resultado haya sido favorable”*. El nivel de tolerancia para aquellos productos que no hayan sido aprobados ni sometidos a una evaluación de riesgos es cero. La regulación 1830/2003, al introducir el concepto de trazabilidad de OGM, modifica substancialmente las reglas de etiquetado diferencial vigentes en la UE desde 1997 al establecer un etiquetado obligatorio de alimentos o ingredientes derivados de OGM independientemente de su detectabilidad, siempre y cuando, en alguna etapa de la producción haya sido detectada su presencia, exigiendo de esta manera el etiquetado de productos refinados como por ej. aceites y azúcar. La aplicación de las normas, determinan por lo tanto, la necesidad de contar con métodos que no sólo detecten la eventual presencia de OGMs sino también que permitan identificarlos específicamente y cuantificarlos en diferentes ingredientes y derivados a lo largo de toda la cadena de producción y comercialización.

Si bien en la Argentina no existe una regulación que determine un valor de corte para el etiquetado de alimentos como OGM, al ser nuestro país productor de comóditos OGM y no OGM, y al deber cumplir los requerimientos de los contratos internacionales de exportación, debe ajustarse a las reglamentaciones europeas, por lo que toda la cadena productiva: semilleros, producción, almacenaje, transporte, procesamiento, distribución, etiquetado, etc., intenta alcanzar los estándares requeridos y los laboratorios de análisis controlan todas las etapas del proceso para cumplir con los contratos entre comprador y vendedor.

Para determinar si un alimento o ingrediente contiene una cantidad de OGM superior al 0,9%, se necesitan métodos analíticos cuantitativos, por lo que en los últimos años los distintos laboratorios han desarrollado un número de métodos para detectar y cuantificar la presencia de ADN blancos (OGM y total) (Wiseman, 2002).

Además, al día de hoy, no está clara la manera de expresión de los resultados cuantitativos. La norma ISO 21570, (2002) da algunas guías pero no define unidades, ni lo hacen las resoluciones europeas que son las que fijan el valor de corte.

El objetivo de esta sección es detectar y cuantificar material OGM derivado de maíz y de soja en distintos alimentos procesados, utilizando un equipamiento sencillo, poco costoso y disponible en la mayor parte de los laboratorios de análisis, con el fin de determinar si éstos deberían ser etiquetados o no como OGM según las regulaciones de la Comunidad Económica Europea mencionadas anteriormente.

3.2 MODIFICACIÓN DEL ADN EN LAS CONDICIONES DE PROCESAMIENTO DE ALIMENTOS

La utilización de las reacciones de PCR para detectar la presencia de material GM en ingredientes (por ej. almidón, aceite, lecitina) y alimentos procesados, está limitada por la cantidad de ADN amplificable extraíble y su calidad. Los tratamientos efectuados durante la producción de ingredientes y alimentos contribuyen a la degradación y ruptura del ADN. A pesar de que su estabilidad está influenciada por la matriz en la que está contenido (England y *col*, 1998), en general puede observarse ruptura al azar del ADN debido a la acción de nucleasas, hidrólisis química por tratamientos a bajo pH que depurinizan y desaminan al ADN, también puede ocurrir fragmentación por tratamientos mecánicos que utilizan fuerzas de corte (extrusión), y por tratamientos térmicos prolongados (St, 2001; ILSI, 2001; Meyer, 1999; Hupfer, 1998). Meyer, (1999), ha informado que en alimentos altamente procesados el ADN sufre rupturas originando fragmentos de un tamaño inferior a 400 bp. Además, se puede producir fragmentación del ADN a lo largo del ensilaje de maíz (Hupfer y *col*, 1999); y algunos procesos, como purificación de azúcares o producción de aceite refinado removerán la mayor parte, sino todo el ADN del producto (Klein y *col*, 1998; Fearing y *col*, 1997; Hupfer y *col*, 2000). Estas modificaciones afectan a todo el ADN, incluido el transgen, aunque la concentración total de ADN determinada por espectrometría puede no verse afectada por estos cambios (Hupfer y *col*, 2000).

Todo esto hace pensar en la importancia crucial del tamaño de la secuencia genómica blanco elegida para la amplificación por PCR. Otro factor importante es la presencia de potenciales inhibidores de la PCR en las matrices de alimentos complejos (Terry y *col*, 2002). Estos factores hacen que la detección de OGM en alimentos procesados sea una tarea complicada.

3.3 CRITERIOS DE ELECCIÓN DE MUESTRAS A ANALIZAR

En la actualidad, los únicos OGM con permiso de comercialización en Argentina que se utilizan en la industria alimenticia son maíz y soja, por lo que es esperable que se puedan detectar y cuantificar en los alimentos procesados que los contengan en su composición o en los que incluyan entre sus ingredientes aditivos derivados de estos cultivos como almidón, jarabe de maíz, maltodextrina, lecitina de soja, aislados y concentrados de soja (Scipioni y *col*, 2004).

El almidón representa el 72,4% del grano de maíz, obteniéndose por molienda húmeda de los granos. Es muy utilizado en la industria alimenticia como estabilizante, espesante y por su capacidad para gelatinizar en snacks, helados etc. (Fennema, 1976a). En una forma similar se obtienen el jarabe de maíz y la maltodextrina. Por molienda seca se obtienen las harinas de maíz, la sémola y el semolín, que se utilizan en productos de panadería (Fennema, 1976a). El proceso de obtención de los derivados mencionados hace que el ADN permanezca en el ingrediente final (Scipioni y *col*, 2004). Por el contrario la obtención de aceite se realiza a través de un proceso de refinamiento, ya sea por prensado o por extracción con solventes como hexano. Este proceso tiene una etapa inicial de degomado que consiste en la extracción de fosfolípidos con la consecuente obtención del aceite degomado. Los fosfolípidos pueden ser purificados obteniéndose de esta forma la lecitina. Por esta razón, la mayor parte del ADN queda en esta fracción, ocasionando una concentración muy baja del mismo en el producto terminado. Estos resultados han sido informados por Wurz y *col*, (1998), Pauli y *col*, (1998), Gryson y *col*, (2002) y Miraglia y *col*, (2004).

Por estas razones, se analizó y cuantificó maíz OGM en alimentos que poseyeran algunos de los derivados antes mencionados en su composición o fueran subproductos obtenidos de la molienda del grano (tabla 21).

Tabla 21: Alimentos en los que se cuantificó maíz GM

Muestra	Razón de la elección
Subproductos de la molienda	
Harina de maíz precocida	100% maíz
Almidón de maíz	100% almidón de maíz
Aceite	Vestigios de maíz
Alimentos altamente procesados	
Sopa Knorr	Declara en el rótulo harina de maíz y aceite vegetal hidrogenado
Poenta	100% maíz
Maizena	100% almidón de maíz
Helado	Declara en el rótulo mezcla de jarabes
Papas fritas	Declara en el rótulo harina de maíz
Bocaditos de maíz	Declara en el rótulo harina de maíz
Triángulos de maíz	Declara en el rótulo harina de maíz
Tubitos de maíz	Declara en el rótulo harina de maíz, almidón y aceite vegetal
Palitos de maíz	Declara en el rótulo harina de maíz
Pochoclo	Declara en el rótulo maíz y aceite vegetal
Bolitas con sabor a chocolate	Declara en el rótulo harina de maíz
Miel	Posible contaminación cruzada con maíz por polinización

La lecitina de soja es un emulsificante natural que se utiliza comercialmente en la formación y estabilización de emulsiones de aceite en agua y en la fabricación de helados, bizcochos, dulces y margarinas (Fennema, 1976b). Los aislados y concentrados proteicos de soja son derivados de soja con un contenido de proteína de 90% y 65-75% respectivamente, que se obtienen por un proceso de refinación que incluyen la extracción de componentes no-proteicos y la remoción y/o inactivación de olores y sabores no deseables, así como de factores antinutricionales. Se usan por sus propiedades funcionales principalmente como ingredientes en productos cárneos (Mc Mindes, 1991; Visser y Thomas, 1987). Los concentrados proteicos se utilizan también en la elaboración de productos panificados y cereales para el desayuno, en tanto que los aislados se emplean en la formulación de análogos de productos lácteos y alimentos para bebés e infantes (Johnson y col, 1992; Visser y Thomas, 1987). Entre los análogos de los productos lácteos se encuentran la leche, el queso y el yogurt de soja; y productos combinados a base de proteínas de soja y de leche vacuna, como postres y helados. En margarinas se incorporan a la fase acuosa, en lugar de leche descremada, para mejorar la fritura (Visser y Thomas, 1987). Los aislados proteicos también se usan en la elaboración de salsas, sopas y guisados como reemplazantes de harina de trigo o de proteínas de leche vacuna, en mousses para realzar las propiedades espumantes y en bebidas instantáneas de distintos sabores para aumentar el contenido proteico (Visser y Thomas, 1987).

Por todas las razones antedichas, se buscó soja GM en harinas y aislados proteicos de soja y en derivados y alimentos altamente procesados, que poseyeran aislados, concentrados o lecitina de soja en su composición. También se obtuvieron aislados de soja a partir de granos de soja convencional y RR. Se tomaron muestras de cada una de las etapas de obtención de los mismos con el fin de verificar en que fracciones del procedimiento se concentraba la mayor cantidad de ADN (Tabla 22).

Tabla 22: Alimentos en los que se cuantificó soja GM

Muestra	Razón de la elección
Muestras obtenidas en laboratorio	
Primer precipitado	Obtenidos a partir de granos de soja
Segundo precipitado	Obtenidos a partir de granos de soja
Sobrenadante	Obtenidos a partir de granos de soja
Aislado	Obtenidos a partir de granos de soja

Concentrado	Obtenidos a partir de granos de soja
Derivados	
Harina de soja (Bunge Argentina y Brasil)	100% soja
Aislados de soja (Bunge Brasil)	90% soja
Aceite	100% soja
Alimentos altamente procesados	
Jugo Ades	Declara en el rótulo
Helado	Declara en el rótulo estabilizantes
Mayonesa Ades	Declara en el rótulo base de soja

3.4 OBTENCIÓN DE ADN DE LOS ALIMENTOS

En el capítulo I se mostró que aunque es posible amplificar utilizando como molde preparaciones de ADN de alimentos relativamente crudas, como por ej. las obtenidas con el método 1-1, la cantidad de producto de amplificación es muy baja. Para algunas muestras, este tipo de preparación es inadecuada, ya que no se obtienen productos de amplificación (capítulo I). Por esta razón, en esta sección para la preparación de ADN de alimentos se empleó el método de Dellaporta seguido de purificación con fenol / cloroformo (capítulo I).

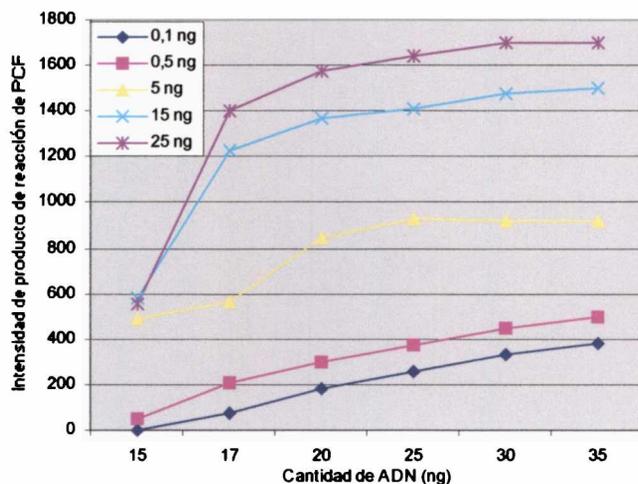
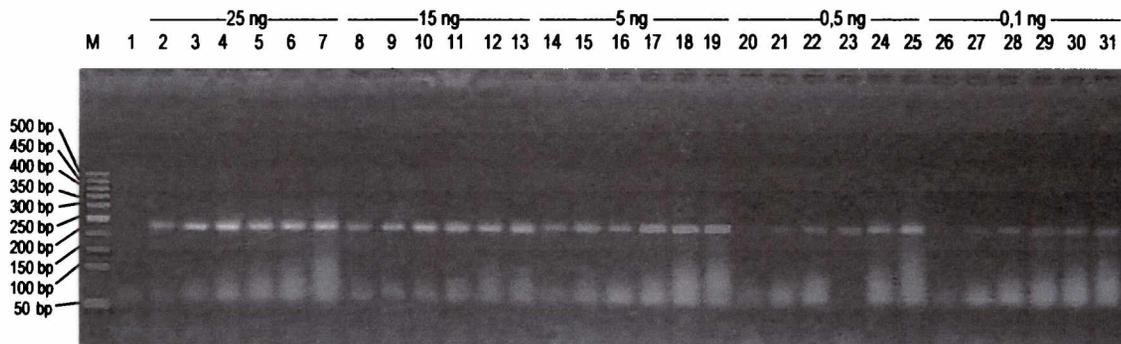
3.5 AJUSTE DE LA REACCIÓN DE PCR A LA DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE LA PRESENCIA DE DERIVADOS DE OGM EN ALIMENTOS

3.5.1 Ajuste de la cantidad de ADN molde

Como se mostró en el capítulo II, existe un rango de trabajo para cada PCR y cada primer. Este rango fue ajustado utilizando distintas cantidades de un ADN obtenido a partir de harinas 100% transgénicas. El límite superior de este rango está determinado por el agotamiento de los reactivos de reacción y el límite inferior por la sensibilidad de visualización de bandas en el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. En el caso de harinas 100% transgénicas, utilizando una cantidad de ADN total molde de 20 ng, en las condiciones de reacción establecidas en el capítulo II era posible detectar hasta 0,1 ng de transgen. Al trabajar con harinas mezclas (transgénicas y no transgénicas), o bien con alimentos que poseen ADN de distintos orígenes, es necesario reajustar algunas de las condiciones de la reacción ya que el transgen se diluye con los otros ADNs presentes. Para mantener la sensibilidad de la reacción en los límites exigidos por las regulaciones, es necesario incrementar la cantidad de ADN molde a ser utilizada en la reacción. Por otro lado, al ser menor el número de copias del ADN blanco, el agotamiento de los reactivos con la consecuente pérdida de linealidad ocurrirá posiblemente a un número de ciclos mayor. Con el fin de confirmar esta hipótesis, se realizaron ampliificaciones utilizando 0,1-25 ng de ADN obtenido a partir de maíz Bt176 como molde, con el par de primers CRY1/CRY2, variando el número de ciclos de la primer reacción de PCR entre 15 y 35, realizando una reamplificación con 17 ciclos. Los productos de amplificación se resolvieron en gel de agarosa 2,5%, los que luego fueron analizados con el programa Kodak (TM)1D Scientific Imaging Systems (Eastman Kodak Company) y se muestran en la figura 49. En la parte A de dicha figura se observa que la intensidad del producto de amplificación aumenta con el número de ciclos de la primera reacción de PCR, para todas las cantidades de ADN molde analizadas. Al graficar la intensidad del producto en función de la cantidad de ADN transgénico, se obtiene la figura 49 parte B, en la que se observa que la

reacción es lineal hasta los 17 ciclos de amplificación para 15 y 25 ng de ADN molde, hasta 20 ciclos para 5 ng de ADN y hasta 35 ciclos para 0,1 y 0,5 ng de molde, lo que confirma la hipótesis. Posteriormente, se realizó la segunda amplificación utilizando los mismos primers e iguales cantidades de ADN molde, los productos de la reacción se reamplificaron variando el número de ciclos entre 15 y 35, obteniéndose resultados similares a los del primer ensayo (datos no mostrados). Por todo esto, con el fin de incrementar la sensibilidad y adecuarla a los límites de detección pedidos para alimentos se incrementó la cantidad de ADN utilizado como molde y el número de ciclos a 35 en ambas reacciones de PCR (amplificación y reamplificación), lográndose la sensibilidad adecuada (datos no mostrados).

A



B

Figura 49: Parte A: Efecto del incremento del número de ciclos de amplificación de la primera reacción de PCR cuando se amplifica el gen cryIA(b) empleando distintas cantidades de ADN de maíz Bt 176 como molde. Calle M: marcador de peso molecular; Calle 1: control de reactivos de reacción; Calles: 2,8,14,20 y 26 : 15 ciclos; Calles: 3,9,15,21 y 27 : 17 ciclos; Calles: 4,10,16,22 y 28 : 20 ciclos; Calles: 5,11,17,23 y 29 : 25 ciclos; Calles: 6,12,,18,24 y 30 : 30 ciclos; Calles: 7,13,19,25 y 31 : 35 ciclos Parte B: Intensidad de producto de amplificación de reacción de PCR cuando se amplifica el gen cryIA(b) en función del número de ciclos de la primer PCR

El límite de cuantificación de un sistema de PCR depende principalmente del tamaño del genoma de la planta blanco. Además, depende de la cantidad de ADN genómico usado en la reacción, del número de transgenes por genoma, de la calidad de los primers, de la concentración de magnesio, de la temperatura de apareamiento (Hübner y col, 2001). Como la sensibilidad del método de PCR ajustado en el capítulo II para harinas 100% OGM fue 0,10 ng y en el presente trabajo se fijó un límite

de dosaje semicuantitativo de 0,05% (0,05 g ADN OGM/100g ADN total) (nivel inferior al exigido por las reglamentaciones de la UE) fue necesario incrementar 2000 veces la cantidad de ADN molde para tener un número de copias de ADN blanco equivalente al que hay en 0,1 ng de ADN de soja o maíz 100% OGM. Por este motivo, en cada reacción de PCR fue necesario colocar como mínimo 200 ng de ADN total para tener el límite de cuantificación buscado.

Empleando 200ng de ADN molde y harinas mezcla OGM y no-OGM en distintas proporciones se logró amplificación hasta el límite de 0,05% del fragmento de interés (datos no mostrados). Esta cantidad total de ADN es del mismo orden de la utilizada por otros autores como por ej. Vollenhofer y col, (1999) y Hübner y col, (2001). Sin embargo es superior a la utilizada por Tozzini y col, (2000), que emplean 15-20 ng de ADN de maíz alcanzando un límite de semicuantificación de 0,5% de transgen.

Considerando que el tamaño del genoma de maíz y de soja es 5.0 Mbp y 2.2 Mbp respectivamente, y que se ha integrado una única copia del transgen en los genomas haploides, el número de copias de transgen presente en 200 ng de maíz y soja 100% OGM es 36000 y 82000 respectivamente (Hübner y col, 2001; Van den Eede y col, 2002). Dado que la sensibilidad del método de PCR ajustado en el capítulo II fue de 0,10ng de OGM, esta cantidad equivale a 18 y 41 copias del transgen presentes en maíz y soja, respectivamente. Este valor está en el orden del número mínimo de moléculas blanco recomendadas para asegurar que ocurra amplificación (Heinemann y Traavik, 2004; Kay y Paoletti, 2001; Kay y Van den Eede, 2001)

3.5.2 Ajuste de la concentración de magnesio

Como se explicó anteriormente, para que el sistema de PCR tenga una sensibilidad de 0,05% se debe trabajar con 200 ng de ADN molde. Este incremento de la cantidad de ADN modifica la cantidad de magnesio libre, ya que el ADN compleja a este ión, lo que determina la necesidad de reajustar la concentración de magnesio óptima para estas nuevas condiciones de reacción. A fin de reajustar esta concentración, se analizó el efecto de distintas concentraciones de cloruro de magnesio en la amplificación de distintas concentraciones de ADN molde, obteniéndose los resultados mostrados en la figura 50. Se observa que la cantidad de producto de amplificación se mantiene constante en un rango de concentraciones de magnesio comprendidas entre 3,5-5 mM y 3,5-6 mM para 50 y 200 ng de ADN molde respectivamente. Por debajo y por encima de estas concentraciones la cantidad de producto de amplificación es inferior. Teniendo en cuenta este resultado en lo sucesivo se utilizará una concentración de magnesio de 4mM.

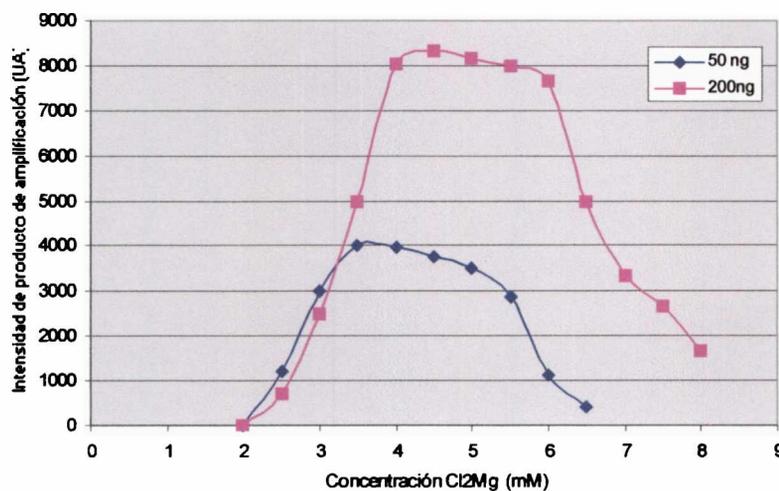


Figura 50: Intensidad de producto obtenido en función de concentración de magnesio, cuando 50 ng y 200 ng se amplifican con el par de primers IVR1/IVR2 y en las condiciones utilizadas en todo éste trabajo. UA: unidades arbitrarias. mM: milimolar

3.5.3 Reacción de PCR optimizada

Según se mostró en el capítulo 2, el mejor rango de linealidad es el que se obtiene para 17 ciclos de amplificación y 17 ciclos de reamplificación. A pesar de esto, como puede observarse en la figura 39B2, entre 17 y 35 ciclos todavía hay proporcionalidad entre la intensidad de producto de amplificación y la cantidad de ADN molde, aunque la pendiente es menor. Por éste motivo, si bien en el capítulo 2 se utilizó 0,1-50 ng de ADN molde y 17 ciclos de amplificación y 14-26 ciclos de reamplificación, en el capítulo 3 se utilizó 0,1-20 ng de ADN molde para el análisis de maíz y 0,1-50 ng para soja y 35 ciclos de amplificación y reamplificación respectivamente. De ésta manera se analizó, en algunos casos, un rango menor de cantidades de ADN molde, pero con mayor sensibilidad, a fin de cuantificar ADN en los alimentos que poseían poca cantidad del mismo. Las muestras que tenían una cantidad de ADN superior a la linealidad de la curva de calibración, se diluyeron de forma de poder utilizar la misma curva.

Así, para demostrar la calidad y cantidad de ADN amplificable que poseían las muestras de alimentos a analizar, se realizaron curvas de calibración para los primers IVR y LE utilizando 0,1-20 ng y 0,1-50 ng de ADN molde respectivamente (figuras 51A, partes A y D).

Además, utilizando los parámetros optimizados en las secciones 3.5.1 y 3.5.2, se realizaron reacciones de PCR para cuantificar promotor CaMV 35S y gen cryIA(b) en muestras de harina de maíz que contenían entre 0,05-0,5% OGM (figura 51A, partes B y C). También se hicieron reacciones para cuantificar promotor CaMV 35S y transgen EPSPS en muestras de harina de soja con 0,05-1% de OGM (figura 51A, partes E y F).

Las figuras 51B, partes A, B, C, D, E y F muestran las curvas de calibración que se obtienen en éstas reacciones de amplificación. Se puede observar que la intensidad de producto de amplificación es proporcional a la cantidad de ADN molde (figura 51B, partes A y D) y al porcentaje de OGM inicial (figura 51B, partes B, C, E y F), presente en las harinas analizadas; debido a esto, las reacciones de PCR optimizadas tal como se explicó antes, se utilizaron en el análisis de alimentos procesados.

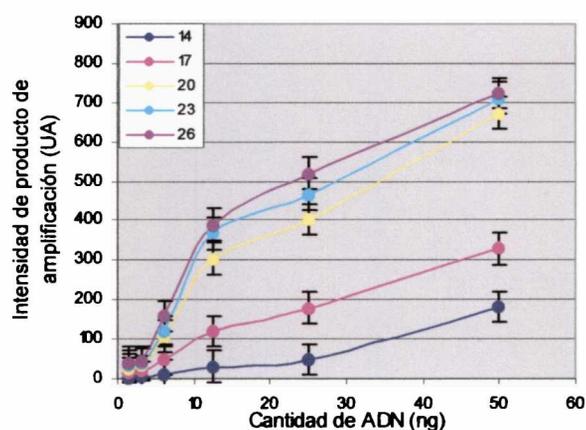


Figura 39B2: Intensidad de producto de reacción de PCR en función de la cantidad de ADN molde de maíz Bt 176, cuando se utiliza el par de primers CRY1/CRY2

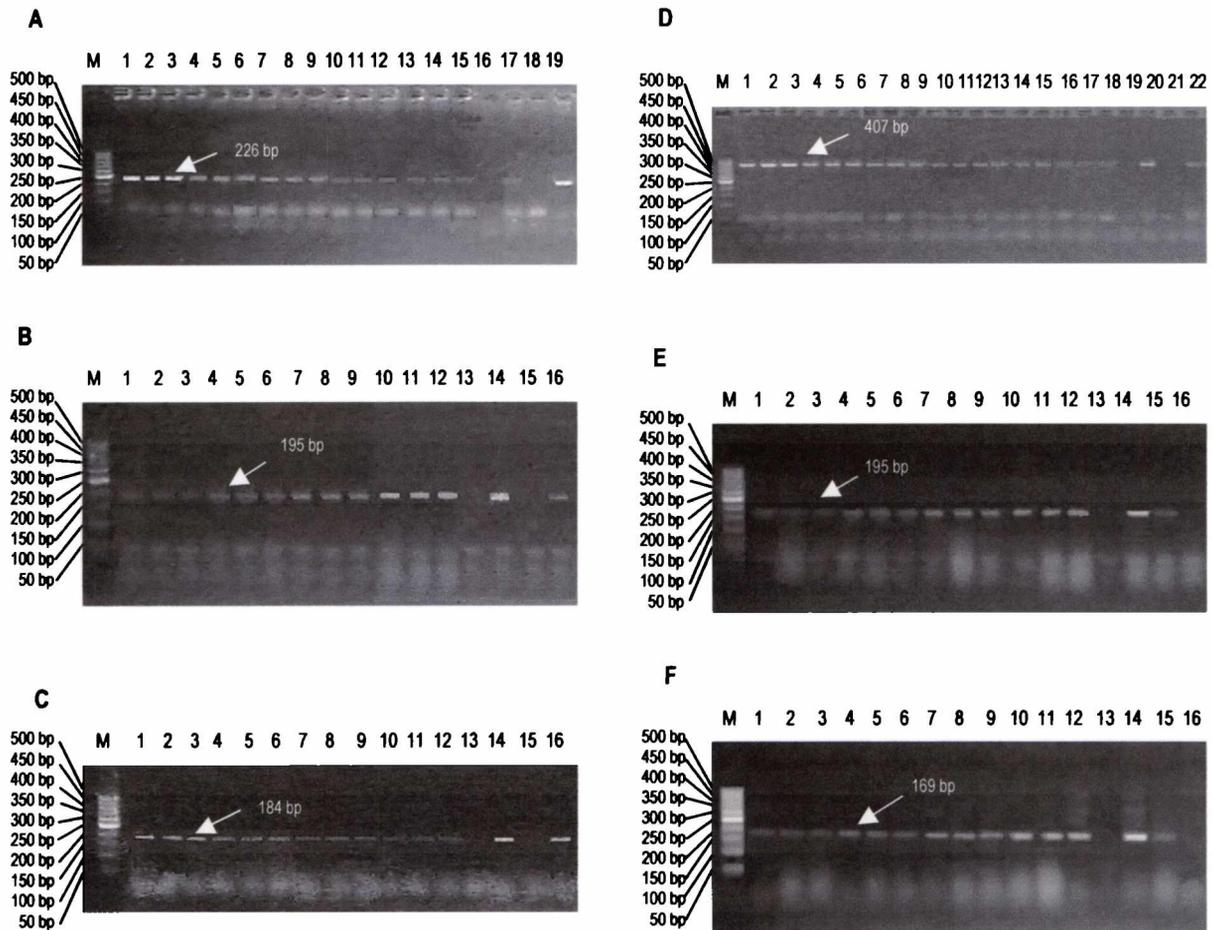


Figura 51A: Curvas de calibración optimizadas para el análisis de alimentos. Parte A: Análisis de invertasa de maíz en alimentos cuando se utilizan 200 ng de ADN molde y el par de primers IVR1/IVR2. M: marcador de peso molecular, 1,2 y 3: 20 ng; 4,5 y 6: 10 ng; 7,8 y 9:5 ng; 10,11 y 12: 1 ng; 13,14 y 15: 0,1 ng; 16: control de reactivos; 17: control de extracción (50 ng); 18: control negativo de ADN target (soja); 19: control positivo de ADN target. Parte B: Análisis de promotor 35S en alimentos cuando se utiliza 200 ng de ADN molde y el par de primers 35S1/35S2. M: marcados de peso molecular, 1,2 y 3: 0,05%; 4,5 y 6: 0,1%; 7,8 y 9: 0,25%; 10,11 y 12: 0,5%; 13: control de reactivos de reacción; 14: control positivo de ADN target; 15: control negativo de ADN blanco; 16: control de extracción. Parte C: PCR para el par de primers CRY1/CRY2. M: marcados de peso molecular, 1,2 y 3: 0,5%; 4,5 y 6: 0,25%; 7,8 y 9: 0,1%; 10,11 y 12: 0,05%; 13: control de reactivos de reacción; 14: control positivo de ADN target; 15: control negativo de ADN blanco; 16: control de extracción. Parte D: Análisis de lectina de soja en alimentos cuando se utilizan 200 ng de ADN molde y el par de primers LE1/LE2. M: marcador de peso molecular, 1,2 y 3: 50 ng; 4,5 y 6: 20 ng; 7,8 y 9: 10 ng; 10,11 y 12: 5 ng; 13,14 y 15: 1 ng; 16,17 y 18: 0,1 ng; 19: control de reactivos; 20: control positivo de ADN target; 21: control negativo de ADN target; 22: control de extracción. Parte E: Análisis de promotor 35S en alimentos cuando se utilizan 200 ng de ADN molde y el par de primers 35S1/35S2. M: marcador de peso molecular, 1,2 y 3: 0,05%; 4,5 y 6: 0,1%; 7,8 y 9: 0,5%; 10,11 y 12: 1%; 13: control de reactivos; 14: control positivo de ADN target; 15: control de extracción; 16: control negativo de ADN target. Parte F: PCR para el transgen EPSPS en alimentos. M: marcador de peso molecular, 1,2 y 3: 0,05%; 4,5 y 6: 0,1%; 7,8 y 9: 0,5%; 10,11 y 12: 1%; 13: control de reactivos; 14: control positivo de ADN target; 15: control de extracción; 16: control negativo de ADN target.

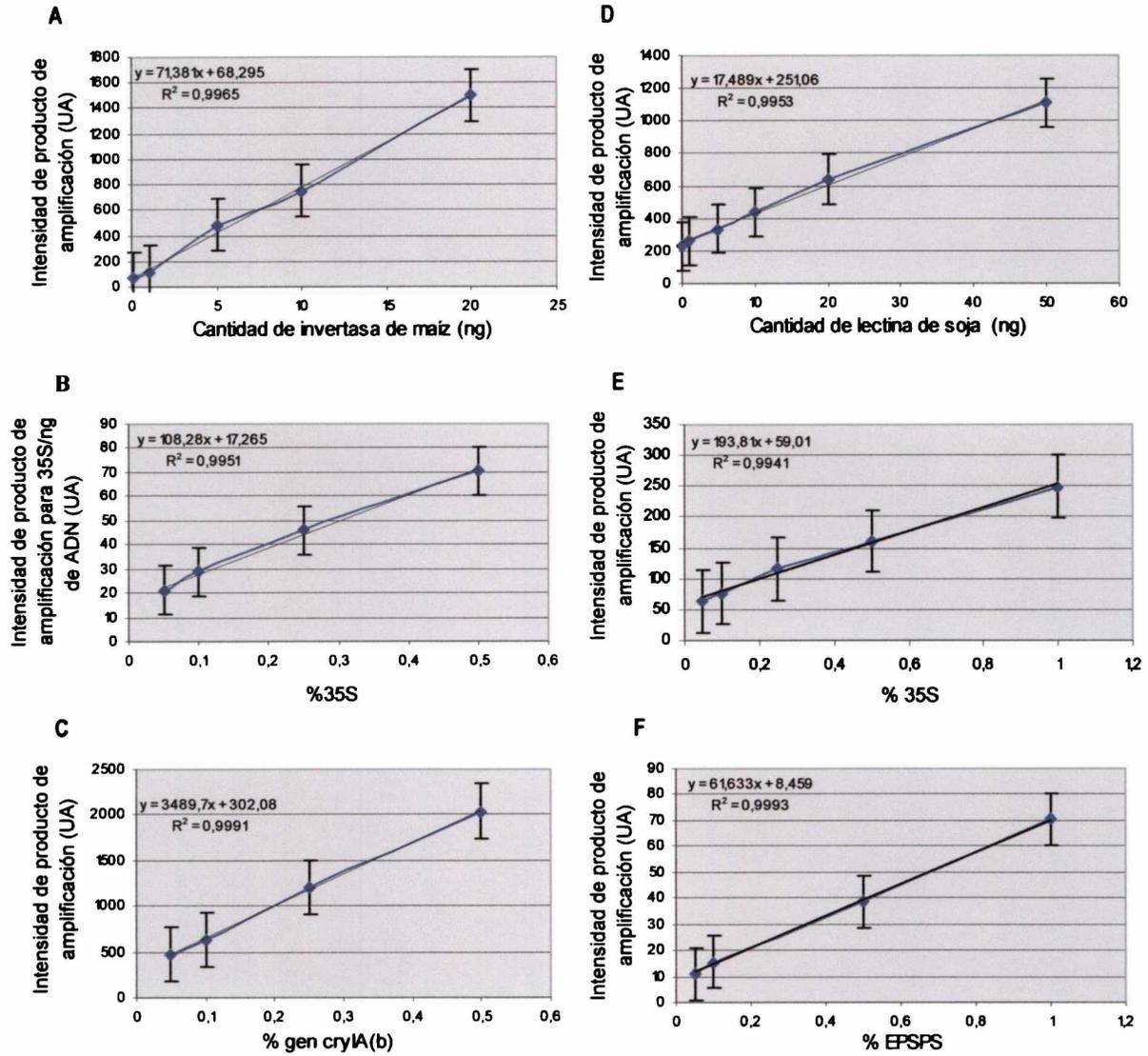


Figura 51B: Intensidad de producto de reacción de PCR. Parte A: en función de la cantidad de ADN cuando 0,1 a 20 ng de ADN total se amplifican con el par de primers IVR1/IVR2. Parte B: en función del porcentaje de maíz OGM cuando 0,05 a 0,5% de maíz transgénico se amplifica con el par de primers 35S1/35S2. Parte C: en función del porcentaje de gen cryIA(b). Parte D: en función de la cantidad de ADN cuando 0,1 a 50 ng de ADN total se amplifican con el par de primers LE1/LE2. Parte E: en función del porcentaje de soja RR cuando 0,05 a 1% de soja RR se amplifica con el par de primers 35S1/35S2. Parte F: en función del porcentaje de soja RR cuando 0,05 a 1% de soja RR se amplifica con el par de primers GMO7/GMO8. UA: unidades arbitrarias

En la bibliografía existen distintos sistemas de PCR que han sido utilizados para la detección y cuantificación de secuencias promotoras, terminadoras, específicas de construcción y específicas de evento. Para el caso del promotor CaMV 35S en alimentos derivados de maíz o que contengan derivados entre sus ingredientes, se compara en la tabla 23 la sensibilidad de estos métodos, las condiciones de reacción empleadas (cantidad de ADN total utilizado en la reacción de PCR, concentración de cloruro de magnesio) y los métodos de extracción de ADN utilizados

Tabla 23: Comparación de métodos de PCR para amplificar el promotor CaMV 35s

Método	Sensibilidad (%OGM)	Sensibilidad (número de copias en 100 ng de ADN total)	Cantidad de ADN (ng)	Concentración de Cl ₂ Mg (mM)	Método de extracción de ADN	Característica	Autor
PCR simple con reamplificación 35S1/35S2	0,05	18	200	4	Dellaporta con P/CL	Semicuantitativo	Este trabajo
PCR simple 35SFZ1/35SFZ2	0,1	36	30-650	2,5	CTAB	Cualitativo	Vollenhofer y col,(1999)
PCR simple 35S1/35S2	0,5	180	15-20	1,5	Dellaporta	Semicuantitativo	Tozzini y col ,(2000)
Real-time 35S1/35S2	0,1	36	200	1,5	Manual de alimentos Suizo	Cuantitativo	Hübner y col,(2001)

El método descrito por Vollenhofer y *col*, (1999), ha mostrado la presencia del transgen 35S en papas fritas de maíz y papas fritas de queso adquiridas en supermercados de Austria, utilizando 30-650 ng de ADN molde con una sensibilidad de 0,1% OGM (36 copias). Igual sensibilidad ha sido informada por Hübner y *col*, (2001), utilizando 200 ng de ADN para cuantificar el promotor 35S en cuatro muestras de materiales de referencia del Instituto de referencia de Materiales y Medidas (IRRM) de concentración desconocida, obteniendo 8,6%, 11,4%, 0,33% y 34% de promotor 35S respectivamente. Por el contrario, Tozzini y *col*, (2000) informan una sensibilidad de 0,5% OGM (180 copias) al dosar semicuantitativamente el promotor CaMV 35S en cargamentos de granos de maíz, encontrando muchos de ellos con menos de 5% de OGM y algunos con menos de 1% de OGM.

La sensibilidad del método del presente trabajo es mayor que la del método utilizado por Tozzini y *col*, (2000), a pesar de que utilizan los mismos primers; esto podría deberse a que las cantidades de ADN molde utilizadas en la reacción de PCR son 200 ng y 15-20 ng respectivamente, y a que si bien ambos utilizan el método de Dellaporta para la extracción de ADN, en el primer caso se realiza purificación de la muestra obtenida, en tanto que en el segundo caso no.

Si se compara el método desarrollado en este trabajo con el informado por Hübner y *col*, (2001) se observa que la sensibilidad del primero es mayor a pesar de que ambos utilizan los mismos primers y 200 ng de ADN molde en la reacción de PCR, y que el segundo utiliza cuantificación por real-time, método que tiene mayor sensibilidad (Kok y *col*, 2002; Ahmed, 2002). Una posible explicación puede ser que el método de Hübner y *col*, (2001) usa una concentración de Cl₂Mg de 1,5 mM, la que según nuestros resultados (capítulo II, sección 3-4-2) es insuficiente para 200 ng de ADN molde. Por otra parte, el método desarrollado en este trabajo utiliza reamplificación, en tanto que la PCR en tiempo real es un método simple; y aunque la fluorescencia desarrollada en este método incrementa la sensibilidad en relación a la medida de fluorescencia en gel de agarosa, nuestro método ha logrado una mayor amplificación.

Cuando se compara la reacción de PCR de este trabajo con la desarrollada por Vollenhofer y *col*, (1999), se observa que la sensibilidad del primero es mayor que la del segundo, probablemente debido a que este último utiliza 2,5 mM de Cl₂Mg, concentración que como se mencionó anteriormente, no es la óptima cuando se utilizan grandes cantidades de ADN molde. Otra posible explicación sería que Vollenhofer y *col*, (1999) extraen el ADN de las muestras (papas fritas de maíz y papas fritas de queso), con el método CTAB; éste método de extracción, según nuestros resultados es menos eficiente en la

extracción y provee muestras con menor pureza que las proporcionadas por el método de Dellaporta con purificación con fenol / cloroformo, utilizada en este trabajo.

Por lo tanto, comparativamente, el método desarrollado en este trabajo permite determinar en forma semicuantitativa la presencia del promotor CaMV 35S en alimentos procesados, con una sensibilidad de 0,05%, cuando se utilizan 200 ng de ADN de maíz como molde, por lo que cumple con los requerimientos que exige la UE y que es similar a otros métodos semicuantitativos (tabla 23). Cuando el mismo promotor se analiza en alimentos que contienen soja o derivados de ésta entre sus ingredientes, se encuentran en la bibliografía distintos sistemas de PCR que se muestran en la tabla 24.

Tabla 24: Comparación de métodos publicados para la detección y cuantificación del promotor CaMV 35S en alimentos que contienen soja entre sus ingredientes

Método	Sensibilidad (% OGM)	Sensibilidad (número de copias en 100 ng de ADN total)	Cantidad de ADN (ng)	Concentración de cloruro de magnesio	Método de extracción del ADN	Característica	Autor
PCR simple con reamplificación 35S1/35S2	0,05	41	200	4 mM	Dellaporta con P/CL	Semicuantitativo	Este trabajo
PCR simple 35SFZ1/35SFZ2	0,01	8	30-650	2,5 mM	CTAB y Qiagen	Cualitativo	Vollenhofer y col,(1999)
PCR competitiva	0,3	250	Necesaria para 250 copias	No informado	CTAB y Wizard	Cuantitativo	Wurz y col, (1999)
Real-time	0,1	30	42	4,5	CTAB y hexano	Cuantitativo	Permingeat y col, (2002)
Real-time 35S1/35S2	0,04	30	200	1,5	Manual de alimentos Suizo	Cuantitativo	Hübner y col, (2001)

El método informado por Vollenhofer y col, (1999), detecta el transgen del promotor del virus del mosaico del coliflor en productos procesados y derivados de soja (cubos de soja, proteína de soja, arrollado de frutilla, bastones de pollo, jamón tostado, espaguetis a base de harina de soja, comida dietética instantánea de banana y chocolate, harina de soja, biscochos con harina de soja, crema de nougat y almendra), inclusive en jugo de soja con una sensibilidad de 0,01% (8 copias), utilizando 30-650 ng de ADN molde. Una sensibilidad similar ha obtenido Hübner y col, (2001) (0,04% OGM, 30 copias), utilizando 200 ng de ADN obtenido a partir de materiales de referencia del IRRM de concentración desconocida. Por el contrario Wurz y col, (1999) cuantifican el promotor CaMV 35S en muestras Fluka con 0,2 y 0,5% de material transgénico, con una sensibilidad de 0,3% OGM (250 copias).

La amplificación de una secuencia transgénica en alimentos es altamente dependiente del método de extracción utilizado (Wurz y col, 1999). Vollenhofer y col, (1999) y Wurz y col, (1999) han empleado métodos comerciales para la extracción y purificación del ADN molde (CTAB y columnas Qiagen, y CTAB y resina Wizard respectivamente); en tanto que en este trabajo se ha utilizado el método de Dellaporta con purificación con fenol / cloroformo, sin embargo se ha obtenido una sensibilidad similar a la informada por Vollenhofer y col, (1999) que también utiliza un sistema de PCR simple. Esto podría deberse a las mismas razones citadas para el caso del maíz.

Si se compara la sensibilidad del presente trabajo con la informada por Wurz y col,(1999), se observa que la segunda es menor, a pesar de que utiliza PCR competitiva y un método comercial de

extracción de ADN que incluye resina Wizard. Una posible explicación sería la utilización de una concentración de magnesio no adecuada, situación que no puede ser aseverada ya que no ha sido informada en el trabajo mencionado.

Al tener en cuenta el método desarrollado por Hübner y col, (1999,) se observa que al igual que para el caso del maíz obtiene una sensibilidad similar a la del presente trabajo.

Si se compara la sensibilidad del presente trabajo con la del desarrollado por Permingeat y col, (2002) se observa que esta última es menor a pesar de que utiliza un método de análisis de alta sensibilidad como el *real-time* y un método de extracción de ADN (buffer CTAB, previo desgrasado con hexano) que, según nuestros resultados, proporciona muestras puras y libres de inhibidores (capítulo II),. Esto podría deberse a que la concentración de magnesio utilizada sería elevada para la cantidad de molde usado en la reacción de PCR (capítulo II, sección 3-4-2).

Se debe remarcar que comparativamente, como en el caso de maíz, el método desarrollado en este trabajo puede dosar en forma semicuantitativa el promotor CaMV 35S en muestras procesadas, con mayor sensibilidad que algunos métodos mostrados en la tabla 24.

Para la detección y cuantificación de gen cryIA(b), se pueden encontrar publicados varios sistemas de PCR que se enumeran en la tabla 25.

Tabla 25: Comparación de métodos publicados para la detección y cuantificación de transgen cryIA(b)

Método	Cantidad de ADN molde (ng)	Concentración de Cl ₂ Mg (mM)	Método de extracción de ADN	Característica	Autor
PCR simple con reamplificación 35S1/35S2	200	4	Dellaporta con P/CL	Semicuantitativo	Este trabajo
Multiplex PCR cryIA 4-5' /cryIA 4-3'	50	1,5	DNeasy	Cualitativo	(James y col, 2003)
Multiplex PCR cryIA b /cryIA s	4 ul del crudo	REExtract Ready Mix	REExtract-N-Amp Plant PCR kit	Cualitativo	(Brinegar y Levee, 2004)
Multiplex PCR cryIA 4-5' /cryIA 3-3' /cryIA 4-5' /cryIA 4-3'	25	1,5	DNeasy	Cualitativo	(Matzuoka, 2002b;)
Multiplex PCR 1F/1R	100	3	CTAB	Cualitativo	(Permingeat y col, 2002)

Los sistemas de multiplex PCR desarrollados por James y col, (2003), Matzuoka y col, (2000) y Permingeat y col (2003) permiten detectar e identificar maíz Bt176, T14,T25, MON 810 y Bt11, pero ninguno de ellos ha sido utilizado para cuantificar maíz GM. Lo mismo ocurre con el método informado por Brinegar y Levee, (2004), que a diferencia de los anteriores ha sido aplicado al análisis del gen cryIA(b) en alimentos procesados (polenta, harina de maíz, *taco shells*, tortilla de papa, cereal de salvado, sémola), a pesar de que para la extracción de ADN se utiliza REExtract-N-Amp Plant PCR kit que emplea únicamente una solución de extracción, sin posterior purificación del extracto crudo. La sensibilidad del método publicado por Permingeat y col, (2002) (0,5%) es menor a la del presente trabajo. Esto podría deberse a que utiliza una menor cantidad de ADN molde en la reacción de PCR y a que utiliza el método de extracción de ADN que usa buffer CTAB, que según las experiencias realizadas en el capítulo I, no proporciona la muestra más pura.

Todos los datos expuestos sugieren que el método semicuantitativo desarrollado en la presente tesis puede ser utilizado en alimentos procesados con una mayor sensibilidad a la de otros métodos.

También se encuentran en la bibliografía numerosos sistemas de PCR para la detección y cuantificación de transgen EPSPS, los que se muestran en la tabla 26.

Tabla 26: Comparación de métodos publicados para la detección y cuantificación de transgen EPSPS

Método	Sensibilidad (% OGM)	Sensibilidad (número de copias en 100 ng de ADN total)	Cantidad de ADN (ng)	Concentración de cloruro de magnesio	Método de extracción del ADN	Característica	Autor
PCR simple con reamplificación GMO7/GMO8	0,05	41	200	4 mM	Dellaporta con P/CL	Semicuantitativo	Este trabajo
PCR simple GMO7/GMO8	0,0001% ADN total en aislado de soja		No informado	2 mM	CTAB y columnas comerciales	Cualitativo	Meyer y Jacaud, (1997)
PCR simple CAM/CTP	0,01	8	30-650	2,5 mM	CTAB y Qiagen	Cualitativo	Vollenhofer y col., (1999)
PCR competitiva	0,3	25	Necesaria para 250 copias	No reportado	CTAB y Wizard	Cuantitativo	Wurz y col, (1999)
Nested PCR 1ªronda:P35S-F2/PETU_T5_R6 2ªronda:35S2_1C/PETU_T5_R1	0,02		1 a 2 ul del ADN aislado a partir de 20 ng de muestra	2 mM	Wizard	Cuantitativo	(Van Hoef y col, 1998)
Real time 35SL/JUND	0,0125	10	10-200	3 – 5,25 mM	DNeasy	Cuantitativo	Taverniers y col, (2001)
Multiplex 3F/3L	0,1	20	34	2 mM	CTAB y hexano	Cuantitativo	Perninge y col, (2002)
Multiplex	0,25	155	150	3,5mM	Wizard	Cuantitativo	Germi y col, (2004)
Real-time	0,04	30	200	1,5	Manual de alimentos Suizo	Cuantitativo	Hübner y col, (2001)

De los métodos presentados los que tienen mayor sensibilidad son los de Meyer y Jacaud (1997) y Vollenhofer y col, (1995) que son métodos cualitativos de detección de transgen EPSPS.

El método desarrollado por Meyer y Jaccaud, (1997) detecta el transgen de soja RR en productos procesados (productos de panadería, chocolate, productos cárneos, lecitina, cereales y fórmulas para infantes a base de soja, jugos de soja, aislados de soja, proteínas texturadas de soja, tofu) y derivados de soja, pero no puede hacerlo en algunos chocolates. El método descrito por Vollenhofer y col, (1999) informa la presencia de transgen EPSPS en los mismos alimentos utilizados en el análisis de promotor 35S (tabla 24) con la misma sensibilidad. Estos métodos utilizan una

distintas cantidades de OGM en el ADN a analizar no alteran la señal de invertasa de maíz (datos no mostrados).

En el capítulo II, la cantidad de ADN extraído de granos se cuantificó por comparación con un patrón de masa conocida en un gel de agarosa 0,8%. A diferencia de esto, cuando se obtiene ADN de alimentos, en general las cantidades son pequeñas, estando por debajo de los límites de detección de éste método. Aunque el número de trabajos publicado hasta el momento sobre análisis de OGM en alimentos es muy reducido resultados similares han sido informados por Peano y col, (2004). En éste último caso, la única forma de conocer la cantidad de ADN extraído es realizar una cuantificación por PCR, que también permite saber si el ADN presente en la muestra a analizar pertenece al cultivo de interés. Con esta finalidad se armó una curva de calibración haciendo diluciones del ADN extraído de un maíz Bt 176 100% OGM en el rango 0,1-20 ng, amplificando por PCR con los primers IVR1/IVR2 y analizando la intensidad de los productos obtenidos. De esta manera se obtuvo una curva para determinar la cantidad de ADN de maíz presente en el alimento.

Debido a que, como se mencionó, no se conoce la cantidad de ADN obtenida de cada alimento, ni la pureza del mismo, se probaron distintas diluciones del ADN extraído de alimentos (tabla 27) para determinar la más adecuada, de tal forma de evitar la interferencia causada por la presencia de inhibidores de PCR, y asegurar que la cantidad de ADN presente en la mezcla de reacción de PCR, sea superior a la mínima requerida para tener la sensibilidad deseada. En los casos en que todas las diluciones analizadas fueron negativas, se utilizó la muestra sin diluir, y en caso de perdurar el resultado negativo, se aumentó la cantidad de muestra.

Tabla 27: Distintas diluciones de los diferentes alimentos analizadas cuando se amplifica invertasa de maíz en 1 µl de muestra con los primers IVR1/IVR2, en las condiciones utilizadas en este trabajo

Muestra	Resultados de la amplificación						
	Dilución del ADN total extraído						
	Sin diluir	1/2	1/5	1/10	1/15	1/20	1/50
Sopa Knorr	-	-	-	-	-	-	-
Polenta	+++	+	+	-	-	-	-
Maizena	+	-	-	-	-	-	-
Miel	+	-	-	-	-	-	-
Helado	+	-	-	-	-	-	-
Harina de maíz precocida	-	+	+++	-	-	-	-
Almidón de maíz	+	-	-	-	-	-	-
Papas fritas Mediterraneas	-	-	-	+++	+	-	-
Bocaditos de maíz	-	-	-	-	-	-	-
Triángulos de maíz	-	-	-	-	-	-	-
Tubitos de maíz	-	-	-	+++	+	-	-
Palitos de maíz Pehuamar	-	-	-	-	-	-	-
Papas fritas Good Show	-	-	-	-	-	-	-
Papas fritas Lays	-	-	-	-	-	-	-
Pochoclo	-	-	-	-	-	-	-
Bolitas con sabor a chocolate	-	-	-	-	-	-	-
Aceite de maíz Mazola	-	-	-	-	-	-	-
Aceite de maíz Inysa	-	-	-	-	-	-	-

Para la cuantificación de una secuencia de interés por PCR, la norma ISO 21570 recomienda que, los puntos de la curva de calibración se realicen por triplicado, que las muestras se analicen por duplicado y para cada una de ellas se realice un control de inhibidores de PCR. Además recomienda, la realización de un control de reactivos de amplificación (mezcla de reacción y agua en vez de molde, para demostrar la ausencia de ácido nucleico contaminante en los reactivos utilizados), un control

positivo de ADN blanco (que se realiza con ADN que posee la secuencia que se requiere cuantificar), un control negativo de ADN blanco (que se realiza con ADN en el que no está presente el gen de interés) y un control positivo de extracción (que se obtiene agregando la menor cantidad de ADN blanco amplificable por la reacción de PCR utilizada). Se decidió trabajar bajo esta norma, por lo que se analizaron las muestras de la curva de calibración y las muestras de alimentos de la forma recomendada. El control de inhibidores de PCR se realizó con 20 ng de muestra de maíz Bt 176 100% OGM, el control positivo de ADN blanco con 200 ng de maíz Bt 176 100% OGM, el control negativo de ADN blanco con 200 ng de soja RR y el control positivo de extracción con 50 ng de ADN de maíz Bt 176 100% OGM.

Los productos de reacción de PCR se resolvieron en un gel de agarosa 2,5% y se analizaron de la misma manera que se describió anteriormente. En la figura 52A se observa que las muestras de polenta (calles 23, 24), Maizena (calles 26 y 27), miel (calles 29 y 30), helado (calles 32 y 33), harina de maíz precocida (calles 35 y 36), almidón de maíz (calles 38 y 39), papas fritas Mediterráneas (calles 41 y 42) y tubitos de maíz (calles 50 y 51) poseen ADN de maíz amplificable y las muestras de sopa Knorr (calles 20 y 21), papas fritas Good Show (calles 56 y 57), papas fritas Lays (calles 59 y 60), pochoclo (calles 62 y 63) y bolitas con sabor a chocolate (calles 65 y 66) no tienen ADN amplificable. También se observa que en las muestras bocaditos de maíz (calles 44 y 45), triángulos de maíz (calles 47 y 48), palitos de maíz (calles 53 y 54), aceite de maíz Mazola (calles 68 y 69) y aceite de maíz Inysa (calles 71 y 72), no se puede amplificar ADN por la presencia de inhibidores, ya que en el tubo que contiene la muestra con agregado de 20 ng de maíz Bt 176 100% OGM no se logra amplificar el fragmento correspondiente a invertasa de maíz.

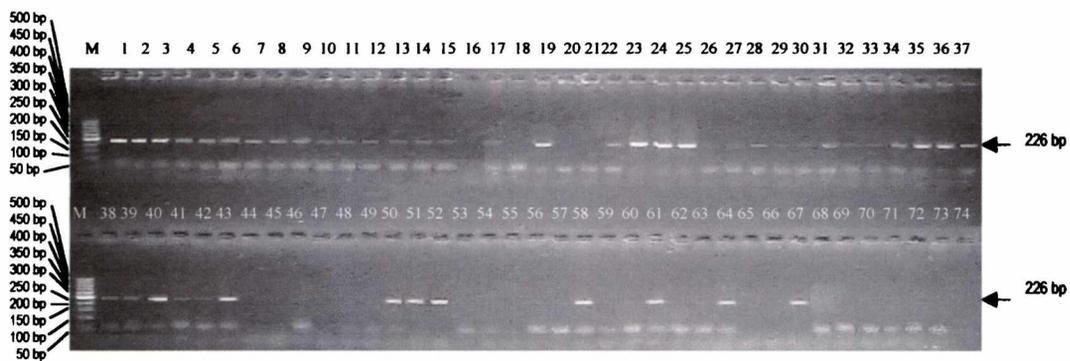


Figura 52A: Análisis de invertasa de maíz en alimentos cuando se utilizan 200 ng de ADN molde y el par de primers IVR1/IVR2
M y 36: marcador de peso molecular; 1,2 y 3: 20 ng ; 4,5 y 6: 10 ng; 7,8 y 9:5 ng; 10,11 y 12: 1 ng; 13,14 y 15: 0,1 ng ; 16: control de reactivos; 17: control de extracción (50 ng); 18: control negativo de ADN target (soja); 19: control positivo de ADN target; 20 y 21: sopa Knorr+ 20 ng maíz; 23 y 24: polenta; 25: polenta + 20 ng de maíz; 26 y 27: Maizena; 28: Maizena + 20 ng de maíz; 29 y 30: miel; 31: miel + 20 ng de maíz; 32 y 33: helado; 34: helado + 20 ng de maíz; 35 y 36: harina de maíz precocida; 37: harina de maíz precocida + 20 ng de maíz; 38 y 39: almidón de maíz; 40: almidón de maíz + 20 ng de maíz; 41 y 42: papas fritas; 43: papas fritas + 20 ng de maíz; 44 y 45: bocaditos de maíz; 46: bocaditos de maíz + 20 ng de maíz; 47 y triángulos de maíz; 49: triángulos de maíz + 20 ng de maíz; 50 y 51: tubitos de maíz; 52: tubitos de maíz + 20 ng de maíz; 53 y 54: palitos de maíz; 55: palitos de maíz + 20 ng de maíz; 56 y 57: papas fritas Good Show; 58: papas fritas Good Show + 20 ng de maíz; 59 y 60: papas fritas Lays; 61: papas fritas Lays+ 20 ng de maíz; 62 y 63: pochoclo; 64: pochoclo +20 ng de maíz; 65 y 66: cocoa blast; 67: cocoa blast + 20 ng de maíz; 68 y 69: aceite Mazola; 70: aceite Mazola + 20 ng de maíz; 71 y 72: aceite Inysa; 73: aceite + 20 ng de maíz

Este último grupo de muestras (las que poseían inhibidores de PCR), se diluyeron y se realizó nuevamente la reacción de amplificación, con los mismos controles de reacción, obteniéndose una vez más resultados negativos, tanto para las reacciones que contienen muestra, como para los controles de inhibición de PCR, lo que confirma la presencia de inhibidores.

Los datos de la figura 52A se graficaron como intensidad de producto de amplificación de PCR en función de la cantidad de ADN de las muestras conocidas (figura 51B, parte A), interpolando los

datos de intensidad de producto de PCR de las muestras de alimentos a analizar se puede obtener la cantidad de ADN de maíz presente en cada una, las que se muestran en la tabla 28.

Tabla 28: Análisis de la cantidad de ADN de maíz en las preparaciones de ADN total de distintos alimentos

Muestra	Amplificación en gel de agarosa			Dilución utilizada en la PCR	µg de ADN de maíz* / g de muestra
	Muestra	Duplicado	Control		
Polenta	+	+	+	Sin diluir	9,6±4,9
Maizena	+	+	+	Sin diluir	1,5±4,2
Miel	+	+	+	Sin diluir	+ *
Helado	+	+	+	Sin diluir	+ *
Harina de maíz precocida	+	+	+	1/5	8,8±4,3
Almidón de maíz	+	+	+	Sin diluir	2,7±4,3
Papas fritas	+	+	+	1/10	8,5±4,1
Mediterráneas					
Tubitos de maíz	+	+	+	1/10	93,0±12,0

*El valor se obtuvo por comparación de la intensidad de los productos de amplificación con los primers IVR de las muestras problemas y una curva de calibración preparada con ADN de maíz.

* Entre 0,1 y 1 no hay diferencia significativa entre las intensidades de producto de reacción por lo que no se puede cuantificar el valor de invertasa de maíz.

3.6.2 Screening de la presencia de maíz transgénico

Comúnmente, los métodos de detección cualitativa usan como método de screening la secuencia del promotor del virus del Mosaico del Coliflor (CaMV 35S) y el terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens* (Wiseman, 2002). Un estudio interlaboratorios mostró que la sensibilidad de los métodos que utilizan 35S varía entre distintos laboratorios. Además, que la detección empleando los primers que reconocen la secuencia NOS es menos sensible que los que utilizan la secuencia del promotor 35S (Wiseman, 2002). Teniendo en cuenta estos resultados se buscó la presencia del promotor 35S y no el terminador NOS como método de screening en las muestras de alimentos, una vez conocida la cantidad de ADN de maíz presente en cada una de ellas.

Además, el promotor CaMV 35S se encuentra en todas las especies transgénicas aprobadas por la CONABIA en Argentina. No ocurre lo mismo con el terminador NOS, pero debe tenerse en cuenta que, como se mencionó en el capítulo II, pueden ocurrir falsos positivos por contaminación con cultivos transgénicos de otras especies, como por ej. si el cultivo a analizar estuviera contaminado con crucíferas como colza y brócoli, infectadas con virus del mosaico del coliflor (Wiseman, 2002; Meyer, 1999), o por la presencia de más de un ingrediente transgénico en el alimento.

Así, con el objeto de determinar en forma semicuantitativa la presencia del promotor CaMV 35S en los ADNs extraídos a partir de alimentos se realizaron dos PCRs consecutivos con 35 ciclos cada uno, empleando los primers 35S1/35S2. La curva de calibración se realizó empleando 200 ng de ADN molde extraído de harinas de maíz que contienen maíz GM y no GM en el rango 0,05- 0,5%. Los puntos de la curva de calibración se realizaron por triplicado. Cada preparación de ADN extraído de distintas muestras de alimentos fue amplificado por duplicado, realizándose para cada una de ellas además un tercer tubo adicionado con 20 ng de ADN de maíz Bt 176 como control de inhibición de PCR. También se realizó un control positivo de ADN blanco empleando ADN obtenido de maíz Bt 176. Se efectuó un control de reactivos que no contenía ADN molde y un control negativo de ADN blanco que poseía ADN obtenido a partir de maíz convencional. Se efectuó además un control positivo de extracción en el que se adicionó 50 ng de ADN extraído de maíz Bt 176. Las muestras de alimentos

procesados que tenían gen de invertasa amplificable se analizaron utilizando las mismas diluciones usadas en la PCR con el par de primers IVR1/IVR2

Luego de realizadas las PCRs, los productos de amplificación se resolvieron en gel de agarosa 2,5 % y se analizaron las intensidades de los productos obtenidos (figura 53A).

Las muestras que resultaron tener ADN de promotor CaMV 35S amplificable fueron las muestras de helado (figura 53A, calles 32 y 33) y almidón de maíz (figura 53A, calles 35 y 36)

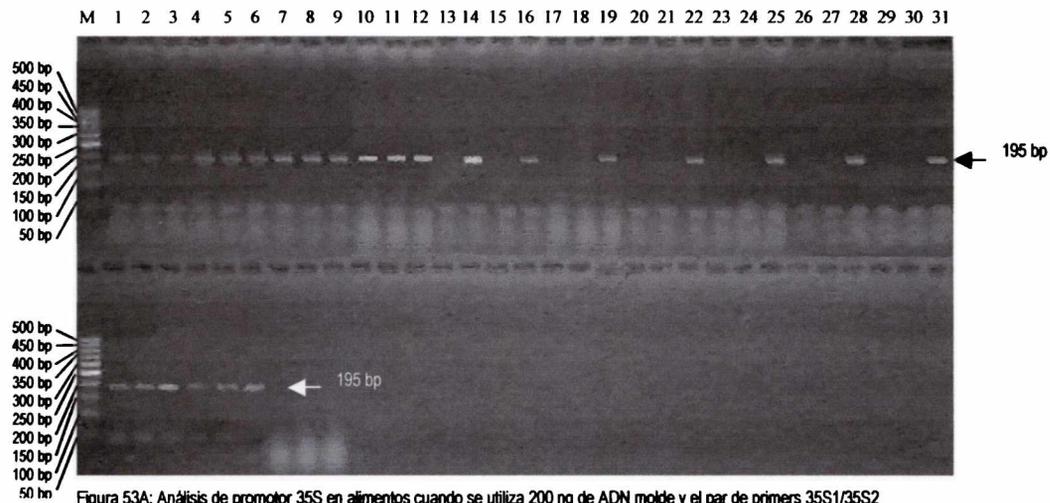


Figura 53A: Análisis de promotor 35S en alimentos cuando se utiliza 200 ng de ADN molde y el par de primers 35S1/35S2
M y 32: marcados de peso molecular; 1,2 y 3: 0,05%; 4,5 y 6: 0,1%; 7,8 y 9: 0,25%; 10,11 y 12: 0,5%; 13: control de reactivos de reacción; 14: control positivo de ADN target; 15: control negativo de ADN blanco; 16: control de extracción; 17 y 18: polenta; 19: polenta + 20 ng de maíz Bt 176; 20 y 21: harina de maíz; 22: harina de maíz + 20 ng de maíz Bt176; 23y 24: tubitos de maíz; 25: tubitos de maíz + 20 ng de maíz Bt 176; 26 y 27: Maizena; 28: Maizena + 20 ng de maíz Bt176; 29 y 30: miel; 31: miel + 20 ng de maíz Bt176; 32 y 33: helado; 34: helado + 20 ng de maíz Bt 176; 35 y 36: almidón de maíz; 37: almidón de maíz + 20 ng de maíz Bt 176; 38 y 39: papas fritas Mediterráneas; 40: papas fritas Mediterráneas + 20 ng de maíz Bt 176

Ya que para algunas muestras, la cantidad de ADN de invertasa obtenida fue insuficiente para colocar 200 ng en el tubo de reacción, para tratar de homologar las medidas de intensidad en el gráfico, se consideró la intensidad por ng de ADN de cada una de las muestras de las curvas de calibración, y se graficó la intensidad del producto de amplificación con los primers 35S por ng de ADN de invertasa de maíz en función del porcentaje de ADN GM de las muestras conocidas (figura 51B, parte B). Interpolando en este gráfico la intensidad de banda por ng de ADN obtenida en las muestras desconocidas, se puede obtener el porcentaje de ADN de promotor CaMV 35S que poseen. Los resultados se presentan en la tabla 29.

Tabla 29: Cantidad de ADN amplificable con los primers 35S1/35S2 en muestras de alimentos

Muestra	Amplificación en gel de agarosa			Cantidad de ADN de maíz (ng)*	Cantidad de promotor CaMV 35S (%)
	Muestra	Duplicado	Control		
Polenta	-	-	+	200	< 0,05
Maizena	-	-	+	30,90	< 0,30
Miel	-	-	+	4,50	< 2,10

Helado	+	+	+	13,50	4,86 ± 0,07
Almidón de maíz	+	+	+	55,65	1,03 ± 0,07
Papas fritas	-	-	+	200	< 0,05
Mediterráneas					
Harina de maíz precocida	-	-	+	200	< 0,05
Tubitos de maíz	-	-	+	200	< 0,05

* el valor corresponde a la cantidad de ADN de maíz utilizada en análisis con los primers 35S

Esta tabla muestra que según los resultados obtenidos del análisis de los lotes de alimentos utilizados en el presente trabajo, tanto el helado como el almidón de maíz deberían ser etiquetados como alimentos derivados de OGM. Por el contrario, la polenta, la Maizena, la miel, las papas fritas Mediterráneas, la harina de maíz precocida y los tubitos de maíz no deben ser etiquetados como OGM debido a que el contenido de material GM derivado de este estudio es menor de 0,9% (punto de corte de la legislación europea).

3.6.3 Primers específicos de OGM

También se analizó la presencia de material OGM mediante el uso del par de primers CRY1/CRY2, que como se mencionó anteriormente, amplifican un fragmento del gen de la δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis*. Se realizó la PCR con la muestra de helado y de almidón de maíz que fueron positivas para transgen 35S.

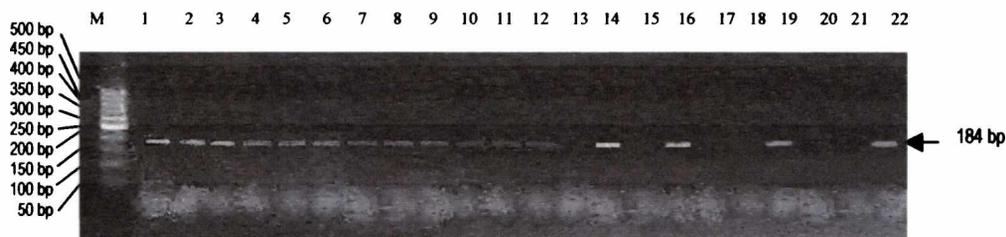


Figura 54: PCR para el par de primers CRY1/CRY2 M : marcados de peso molecular; 1,2 y 3: 0,5%; 4,5 y 6: 0,25%; 7,8 y 9: 0,1%; 10,11 y 12: 0,05%; 13: control de reactivos de reacción; 14: control positivo de ADN target; 15: control negativo de ADN blanco; 16: control de extracción; 17 y 18: helado; 19: helado + 20 ng de maíz Bt 176; 20 y 21: almidón de maíz; 22: almidón de maíz + 20 ng de maíz Bt 176

Como en los casos anteriores, se usaron las harinas de maíz con 0,05 a 0,5% de OGM para realizar la curva de calibración, y se realizaron los controles que recomienda la norma ISO 21570. Luego de realizadas las PCRs, los productos de amplificación se analizaron de la misma forma que en los casos presentados anteriormente. En este caso, como se observa en la figura 54, ni en la muestra de helado (calles 17 y 18), ni en la de almidón de maíz (calles 20 y 21), fue posible amplificar el gen de interés.

3.7 ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO DE SOJA EN ALIMENTOS

3.7.1 Primers específicos de soja

Primeramente, se realizó una PCR con el par de primers LE1/LE2 y 200 ng totales de ADN de soja con 0,05 a 1% (p/p) de material OGM con el objeto de corroborar que la presencia de diferentes cantidades de material transgénico no modifica la amplificación obtenida por iguales cantidades de ADN de lectina de soja (datos no mostrados).

Como en el caso de la búsqueda de ADN de maíz, aquí también se tomaron como base los parámetros de reacción de PCR optimizados en el capítulo II y se practicaron reacciones de amplificación empleando tres juegos distintos de primers.

Con el propósito de buscar la presencia del gen de lectina de soja y, adicionalmente, cuantificar su cantidad para luego utilizar este dato en la búsqueda de ADN GM proveniente de soja, se realizaron diluciones de ADN de soja RR 100% OGM de tal manera de obtener muestras en el rango 0,1-50 ng de ADN, que se amplificaron con los primers LE1/LE2, y se realizó una curva de calibración para lectina de soja.

Para realizar el análisis de maíz OGM en los alimentos, se realizaron diferentes diluciones de cada muestra para elegir la más adecuada, en la que se lograra la mejor situación de compromiso entre dilución de los inhibidores de la reacción de PCR y cantidad de ADN molde presente en la muestra. Debido a que este método de trabajo resultó dificultoso y demoró largo tiempo, se decidió cambiar la estrategia, y utilizar diluciones 1/10 y 1/100 del ADN extraído de los distintos alimentos para el análisis de lectina de soja.

Dado que se decidió trabajar, al igual que en la sección anterior, según lo recomendado por la norma ISO 21570, se realizó un control de reactivos de amplificación al que no se le adicionó ADN molde, un control positivo de ADN blanco que poseía 200 ng de soja RR, un control negativo de ADN blanco empleando 200 ng de maíz Bt 176 y un control positivo de extracción que contenía 50 ng de soja RR. Los productos de amplificación de la reacción de PCR se analizaron de la misma forma que en los casos anteriores.

En la figura 55A se observa que las muestras que tienen ADN de lectina de soja amplificable

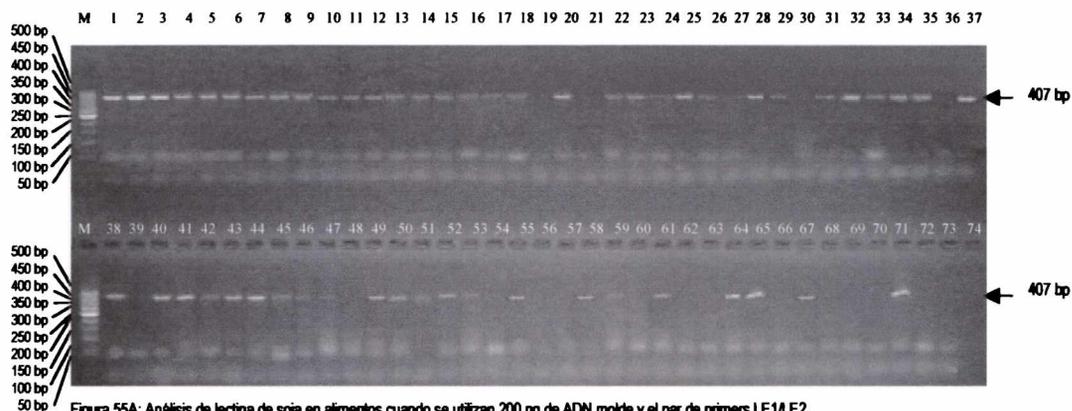


Figura 55A: Análisis de lectina de soja en alimentos cuando se utilizan 200 ng de ADN molde y el par de primers LE1/LE2
M y 38: marcador de peso molecular; 1,2 y 3: 50 ng; 4,5 y 6: 20 ng; 7,8 y 9: 10 ng; 10,11 y 12: 5 ng; 13,14 y 15: 1 ng; 16,17 y 18: 0,1 ng;
19: control de reactivos; 20: control positivo de ADN target; 21: control negativo de ADN target; 22: control de extracción; 23: primer precipitado RR 1/10; 24: primer precipitado RR 1/100; 25: primer precipitado RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 26: primer precipitado convencional 1/10; 27: primer precipitado convencional 1/100; 28: primer precipitado convencional 1/10 + 20 ng de soja RR; 29: segundo precipitado RR 1/10; 30: segundo precipitado RR 1/100; 31: segundo precipitado RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 32: segundo precipitado convencional 1/10; 33: segundo precipitado convencional 1/100; 34: segundo precipitado convencional 1/10 + 20 ng de soja RR; 35: primer sobrenadante RR 1/10; 36: primer sobrenadante RR 1/100; 37: primer sobrenadante RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 38: primer sobrenadante convencional 1/10; 39: primer sobrenadante convencional 1/100; 40: primer sobrenadante convencional 1/10 + 20 ng de soja RR; 41: aislado convencional 1/10; 42: aislado convencional 1/100; 43: aislado convencional 1/10 + 20 ng de soja RR; 44: aislado RR 1/10; 45: aislado RR 1/100; 46: aislado RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 47: harina Bunge Argentina 1/10; 48: harina Bunge Argentina 1/100; 49: harina Bunge Argentina 1/10 + 20 ng de soja RR; 50: aislado Bunge Brasil 1/10; 51: aislado Bunge Brasil 1/100; 52: aislado Bunge Brasil 1/10 + 20 ng de soja RR; 53: aislado Bunge Brasil 1/10; 54: aislado Bunge Brasil 1/100; 55: aislado Bunge Brasil 1/10 + 20 ng de soja RR; 56: aceite de soja 1/100; 57: aceite de soja 1/10 + 20 ng de soja RR; 58: jugo Ades 1/100; 59: jugo Ades 1/10; 60: jugo Ades 1/10 + 20 ng de soja RR; 61: helado 1/10; 62: helado 1/100; 63: helado 1/10 + 20 ng de soja RR; 64: helado 1/10; 65: helado 1/100; 66: helado 1/10 + 20 ng de soja RR; 67: mayonesa Ades 1/10; 68: mayonesa Ades 1/100; 69: mayonesa Ades 1/10 + 20 ng de soja RR; 70: control positivo de ADN target; 71: control de reactivos; 72: control negativo de ADN target

fueron: primer precipitado RR (calles 23 y 24) y convencional (calle 26), segundo precipitado RR (calle 29) y convencional (calles 32 y 33), primer sobrenadante RR (calle 35) y convencional (calle 39), aislado convencional (calles 41 y 42) y RR (calles 44 y 45), harina Bunge Argentina (calle 47), aislado APS 90NB, PI066182ES Bunge Brasil (calle 50 y 51), aislado APS 90HI, PI058034ES Bunge Brasil (calle 53), harina Bunge Brasil (calle 59) y helado (calle 65). A diferencia de éstos, no se pudo amplificar ADN en las muestras de jugo Ades (calles 62 y 63), ni en la de aceite de soja refinado (calles 56 y 57), ya que no puede amplificarse el gen de interés en las muestras pero si puede hacerse en el tercer tubo control que contiene la muestra y soja RR. La ausencia de producto de amplificación en aceite refinado coincide con lo informado por Wurz y col, (1998); Pauli y col, (1998); Gryson y col, (2002); Miraglia y col, 2004).

Tampoco se obtiene el fragmento de 407bp correspondiente al gen de lectina en la muestra de mayonesa (calles 68 y 69) por la presencia de inhibidores, ya que no se amplifica lectina de soja ni en los tubos con muestra, ni en los tubos controles. La mayonesa se diluyó y se realizó una vez más la reacción de PCR, obteniéndose nuevamente resultados negativos en los tubos con muestras y en los controles. La explicación más probable para esto es la presencia de inhibidores de reacción de PCR en la muestra, lo que hace necesario para ésta matriz un método de extracción de ADN con más pasos de purificación.

Los datos se graficaron como intensidad de producto de amplificación de PCR en función de la cantidad de ADN de las muestras conocidas (figura 51B, parte D). Interpolando la intensidad de producto de amplificación obtenido a partir de las muestras desconocidas en la curva de calibración se puede obtener la cantidad de ADN de lectina de soja presente en ellas, que se muestra en la tabla 30.

Tabla 30: Contenido de lectina de soja en las muestras analizadas

Muestra	Amplificación en gel de agarosa			µg de lectina de soja / g de muestra #
	1/10	1/100	control	
Primer precipitado RR	+	+	+	12,6±10,3
Primer precipitado convencional	+	-	+	debajo del límite de detección
Segundo precipitado RR	+	-	+	206,0±8,6
Segundo precipitado convencional	+	+	+	131,7±19,8
Primers sobrenadante RR	+	-	+	38,3±11,2
Primer sobrenadante convencional	-	+	+	6,0±11,9
Aislado convencional	+	+	+	121,6±19,3
Aislado RR	+	+	+	154,7±18,5
Harina Bunge Argentina	+	-	+	0,7±14,0
Aislado APS 90NB, PI066182ES Bunge Brasil	+	+	+	21,2±13,8
Aislado APS 90HI PI058034ES Bunge Brasil	+	-	+	13,4±10,2
Aceite refinado de soja	-	-	+	debajo del límite de detección
Harina Bunge Brasil	+	-	+	97,8±10,1
Jugo de soja	-	-	+	debajo del límite de detección
Helado	+	-	+	109,0±10,2
Mayonesa	-	-	-	debajo del límite de detección

Obtenido estimando la cantidad de ADN de soja por interpolación en la curva de calibración

Los resultados de la tabla 30 muestran que es posible dosar en forma semicuantitativa ADN amplificable en todas las etapas del proceso de obtención de un aislado de soja, en los aislados comerciales y en harina de soja. Por lo tanto, estos resultados permiten determinar que se debe buscar ADN de lectina en los alimentos procesados que tienen en su formulación aislados de soja y/o harina

de soja. También se observa en la tabla 30 que no fue posible cuantificar, con la sensibilidad de nuestro método, ADN de lectina de soja en jugo de soja, mayonesa y aceite refinado de soja.

3.7.2 Screening de la presencia de soja transgénica

Debido a las razones explicadas en la sección 3.6.2, se decidió utilizar la búsqueda de promotor CaMV 35S como prueba de screening del contenido de material OGM derivado de soja en las muestras que demostraron tener ADN de lectina amplificable.

Se utilizaron diluciones 1/10 y 1/100 de cada una de las muestras de alimentos, las que se analizaron por duplicado; los puntos de la curva de calibración se ensayaron por triplicado y se efectuaron los controles recomendados por la norma ISO 21570. Los productos de amplificación de PCR se analizaron de igual forma que en los casos anteriores. Los resultados se muestran en la figura 56A y con ellos se construyó la curva de intensidad de producto por ng de ADN de lectina de soja en función del porcentaje de promotor 35S (figura 51B, parte C).

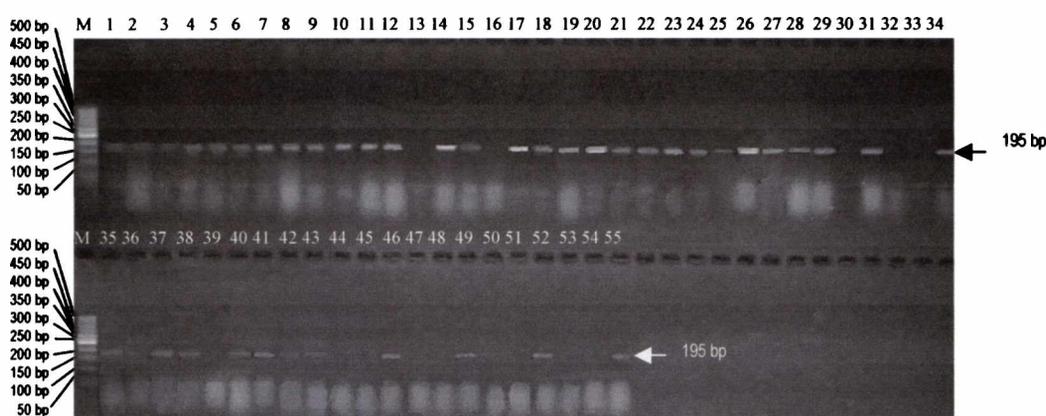


Figura 56A: Análisis de promotor 35S en alimentos cuando se utilizan 200 ng de ADN molde y el par de primers 35S1/35S2

M y 35: marcador de peso molecular; 1,2 y 3: 0,05% ; 4,5 y 6: 0,1%; 7,8 y 9: 0,5%; 10,11 y 12: 1%; 13: control de reactivos; 14: control negativo de ADN target ; 15: control de extracción; 16: control negativo de ADN target; 17: primer precipitado RR 1/10; 18: primer precipitado RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 19: primer precipitado RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 20: segundo precipitado RR 1/10; 21: segundo precipitado RR 1/100; 22: segundo precipitado RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 23: primer sobrenadante RR 1/10; 24: primer sobrenadante RR 1/100; 25: primer sobrenadante RR 1/10 + 20ng de soja RR; 26: aislado RR 1/10; 27: aislado RR 1/100; 28: aislado RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 29: harina Bunge Argentina 1/10; 30: harina Bunge Argentina 1/100; 31: harina Bunge Argentina 1/10 + 20 ng de soja RR; 32: aislado Bunge Brasil 1/10; 33: aislado Bunge Brasil 1/100; 34: aislado Bunge Brasil 1/10 + 20 ng de soja RR; 35: aislado Bunge Brasil 1/10; 36: aislado Bunge Brasil 1/100; 37: aislado Bunge Brasil 1/10 + 20 ng de soja RR; 38: harina Bunge Brasil 1/10; 39: harina Bunge Brasil 1/100; 40: harina bunge Brasil 1/10 + 20 ng de soja RR ; 41: helado 1/10; 42: helado 1/100; 43: helado 1/10 + 20 ng de soja RR; 44: primer precipitado convencional 1/10; 45: primer precipitado convencional 1/100; 46: primer precipitado convencional 1/10 + 20 ng de soja RR; 47: segundo precipitado convencional 1/10; 48: segundo precipitado convencional 1/100; 49: segundo precipitado convencional 1/10 + 20 ng de soja RR; 50: primer sobrenadante convencional 1/10; 51: primer sobrenadante convencional 1/100; 52: primer sobrenadante convencional 1/10 + 20ng de soja RR; 53: aislado convencional 1/10; 54: aislado convencional 1/100; 55: aislado convencional 1/10 + 20 ng de soja RR

En la figura 56A se observa que las fracciones de cada etapa del proceso de producción de aislados a partir de harina de soja RR, contienen el promotor CaMV 35S (calles 17 a 28), en tanto que en las fracciones obtenidas a partir de harina convencional éste está ausente, como era esperado (calles 45 a 56). De igual modo se observa la banda de 195 bp en las muestras harina Bunge Argentina, aislado APS 90NB, PI066182ES Bunge Brasil, helado y harina Bunge Brasil, (calles 29, 36, 39, 42 y 43 respectivamente). En la muestra de aislado APS 90HI, PI058034ES Bunge Brasil, no se observa ninguna banda para ninguna de las diluciones probadas. Por ésta razón se repitió la reacción

de PCR usando la muestra sin diluir, obteniéndose de esa forma el fragmento esperado (resultados no mostrados).

La intensidad de producto de amplificación de PCR se graficó en función del porcentaje de promotor CaMV 35S de las muestras conocidas. Interpolando en el gráfico 51B parte E, la intensidad de producto de amplificación obtenido en las muestras, se puede obtener el porcentaje de ADN transgénico que poseen. Estos valores se presentan en la tabla 31.

Tabla 31: Cantidad de promotor CaMV 35S de las muestras que tienen lectina de soja amplificable

Muestra	Amplificación en gel de agarosa			Contenido de promotor CaMV 35S (g CaMV35S/ 100g ADN soja) #
	1/10	1/100	control	
Primer precipitado RR	+	+	+	> 1 *
Segundo precipitado RR	+	+	+	> 1 *
Primer sobrenadante RR	+	+	+	> 1 *
Aislado RR	+	+	+	> 1 *
Harina Bunge Argentina	+	-	+	3,32±0,03 ♦
Aislado APS 90HI, PI058034ES Bunge Brasil	-	-	+	0,13±0,05
Aislado APS 90NB, PI066182ES Bunge Brasil	+	+	+	0,50±0,04
Harina Bunge Brasil	+	-	+	0,90±0,05
Helado	+	+	+	4,79±0,05 ♦
Primer precipitado convencional	-	-	+	< 0,005 ▽
Segundo precipitado convencional	-	-	+	< 0,005 ▽
Primer sobrenadante convencional	-	-	+	< 0,005 ▽
Aislado convencional	-	-	+	< 0,005 ▽

Obtenido estimando la cantidad de promotor CaMV 35S por interpolación en la curva de calibración

* Las diluciones empleadas estuvieron por encima del rango de linealidad de la curva de calibración.

♦ Para entrar en la curva de calibración se diluyó la muestra, y el valor mostrado corresponde al contenido de promotor corregido por el factor de dilución.

▽ Las diluciones empleadas estuvieron por debajo del rango de linealidad de la curva de calibración.

En la tabla 31 se observa, que según los resultados obtenidos en el presente trabajo, el primer y segundo precipitado RR, primer sobrenadante RR, aislado RR, harina Bunge Argentina, harina Bunge Brasil y el helado deberían ser etiquetados como transgénicos según la legislación de la UE.

3.7.3 Primers específicos del transgen de soja RR

Posteriormente, a las fracciones de obtención de aislados RR y convencional y a las muestras de alimentos que demostraron tener promotor CaMV 35S, se les realizó la cuantificación de transgen de soja RR mediante el uso del par de primers GMO7/GMO8.

Como en los casos anteriores, se realizó una curva de calibración con harinas de soja que contenían 0,05 a 1% de material OGM. Las muestras de la curva de calibración y las de alimentos se analizaron de la forma recomendada por la norma ISO 21570, y se realizaron los controles de reacción propuestos por la misma; los productos de PCR se analizaron con el mismo método que en todos los casos anteriores. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 57A y 51B, parte F.



Figura 57A: PCR para el transgen EPSPS en alimentos

M y 38: marcador de peso molecular; 1,2 y 3: 0,05% ; 4,5 y 6: 0,1%; 7,8 y 9: 0,5%; 10,11 y 12: 1%; 13: control de reactivos; 14: control positivo de ADN target ; 15: control de extracción; 16: control negativo de ADN target; 17: primer precipitado RR 1/10; 18: primer precipitado RR 1/100; 19: primer precipitado RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 20: segundo precipitado RR 1/10; 21: segundo precipitado RR 1/100; 22: segundo precipitado RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 23: primer sobrenadante RR 1/10; 24: primer sobrenadante RR 1/100; 25: primer sobrenadante RR 1/10 + 20ng de soja RR; 26: aislado RR 1/10; 27: aislado RR 1/100; 28: aislado RR 1/10 + 20 ng de soja RR; 29: harina Bunge Argentina 1/10; 30: harina Bunge Argentina 1/100; 31: harina Bunge Argentina 1/10 + 20 ng de soja RR; 32: aislado Bunge Brasil 1/10; 33: aislado Bunge Brasil 1/100; 34: aislado Bunge Brasil 1/10 + 20 ng de soja RR; 35: aislado Bunge Brasil 1/10; 36: aislado Bunge Brasil 1/100; 37: aislado Bunge Brasil 1/10 + 20 ng de soja RR; 39: harina Bunge Brasil 1/10; 40: harina Bunge Brasil 1/100; 41: harina bunge Brasil 1/10 + 20 ng de soja RR ; 42: helado 1/10; 43: helado 1/100; 44: helado 1/10 + 20 ng de soja RR; 45: primer precipitado convencional 1/10; 46: primer precipitado convencional 1/100; 47: primer precipitado convencional 1/10 + 20 ng de soja RR; 48: segundo precipitado convencional 1/10; 49: segundo precipitado convencional 1/100; 50: segundo precipitado convencional 1/10 + 20 ng de soja RR; 51: primer sobrenadante convencional 1/10; 52: primer sobrenadante convencional 1/100; 53: primer sobrenadante convencional 1/10 + 20ng de soja RR; 54: aislado convencional 1/10; 55: aislado convencional 1/100; 56: aislado convencional 1/10 + 20 ng de soja RR

En la figura 57A se observa que las fracciones de cada etapa del proceso de producción de aislados a partir de harina de soja RR, contienen el transgen EPSPS (calles 17 a 28), en tanto que en las fracciones obtenidas a partir de harina convencional éste está ausente, como era esperado (calles 45 a 56). De igual modo se observa la banda de 169 bp en las muestras harina Bunge Argentina, aislado APS 90NB, PI066182ES Bunge Brasil y helado, (calles 29, 35, 42 y 43 respectivamente). En la muestra de aislado APS 90HI, PI058034ES Bunge Brasil y harina Bunge Brasil, no se observa ninguna banda para ninguna de las diluciones probadas; por ésta razón, se repitió la reacción de PCR usando la muestra sin diluir, obteniéndose de esa forma el fragmento esperado (datos no mostrados).

Se graficó la intensidad de producto de amplificación de PCR en función del porcentaje de transgen de soja RR de las muestras conocidas (figura 51B parte F). Interpolando en el gráfico la intensidad de producto de amplificación obtenido en las muestras desconocidas, se puede obtener el porcentaje del fragmento amplificado del transgen EPSPS que se presenta en la tabla 32, donde también se exponen los porcentajes de transgen de las muestras referidas al ADN total de cada una.

Tabla 32: Contenido de transgen EPSPS de las muestras que tienen promotor CaMV 35S

Muestra	Amplificación en gel de agarosa			Contenido de transgen de soja RR (g EPSPS/ 100g ADN soja) #
	1/10	1/100	control	
Primer precipitado RR	+	+	+	> 1*
Segundo precipitado RR	+	+	+	> 1*
Primer sobrenadante RR	+	+	+	> 1*
Aislado RR	+	+	+	> 1*
Harina Bunge Argentina	+	-	+	2,29±0,11 ♦
Aislado APS 90HI, PI058034ES Bunge Brasil	+	-	+	0,10±0,11
Aislado APS 90NB, PI066182ES Bunge Brasil	+	-	+	0,47±0,12
Harina Bunge Brasil	-	-	+	< 0,05 ^v
Helado	+	+	+	4,03±0,11 ♦
Primer precipitado convencional	-	-	+	< 0,005 ^v
Segundo precipitado convencional	-	-	+	< 0,005 ^v
Primer sobrenadante convencional	-	-	+	< 0,005 ^v
Aislado convencional	-	-	+	< 0,005 ^v

- # Obtenido estimando la cantidad de transgen de soja RR por interpolación en la curva de calibración
- * Las diluciones empleadas estuvieron por encima del rango de linealidad de la curva de calibración.
- ♦ Para entrar en la curva de calibración se diluyó la muestra, y el valor mostrado corresponde al contenido de promotor corregido por el factor de dilución.
- ▽ Las diluciones empleadas estuvieron por debajo del rango de linealidad de la curva de calibración.

En la tabla se ve que, según los resultados obtenidos en el análisis de las muestras utilizadas en el presente trabajo, el primer y segundo precipitado RR, primer sobrenadante RR, aislado RR, harina Bunge Argentina y el helado deberían ser etiquetados como transgénicos ya que poseen un porcentaje de OGM mayor de 0,9% y que los aislados APS 90HI, PI058034ES Bunge Brasil y APS 90NB, PI066182ES Bunge Brasil no deben ser etiquetados como transgénicos ya que el contenido de transgen EPSPS es menor al valor de corte requerido por las regulaciones internacionales. Tampoco debe ser etiquetada la harina Bunge Brasil, ya que no se ha podido cuantificar el fragmento del transgen EPSPS con la sensibilidad del presente método. La tabla 35, también muestra que no se pudo cuantificar el fragmento del transgen EPSPS en la harina Bunge de Brasil.

3.8 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.8.1 Cuantificación de OGM en alimentos: limitaciones

Actualmente existe un gran debate a cerca de cómo deben expresarse las concentraciones de OGM. Las resoluciones europeas 1829/2003 y 1830/2003, que son las que fijan el valor de corte a cumplir, no definen unidades; tampoco lo hace la norma ISO 21570, que considera que si un alimento contiene más de un OGM perteneciente a un taxón blanco, la cantidad debe ser cuantificada para cada OGM y sumarla.

Para evaluar la cantidad de cada transgen presente en el alimento y la cantidad de ADN de taxón, se puede utilizar, según la norma, PCR en tiempo real o PCR de punto final para cada uno de los genes que se está investigando. Luego, la relación de la cantidad de transgen a cantidad de taxón expresada daría la fracción de OGM presente en el alimento (ISO/DIS 21570). Como se mencionó anteriormente, el artículo 12 del reglamento 1829/2003 de la UE excluye de las obligaciones de trazabilidad y etiquetado a los alimentos o piensos en los que el contenido de OGM (aprobados en la UE) no supere el 0,9% de los ingredientes del alimento considerados individualmente o de los alimentos consistentes en un solo ingrediente y a condición de que ésta presencia sea accidental o técnicamente inevitable; pero no define si el 0,9% es peso de transgen por peso de taxón, o número de copias de transgen por número de copias de taxón. Si el peso del transgen se refiere al peso del taxón, entonces habría que hallar la masa del promotor 35S o de los transgenes presentes en la muestra mediante una PCR con un par de primers adecuados al fragmento que se desea cuantificar, y la masa del ADN de invertasa de maíz o de lecitina de soja de la muestra mediante una PCR con el par de primers IVR1/IVR2 o LE1/LE2 respectivamente, y realizar la relación entre ambos. Para expresar el porcentaje de transgen como relación del número de copias del transgen a taxón se debe hallar el número de copias de transgen y de ADN especie específico que se encuentra en la muestra y realizar la relación.

Pero la opinión de Taverniers y col, (2001), es que cuando se expresan los resultados cuantitativos en porcentaje en peso (p/p %), se hacen cuantificaciones incorrectas, ya que la señal fluorescente medida en el real-time o la fluorescencia del bromuro de etidio, se refiere al ADN presente (lo que se refiere al genotipo del transgen), mientras que el porcentaje en masa representa una cantidad pesable del material en granos (lo que está ligado al fenotipo), y la cuantificación del ADN en

términos de equivalentes genotípicos está dada por la relación entre dos genes blanco que puede ser realizada sólo si se conoce la estructura molecular exacta de la especie o línea transgénica en cuestión (Taverniers y col, 2001).

Además, la cuantificación del ADN en términos de equivalentes genotipos está influenciada por el número de copias del genoma presente en el material a analizar (Germi y col, 2004; Taverniers y col, 2001; Van den Eede y col, 2002), más aun, según Permingeat y col, (2002), dentro de una misma especie de cultivo, como granos de maíz, una causa de incerteza en la cuantificación de transgen puede ser el número de copias del transgen que posee y que es dependiente del evento. Por ejemplo, hay una copia de promotor 35S en el evento T25 y MON 810, dos copias en el Bt 11 y 2 a 5 copias en el maíz Bt 176.

Por lo anteriormente expuesto, sólo pueden ser analizadas en términos de contenido relativo de OGM, matrices puras (derivadas de un solo organismo) (Wurz y col, 1999). Tal es el caso si se analizan las proporciones relativas de OGM con respecto a ciertos componentes del alimento, por ej. la cantidad de soja RR en el contenido de soja dentro de un alimento. Para esto se debe cuantificar el ADN específico del transgen RR y el ADN específico de soja y hallar la relación (Wurz y col, 1999). No ocurre lo mismo en muestras mixtas y alimentos procesados que contienen una mezcla de diferentes genotipos (Taverniers y col, 2001). En los productos procesados, el ADN GM está contenido en el ADN total del alimento que puede provenir de distintos eventos de un cultivo o de distintos cultivos, con lo que si se refiere la cantidad de ADN GM al ADN total de la matriz, éste estará diluido con respecto a la cantidad referida al ADN del taxón.

En el futuro, como genes múltiples serán introducidos en cultivos, habrá una mayor incerteza asociada a la cuantificación del ADN (Anklam y Neumann, 2002). En el presente, toda esta discusión es en alguna medida teórica, porque los laboratorios de control, primero miden la concentración de ADN total en las muestras, y luego para iguales cantidades de ADN miden el número de copias que se encuentran para una secuencia OGM específica y para una secuencia especie-específica. La razón de ambas, considerando el respectivo número de copias por genoma, da el porcentaje de OGM presente (Van den Eede y col, 2002; ISO 21570, 2002). Esta aproximación solo da datos relativos, de acuerdo a lo anteriormente expuesto. Actualmente no hay una propuesta válida real para sustituir la razón genoma / genoma con alguna otra unidad de medida más manejable (Van den Eede y col, 2002).

En éste trabajo se expresa el porcentaje de transgen como resultado de la interpolación de la intensidad de producto de PCR obtenido con los pares de primers 35S1/35S2, CRY1/CRY2 y GMO7/GMO8 y las curvas de calibración realizada con harinas que contienen distintos porcentajes de OGM.

Para poder utilizar esta forma de cuantificación se debe asumir que:

- el presente método de PCR, que no está validado por estudios intralaboratorio ni interlaboratorio, puede aplicarse a las distintas matrices utilizadas.
- todos los ADN blanco requieren de amplificación para facilitar la detección y cuantificación, en este punto debe asumirse que los amplicones producidos durante la PCR por el transgen específico y el templado planta específico son del mismo tamaño.
- que el ADN extraído no ha sufrido degradación severa en la extracción.
- que se agrega suficiente cantidad de ADN a cada reacción para asegurar que está presente un número apropiado de copias del ADN blanco específico y del especie-específico endógeno.
- que el método de extracción no une ADN, como ocurre en las resinas de extracción (Wiseman, 2002).
- que la intensidad con que se intercala el bromuro de etidio en el amplicón obtenido es igual en el que proviene de las harinas usadas para la curva de calibración que en el que proviene de los alimentos.

Se debe tener en claro que el porcentaje de copias de ADN GM puede no guardar una relación directa con el porcentaje de OGM sobre la masa total del alimento, ya que frecuentemente se desconoce el porcentaje de cada ingrediente del alimento. Además dependerá de si el evento es

homocigota o heterocigota, de cómo es la ploidía, de la repetición de insertos en el evento, la repetición de promotores 35S en un mismo inserto y de si la contaminación por OGM proviene por el polen (n) o por la célula femenina (2n) (Miraglia y col, 2004).

3.8.2 Análisis semicuantitativo de maíz en alimentos

Los resultados presentados en las figuras 52 A, 53 A y 54 se resumen en la tabla 33. Como se muestra en la misma, con el método aplicado en este trabajo no se obtiene ADN amplificable en las muestras sopa Knorr, papas fritas Good Show, papas fritas Lays, pochoclo, bolitas con sabor a chocolate, bocaditos, triangulitos, palitos y aceite de maíz. Estos resultados negativos pueden deberse principalmente a dos factores: baja cantidad de ADN en las muestras o mala calidad del mismo. Para estimar el contenido de ADN se debe tener en cuenta la composición de los alimentos, el porcentaje de sólidos que contienen y el rendimiento del método de extracción. Además se asumió que todo el ADN presente en la muestra proviene del maíz, lo que sobrestima el cálculo, y que, dado que no existen datos de contenido de ADN en maíz, el contenido del maíz es similar al del trigo: 700 mg de ADN /Kg de materia seca (ILSI, 2001).

Tabla 33: Resultados obtenidos en el análisis de maíz en alimentos

Muestra	Resultados de la amplificación	
	µg de ADN de maíz* / g de muestra	Cantidad de promotor CaMV 35S (%)
Sopa Knorr	-	-
Polenta	9,6±4,9	<0,05
Maizena	1,5±4,2	<0,30
Miel	+ *	<2,10
Helado	+ *	4,86 ±0,07
Harina de maíz precocida	8,8±4,3	<0,05
Almidón de maíz	2,7±4,3	1,03 ±0,07
Papas fritas Mediterraneas	8,5±4,1	<0,05
Bocaditos de maíz	-	-
Triángulos de maíz	-	-
Tubitos de maíz	93,0±12,0	<0,05
Palitos de maíz Pehuamar	-	-
Papas fritas Good Show	-	-
Papas fritas Lays	-	-
Pochoclo	-	-
Bolitas con sabor a chocolate	-	-
Aceite de maíz Mazola	-	-
Aceite de maíz Inysa	-	-

*El valor se obtuvo por comparación de la intensidad de los productos de amplificación con los primers IVR de las muestras problemas y una curva de calibración preparada con ADN de maíz.

* Entre 0,1 y 1 no hay diferencia significativa entre las intensidades de producto de reacción por lo que no se puede cuantificar el valor de invertasa de maíz.

En este trabajo, la obtención de ADN se realizó partiendo de 70 mg de alimento. Para este peso, con las suposiciones enumeradas anteriormente, en la muestra de sopa Knorr se obtiene 40 ng de ADN total, y en papas fritas y en bolitas con sabor a chocolate, 50 ng, cantidad que está por encima de la sensibilidad del método utilizado. En el caso del pochoclo, como este producto consiste en maíz inflado, debe asumirse una composición parecida a la del grano de maíz. Debido a esto la cantidad de ADN que se extrae de este alimento debería ser suficiente para la amplificación de invertasa de maíz. Por lo tanto, la ausencia del fragmento de amplificación debe atribuirse a que el procesamiento del alimento afectó la integridad del ADN. La obtención de un ADN amplificable a partir de muestras de

alimentos es dependiente del tipo de matriz y procesamiento como ha sido informado por Terry y col, (2002), Peano y col, (2004), Rogers y col, (1996) y Vanni y col, (2004). En matrices como las harinas, el ADN es fácilmente accesible y, debido a su poco grado de procesamiento, está poco dañado y será fácilmente soluble. Contrariamente, en matrices complejas, procesos como tratamientos térmicos, deshidratación, extrusión, etc., dañan al ADN. En estos casos puntuales, las muestras sufrieron deshidratación en la sopa Knorr, extrusión en las papas fritas y bolitas con sabor a chocolate y tratamiento térmico en pochoclo. Igual situación podría asumirse en matrices de alimentos altamente procesados (como helados, snaks, etc), donde el ADN estaría dañado y en matrices como flanes, donde se produce gelificación durante el procesamiento, la cual hace que el ADN esté ocluido en la matriz del gel por lo que estará poco accesible a los métodos de extracción. Una situación similar se encontraría en preparados cárnicos y embutidos como salchichas.

Debe remarcarse que, en estos tres casos, el contenido de lípidos y/o cacao (7,5 % en sopa, 20,8 % en papas fritas y 4% en bolitas con sabor a chocolate), los cuales afectan a la extracción del ADN y a la obtención del producto en la reacción de PCR (Terry y col, 2002), fueron eliminados eficientemente de las muestras por este método, ya que se obtuvo el producto de amplificación buscado en los tubos controles de inhibición de PCR. Una posible explicación sería que éstos alimentos tienen una composición diferente por la presencia de conservantes, de compuestos que secuestren magnesio o que interaccionen con la Taq polimerasa, o porque están sometidos a distintos tratamientos térmicos, también podría deberse a que el porcentaje de lípidos y cacao es suficientemente pequeño como para inhibir la reacción.

También en el caso de las muestras de bocaditos, triángulos y palitos de maíz, se obtiene 40 ng de ADN, que como se mencionó en el párrafo anterior, sería suficiente para amplificar gen de invertasa. Como en las muestras anteriores, la ausencia de amplificación puede adjudicarse al alto procesamiento de las mismas (extrusión) que degradan al ADN. La diferencia entre estas muestras y las anteriores radica en un bajo contenido de lípidos (4%) que no pudo ser removido eficientemente por el método de purificación utilizado, ya que en el tubo control de inhibidores de PCR no se obtiene el fragmento deseado. Este hecho se explica porque la textura de estos alimentos no permite obtener partículas pequeñas por molienda. Para estas muestras se debería utilizar un método de extracción y purificación más eficiente en la eliminación de inhibidores de reacción de PCR.

Otro factor importante a tenerse en cuenta en el análisis de la ausencia de amplificación en todos los casos mencionados es que la cantidad de ADN extraído de las muestras puede no provenir en su totalidad del maíz, como se asumió para realizar los cálculos.

Muchos trabajos informan que el aceite refinado no tiene ADN o que la cantidad es muy pequeña (Wurz y col, 1998; Pauli y col, 1998; Gryson y col, 2002; Miraglia y col, 2004), a fin de corroborar ésta afirmación se incluyó en el análisis muestras de aceite. Sin embargo, en este caso no se obtiene amplificación de invertasa de maíz debido a que el método de extracción de ADN de Dellaporta con purificación con fenol / cloroformo, no es suficientemente eficiente para remover los inhibidores de esta muestra, como lo demuestra la ausencia de producto de amplificación en el tubo de control de inhibición de PCR. Estos resultados sugieren que para el análisis de aceites refinados se debe partir de una cantidad de muestra mayor para la extracción de ADN y utilizar un método de purificación más riguroso.

De las muestras en las que se amplificó invertasa de maíz, en los casos de la miel y la Maizena la cantidad de ADN no fue suficiente para colocar 200 ng de molde en la reacción para la amplificación de promotor CaMV 35S. Considerando la cantidad de ADN molde utilizada (Tabla 29) las sensibilidades del método para estas muestras son <0,3% y <2,1% respectivamente. A pesar de esta menor sensibilidad, la Maizena no debe ser etiquetada como transgénica, mientras que para la miel, la sensibilidad del método no es lo suficientemente alta como para asegurar que el porcentaje de OGM sea menor del 0,9% requerido. En este último caso se debería partir de una mayor cantidad de miel para la extracción de ADN, con el fin de obtener los 200 ng de ADN de maíz necesarios para tener una sensibilidad de 0,05%.

Según los resultados de la figura 54, no se puede amplificar gen cryIA(b) ni en helado, ni en almidón de maíz, lo que indica que ninguna de estas muestras contiene el gen cryIA(b), y que el ADN que contiene el promotor CaMV 35S debe tener otra procedencia, como podría ser la presencia de otro gen diferente de cryIA(b) o de soja RR, o la contaminación de los alimentos con los mismos.

3.8.3 Análisis semicuantitativo de soja en alimentos

Los resultados presentados en las figuras 55 A, 56 A y 57 A se resumen en la tabla 34. En dicha tabla se observa que no se puede obtener ADN de lectina de soja amplificable en mayonesa, en aceite de soja refinado, ni en jugo Ades.

Tabla 34: Resultados obtenidos en el análisis de soja en los alimentos

Muestra	µg de lectina de soja / g de muestra #	Contenido de promotor CaMV 35S (g CaMV35S/ 100g ADN soja) ♣	Contenido de transgen de soja RR (g EPSPS/ 100g ADN soja) &
Primer precipitado RR	12,6±10,3	> 1 *	> 1 *
Primer precipitado convencional	debajo del límite de detección	< 0,005 ∇	< 0,005 ∇
Segundo precipitado RR	206,0±8,6	> 1 *	> 1 *
Segundo precipitado convencional	131,7±19,8	< 0,005 ∇	< 0,005 ∇
Primers sobrenadante RR	38,3±11,2	> 1 *	> 1 *
Primer sobrenadante convencional	6,0±11,9	< 0,005 ∇	< 0,005 ∇
Aislado convencional	121,6±19,3	< 0,005 ∇	< 0,005 ∇
Aislado RR	154,7±18,5	> 1 *	> 1 *
Harina Bunge Argentina	0,7±14,0	3,32±0,03 ♦	2,29±0,11 ♦
Aislado APS 90NB, PI066182ES Bunge Brasil	21,2±13,8	0,50±0,04	0,47±0,12
Aislado APS 90HI PI058034ES Bunge Brasil	13,4±10,2	0,13±0,05	0,10±0,11
Aceite refinado de soja	debajo del límite de detección	-	-
Harina Bunge Brasil	97,8±10,1	0,90±0,05	< 0,005 ∇
Jugo de soja	debajo del límite de detección	-	-
Helado	109,0±10,2	4,79±0,05 ♦	4,03±0,11 ♦
Mayonesa	debajo del límite de detección	-	-

Obtenido estimando la cantidad de ADN de soja por interpolación en la curva de calibración

♣ Obtenido estimando la cantidad de promotor CaMV 35S por interpolación en la curva de calibración

* Las diluciones empleadas estuvieron por encima del rango de linealidad de la curva de calibración.

♦ Para entrar en la curva de calibración se diluyó la muestra, y el valor mostrado corresponde al contenido de promotor corregido por el factor de dilución.

∇ Las diluciones empleadas estuvieron por debajo del rango de linealidad de la curva de calibración.

& Obtenido estimando la cantidad de transgen de soja RR por interpolación en la curva de calibración

En el caso de la mayonesa, el 37% de los sólidos de esta muestra son lípidos, los cuales en caso de quedar en la muestra interfieren en la reacción de PCR, en concordancia con lo mostrado en la tabla 34. Además, el contenido de ADN de las muestras resulta bajo debido a que la presencia de lípidos afecta a su extracción, y a que el ADN extraído no necesariamente proviene de la soja.

Como en el caso del análisis de maíz en alimentos, en el presente trabajo también se incluyeron muestras de aceite de soja refinado a efectos de verificar la afirmación del código alimentario con respecto a la ausencia de restos sólidos, y en caso de ser su contenido no nulo cuantificar la presencia de GM en ellos. En la figura 55A puede observarse que no se ha logrado amplificar lectina de soja en la muestra (calles 56 y 57) pero si en el tubo control de inhibidores de PCR. Esto sugiere que el método de extracción y purificación de ADN empleados han sido adecuados para eliminar los lípidos de la muestra. Además, la ausencia de producto de amplificación muestra que si el aceite tiene ADN de soja, la cantidad del mismo es menor de 10ng por ul de muestra.

Para analizar el resultado negativo en el jugo Ades se debe determinar el contenido de ADN de las muestras, lo cual conlleva algunas suposiciones y aproximaciones en virtud de la ausencia de datos precisos. En primer lugar, para estimar el contenido de ADN de soja se utilizaron datos de harina de trigo, debido a que como se mencionó anteriormente, no existen datos del mismo en harinas de soja: 700 mg por Kg de materia seca (ILSI, 2001). En una primera aproximación, en donde se supone que todo el contenido de sólido proviene de la soja y proporciona ADN y que los rendimientos de extracción y purificación son del mismo orden que los que se obtienen al utilizar el método de Dellaporta con fenol / cloroformo (capítulo I) a partir de harinas de soja (ambas hipótesis llevarían a una sobrestimación del contenido total de ADN en virtud de que el alimento tiene sólidos provenientes de otras fuentes, y además las matrices de alimentos procesados son más difíciles de extraer que una harina), se obtiene, para muestras de alimento de 70 mg correspondientes al tamaño de las utilizadas en este trabajo, un contenido de ADN total de 0,25 ng. Este valor es muy cercano al límite de sensibilidad del método (0,10 ng), y teniendo en cuenta que está sobrestimado, esto sugiere que no se obtiene suficiente ADN para cuantificar lectina de soja (tabla 34).

Las muestras que demostraron contener lectina de soja amplificable fueron analizadas para dosar semicuantitativamente al promotor CaMV 35S, obteniendo los resultados de la tabla 31. Las empresas más importantes que fabrican y comercializan aislados de soja son Solae de Brasil, Protein Technology y Archer-Daniels, ambas de USA. Este país acepta el cultivo de soja RR, considerándola sustancialmente equivalente a la convencional, por lo que los aislados que comercializa podrían contener transgen de soja RR. Por el contrario, Brasil no acepta el cultivo de soja transgénica, por lo que sería esperable que no se encuentre material GM en los aislados producidos por sus empresas. Debido a esto, en los alimentos que posean en su composición aislados de soja, será posible amplificar material GM, dependiendo del origen del aislado. A pesar de esto se pudo cuantificar promotor CaMV 35S en harina Bunge Brasil y en los aislados APS 90HI, PI058034ES y APS 90NB, PI066182ES, ambos de Bunge Brasil. Esta empresa cultiva la soja que utiliza para la elaboración de harinas, concentrados y aislados proteicos de soja, por lo que nuestros resultados sugieren que los granos de los que se obtuvieron la harina y los aislados estaban contaminados con éstos (ya que el porcentaje de OGM que contienen es bajo), a pesar de que como se mencionó anteriormente el cultivo de estos granos no está aprobado en ese país. Resultados similares han sido informados por Cardelli y col, (2004), que detectan soja transgénica en productos adquiridos en el mercado brasileño.

Argentina es el tercer productor mundial de soja RR, por lo que los alimentos que se distribuyen dentro del país que contienen derivados de soja entre sus ingredientes, tendrán el transgen de soja RR, y lo esperable es que se pueda detectar realizando una PCR de sensibilidad adecuada. Nuestros resultados concuerdan con ésta hipótesis ya que fue posible amplificar el promotor 35S en la harina Bunge de Argentina y en helado de industria Argentina.

La tabla 34 muestra que no se pudo cuantificar el fragmento del transgen EPSPS en la harina de Brasil. Esto sugiere que la presencia del fragmento 35S (tabla 34) puede deberse a contaminación de la harina de soja con maíz transgénico y demuestra que la cuantificación de ADN transgénico no puede hacerse unívocamente por la cuantificación del promotor CaMV 35S y que los resultados positivos deben ser confirmados por cuantificación a través de métodos específicos de transgen (Meyer, 1999; Kuribara y col, 2002; Wiseman, 2002).

Resultados similares han sido informados por Cardelli y col, (2004), que detectaron la presencia del transgen EPSPS en alimentos procesados adquiridos en los supermercados de Brasil y el Sanhoty y col, (2002), en 20% de 40 muestras de alimentos que se venden en los supermercados egipcios, utilizando amplificación por PCR según el manual de alimentos alemán.

La muestra de helado presenta un 4,03% de transgen, lo que está en concordancia con el contenido de promotor 35S (tabla 34). Esto sugiere que todo el promotor CaMV 35S presente en la muestra proviene de soja RR, lo que está confirmado por la no detección del fragmento de δ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (figura 54, calles 17 y 18).

Con respecto a los resultados obtenidos en los aislados preparados en el laboratorio, como se mencionó en el capítulo *Materiales y Métodos*, el proceso de obtención de un aislado proteico implica una extracción en medio alcalino, seguida por una centrifugación y una precipitación en medio ácido. En la extracción de ADN con el método de Dellaporta se utiliza medio alcalino, SDS y temperatura para solubilizar el ADN cromosomal. Si bien el ADN no debería solubilizarse durante la etapa de extracción de las proteínas en medio alcalino en virtud de su poca solubilidad, los resultados obtenidos (Tabla 30) indican que al menos lo hace en forma parcial. Por esta razón el primer precipitado contiene muy poco ADN y el primer sobrenadante una cantidad mayor en comparación con el mencionado precipitado. Por la misma razón, con la precipitación en medio ácido la mayor parte del ADN se encuentra en el segundo precipitado. El mismo puede ser cuantificado en el aislado. Los resultados obtenidos demuestran que el método desarrollado en este trabajo es válido (a pesar del bajo rendimiento del método de extracción) para dosar semicuantitativamente soja RR en aislados de soja. Esto indicaría que el ADN de la harina es al menos parcialmente soluble en medio alcalino y posteriormente precipita en medio ácido.

La tabla 34 muestra que con el método desarrollado en este trabajo se puede dosar semicuantitativamente el promotor CaMV 35S y el transgen EPSPS respectivamente en todas las etapas de obtención de un aislado de soja. Estos resultados sugieren que debe analizarse lectina de soja en los alimentos que tengan en su composición aislados o concentrados de soja.

3.9 CONCLUSIÓN

Se optimizó un método de amplificación por PCR que permite dosar semicuantitativamente 0,1-20 ng de invertasa de maíz y 0,1-50 ng de lectina de soja. También un método para semicuantificar maíz GM en un rango de 0,05-0,5% y soja GM en el rango 0,05-1% de material transgénico, cuando se utilizan 200 ng de ADN molde y una concentración 4mM de cloruro de magnesio. El ADN fue obtenido en todos los casos por el método Dellaporta con purificación con fenol / cloroformo y cuantificado mediante reacciones de PCR para amplificar invertasa de maíz y lectina de soja. Con el fin de saber qué alimentos debían ser etiquetados como transgénicos se realizó un screening basado en el uso de los primers 35S1/35S2 que amplifican el promotor CaMV 35S, y posteriormente reacciones de amplificación específicas para el gen cryIA(b) y el transgen EPSPS. En todos los casos la cuantificación se realizó mediante la interpolación de la intensidad de producto de reacción de PCR en una curva de calibración realizada con harinas de maíz y soja que contenían distintos porcentajes de material OGM. Cabe señalar que con el presente método no se puede diferenciar entre los distintos eventos de maíz aprobados, para ello es necesario utilizar primers específicos para cada evento. Además los resultados obtenidos sugieren que la cuantificación unívoca de transgenes mediante el promotor CaMV 35S no es suficiente, y que debe ser confirmada por la utilización de un primer específico del transgen, y la ausencia de éste último con la presencia del promotor 35S, debe interpretarse como contaminación de la muestra con otro alimento, derivado o cultivo que posea el promotor, o como contaminación con el virus del mosaico del coliflor.

Con el método desarrollado se pudo dosar semicuantitativamente invertasa de maíz en un rango de 0,2-93,0 µg ADN de maíz por g de muestra en polenta, Maizena, miel, helado, harina de maíz precocida, almidón de maíz, papas fritas Mediterráneas y tubitos de maíz, y promotor 35S en el rango 1,03-4,86 % OGM en almidón de maíz y helado respectivamente. Así mismo se pudo dosar semicuantitativamente lectina de soja en un rango de 0,7-206,0 µg de lectina de soja por g de muestra en harina de soja, aislados comerciales de soja, jugo de soja, helado, mayonesa, aceite refinado de soja y en muestras de todos los pasos de obtención de aislados de soja en el laboratorio, y promotor

CaMV 35S en el rango 0,50- 4,79 % OGM en harina de soja, aislados comerciales de soja, helado y muestras de todas las fracciones de obtención de aislados de soja en el laboratorio a partir de granos RR y transgen EPSPS en el rango 0,10-4,03 % OGM en las mismas muestras.

De acuerdo a lo expresado anteriormente, este método fue utilizado para analizar alimentos ricos en proteínas y lípidos, y permitió dosar semicuantitativamente en forma adecuada el contenido de OGM en alimentos ricos en proteínas, en tanto que no fue posible hacerlo en todos aquellos con alto contenido lipídico.

En el caso de aislados de soja obtenidos en el laboratorio a partir de harina de soja 100% RR y 100% convencional, los resultados sugieren que se puede cuantificar ADN OGM y no-OGM respectivamente, en todas las etapas de producción de un aislado de soja. Esto permite determinar que se debe buscar ADN de soja transgénica en los alimentos procesados que contengan aislados de soja en su formulación.

En alimentos con alto contenido lipídico como snacks, mayonesa y aceite refinado, la técnica desarrollada puede aplicarse dependiendo del alimento. En bocaditos, triángulos y palitos de maíz que tienen en promedio 4% de lípidos, éste se debió a la presencia de inhibidores de PCR en la muestra. Por otro lado en papas fritas, el método fue satisfactorio dependiendo de la marca de las mismas, a pesar de que todas contienen un 20% de lípidos. A diferencia de las muestras anteriores, en las papas fritas en que no se pudo obtener el producto de amplificación analizado, no se debió a la presencia de inhibidores (ya que se obtiene amplificación en los tubos controles) sino a que el ADN presente en la muestra no fue suficiente para la sensibilidad del método. Estos resultados sugieren que en los alimentos con alto contenido lipídico tiene gran importancia la presencia en el mismo de otros ingredientes que puedan inhibir la reacción de PCR como conservantes, sustancias que secuestren magnesio o que interaccionen con la Taq polimerasa y el procesamiento al que fue sometido el alimento. Tampoco fue posible amplificar lectina de soja en mayonesa debido a que el método de extracción y purificación de ADN no pudo eliminar los inhibidores de la muestra. En el caso de aceites refinados se tuvieron resultados diferentes dependiendo de si el aceite es de maíz o de soja, en el primer caso no se obtuvo amplificación de invertasa de maíz por presencia de inhibidores y en el segundo por escasa cantidad de ADN en la muestra.

Por lo tanto el método desarrollado en este trabajo podría ser utilizado en otros alimentos ricos en proteínas como galletitas, panes, etc.; pero en mayonesa y algunos snacks y aceites de maíz habría que utilizar un método de extracción de ADN con una purificación más rigurosa, en tanto que en aceites refinados de soja y otros alimentos con bajo contenido de sólidos habría que partir de una muestra de mayor tamaño para obtener suficiente cantidad de ADN como para utilizar éste método de amplificación.

Por último, es de destacarse que el nuevo método presentado en este trabajo, tiene una sensibilidad igual o superior a otros, que utilizan equipamiento más sofisticado y costoso. Además, su sensibilidad es adecuada para ser utilizado como control de las transacciones que se realicen bajo las normas de la UE.

CONCLUSIÓN GENERAL

CONCLUSIÓN GENERAL

En el presente trabajo, se ha desarrollado un método de PCR para determinar OGM en alimentos, que consiste en la amplificación y reamplificación del fragmento de interés.

Para cumplir con este objetivo, en primer lugar se analizaron distintos métodos de extracción y purificación de ADN. Entre ellos, el que proporcionó mayor cantidad y pureza de ADN fue el método de Dellaporta. En el caso de granos y de alimentos con una composición similar, no es necesario utilizar ningún proceso de purificación para amplificar invertasa de maíz y lectina de soja. Por el contrario para alimentos procesados se aplicó purificación con fenol / cloroformo.

Dada la importancia de desarrollar un método que tenga asegurado un comportamiento lineal a fin de ser utilizado para dosar el contenido de OGM en forma semicuantitativa, se optimizaron todos los parámetros inherentes al mismo usando granos 100% OGM. A tal fin, se utilizaron una serie de primers que son específicos de los eventos aprobados en Argentina para la comercialización y están recomendados por varias organizaciones internacionales. También se optimizó la concentración de magnesio que está relacionada con la cantidad de ADN molde presente en la reacción de PCR, la concentración de DMSO y la especificidad de los primers y las temperaturas de apareamiento de cada uno de éstos, factor que hace que no se pueda utilizar sistemas de PCR multiplex.

Para esto se empleó la cantidad estándar utilizada en la literatura de 20 ng de ADN. Además se utilizó un rango de cantidades en la amplificación y reamplificación de PCR y para determinar la sensibilidad del método que fue de 0,1 ng de ADN total.

En los alimentos procesados, por los tratamientos propios de su elaboración (tratamientos térmicos, molienda, extrusión, variación de pH, refinamiento, etc.), por la posible presencia de ADN de otros componentes en caso de tenerlos, y porque el ingrediente a analizar en muchos casos no es 100% GM, el fragmento transgénico se encuentra diluido. Por esta razón 20 ng de ADN resulta insuficiente para alimentos procesados, si se desea obtener una sensibilidad de 0,05% de OGM. Teniendo en cuenta la sensibilidad deseada se debe utilizar al menos 200 ng de ADN molde. Esto hizo que, para que se lleve a cabo la reacción de amplificación de tal forma que la cantidad de producto de amplificación de PCR sea proporcional a la cantidad de fragmento inicial, se debiera optimizar nuevamente los parámetros mencionados para esta nueva condición.

Así, se obtuvo un método de PCR para amplificar y dosar semicuantitativamente ADN de invertasa de maíz y lectina de soja en el rango de 0,1-20 ng y 0,1-50 ng de ADN molde respectivamente. Para el caso de análisis de promotor 35S, gen cryIA(b) de maíz y transgen EPSPS de soja en granos y alimentos procesados, se desarrollaron métodos con una sensibilidad de 0,05% OGM, la que fue suficiente para cumplir con los límites exigidos por las reglamentaciones de países importadores.

El método desarrollado fue aplicado para el dosaje de OGM en alimentos procesados ricos en proteínas y lípidos. El mismo resultó satisfactorio para dosar los amplicones anteriormente mencionados en granos y en alimentos con escaso o moderado grado de procesamiento (como tratamiento mecánico o térmico). También fue aplicado con éxito en alimentos altamente procesados como helado, snacks, etc. Por otro lado, en aceite de soja no ha sido posible obtener amplificación debido a la baja cantidad de ADN en la muestra. En este caso, el método se utilizó para realizar una cota superior del contenido del mismo. Tampoco fue posible obtener producto de amplificación en alimentos que contienen en su composición inhibidores de la PCR como lípidos. Para lograr la remoción de los mismos se debe utilizar un método de extracción de ADN más riguroso, que utilice mayor cantidad de pasos de purificación. Este último aspecto no es una particularidad del método aquí presentado, sino un problema general en todos los sistemas que utilizan reacción de PCR.

Por estas razones el método desarrollado en este trabajo podría ser útil en el análisis de alimentos como galletitas, panes, productos de confitería, *snacks*, alimentos deshidratados y alimentos cárneos. Para alimentos con alto contenido lipídico como mayonesa, hamburguesas etc., será necesario modificar la purificación de ADN.

Finalmente, debe remarcarse que, el conjunto de resultados obtenidos en este trabajo, en particular, en lo concerniente a la comparación con otros trabajos previos y con distintos métodos, muestra que se ha logrado ampliamente uno de los objetivos primarios, que es, obtener un método de dosaje semicuantitativo de OGM en alimentos procesados y no procesados, a través de un procedimiento de muy bajo costo y sin equipamiento sofisticado. A lo largo de estas páginas se ha mostrado que la optimización de los diferentes parámetros del proceso, junto con la utilización de reamplificación en la reacción de PCR, nos brinda un nuevo método cuya sensibilidad de dosaje es en muchos casos superior a la de métodos más costosos y sofisticados en cuanto a equipamiento. Tal cual ha sido presentado, el método es utilizable para analizar lotes de alimentos para exportar a la UE. A pesar de que no ha sido aún validado para las diferentes matrices utilizadas, es de esperarse que en caso de realizarse las validaciones específicas para los distintos sistemas podrá obtenerse una sensibilidad aún mayor.

Por lo mostrado a lo largo de éste trabajo, se puede decir que uno de los factores más importantes a tener en cuenta en desarrollos futuros de sistemas de cuantificación de OGMs en alimentos, debe ser la mejora de métodos de purificación de ADN, que es un factor crítico no solo para los métodos de PCR de punto final sino para los que utilizan PCR en tiempo real.

APÉNDICE

Apéndice

Características de la soja Roundup Ready®

Nombre común y científico: Soja. Glycine max (L)

Denominación del evento: 40-3-2

Nueva cualidad: Tolerancia a glifosato, el ingrediente activo del herbicida Roundup®

Método utilizado para introducir la cualidad: Bombardeo con micropartículas conteniendo ADN sobre el tejido de la planta.

Uso propuesto: Producción de soja para alimentación animal (harina (meal) tostada desgrasada y escamas) y consumo humano (aceite, fracciones proteicas y fibra dietaria).

Descripción de la modificación introducida

El glifosato es el ingrediente activo de Roundup®, que se utiliza como agente controlador de maleza no selectivo. El glifosato actúa como inhibidor competitivo de la enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-5-fosfato sintetasa (EPSPS), una enzima esencial de la ruta bioquímica del shiquimato, involucrada en la producción de aa aromáticos. La inhibición de EPSPS resulta en supresión del crecimiento y muerte de la planta.

La modificación genética consiste, en la introducción del gen que codifica para la enzima 3-enolpiruvil-shiquimato-5-fosfato sintetasa (EPSPS), que es aislado de Agrobacterium tumefaciens cepa CP4, mediante transformación del tejido de la planta utilizando bombardeo con micropartículas conteniendo ADN.

Si bien el vector (plásmido PV-GMGT04) utilizado tiene varios genes, además del gen que codifica para la EPSPS, solo éste gen (con los elementos genéticos que regulan el tránsito al cloroplasto y su expresión en la planta) resulta introducido en la planta.

Los otros elementos genéticos introducidos son:

- La región promotora del transcritpo 35S del virus del mosaico del coliflor (P-CaMVE35S), que contiene una versión duplicada de su enhancer.
- La secuencia que codifica para el péptido que dirige la enzima hacia el cloroplasto (CTP4), proveniente del gen que codifica para la enzima EPSPS de la planta Petunia híbrida.
- Las secuencias de terminación y de poli-adenilación del gen nos que codifica para la enzima nopalina sintetasa del plásmido Yi denominado pTiT37, derivado de Agrobacterium tumefaciens.

Características de maíz Bt 176

Nombre común y científico: Maíz. Zea mays L

Denominación del evento: Bt 176

Nueva cualidad: Resistencia a lepidopteros (Taladro del maíz europeo Ostrinia nubilalis) y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

Método utilizado para introducir la cualidad: Bombardeo con microproyectiles sobre embriones inmaduros de una línea elite de maíz EG00526 (*Zea mays* L).

Uso propuesto: Para cultivo como grano de maíz híbrido.

Descripción de la modificación

Resistencia al taladro del maíz europeo (ECB)

El *Bacillus thuringiensis* ssp *kurstaki* es una bacteria gram positiva formadora de esporas que se encuentra en el suelo. En el estado de espora, produce varios cristales de proteínas insecticidas, que incluyen la proteína δ -endotoxina CRYIA(b), activa contra ciertos insectos lepidópteros como el taladro de maíz europeo.

Se sabe que la proteína es no-tóxica contra humanos, otros vertebrados e insectos beneficiosos (Lee et al, 1995).

Para conferir resistencia al taladro de maíz europeo, se desarrolló un gen CRYIA(b) sintético, derivado de *Bacillus thuringiensis* ssp *kurstaki* cepa HD-1, que codifica para una forma truncada de la δ -endotoxina CRYIA(b) y modificada para mejorar su expresión en maíz.

El gen sintético tiene un 65% de homología a nivel nucleotídico con el gen nativo (Koziel et al, 1993). La proteína CRYIA(b) truncada contiene la región insecticida del CRYIA(b) nativo, Se piensa que la actividad insecticida depende de la unión del fragmento activo a receptores específicos presentes sobre las células epiteliales del intestino medio de insectos susceptibles y de la subsecuente formación de poros que rompen el balance osmótico, resultando en lisis celular, cese de la alimentación y eventual muerte del insecto.

El evento Bt 176 fue obtenido por transformación con dos construcciones de genes CRYIA(b) sintéticos.

Una construcción se encuentra bajo el control de transcripción del promotor de la fosfoenolpiruvatocarboxilasa de maíz (P-PEPC) y se expresa en tejidos verdes.

La segunda construcción está bajo el control del promotor de la proteinkinasa dependiente de calcio de maíz (P-CDPK) y se expresa especialmente en polen.

Ambas construcciones terminan con la secuencia terminadora derivada del virus del mosaico del coliflor (T-CaMV35S) y también incluyen el intrón 9 del gen de la fosfoenolpiruvatocarboxilasa de maíz.

La expresión de la proteína CRYIA(b) en los tejidos verdes intenta suministrar a la planta resistencia a la 1^o generación de larvas de ECB que se alimentan de hojas. La expresión en polen tiene la intención de actuar sobre la 2^o generación de larvas ECB que se alimentan de polen.

La proteína CRYIA(b) de las hojas del evento Bt 176 fue sujeta a estudios de digestibilidad in vitro bajo condiciones gástricas de mamífero simuladas y se mostró que se degradaba como la proteína dietaria convencional.

Tolerancia al herbicida glufocinato de amonio

El gen de tolerancia al glufosinato de amonio (gen bar), derivado de la bacteria del suelo *Streptomyces higroscopicus* codifica para una fosfotricinacetiltransferasa (PAT), está bajo el control transcripcional del promotor CaMV35S constitutivo y es activo en todos los tejidos de plantas excepto en polen.

La fosfotricina, un inhibidor de la glutamino-sintetasa, es la mitad activa del glufosinato de amonio.

La actividad herbicida de fosfinotricina está caracterizada por la inhibición de la glutamino sintetasa resultando en la acumulación de cantidades letales de amonio en la planta.

PAT cataliza la acetilación de fosfinotricina, eliminando su actividad herbicida.

El isómero L de la fosfinotricina (L-PPT) es ampliamente utilizado como agente controlador de maleza de amplio espectro.

L-PPT es el ingrediente activo del herbicida glufosinato de amonio desarrollado por Hoechst y llamado BASTA. Este isómero es un análogo estructural del glutamato, el sustrato de la glutamina sintetasa.

Originariamente, el L-PPT fue aislado de *Streptomyces viridochromogenes*, que utiliza solamente el L-isómero de fosfinotricina.

El glufosinato de amonio sintético es una mezcla equimolar racémica de los isómeros L y D de PPT (D-PPT no tiene actividad herbicida). PAT demostró actuar específicamente sobre fosfinotricina, ya que no se observó actividad sobre otros sustratos de la acetiltransferasa comunes, incluyendo piruvato, colina o serina.

Los estudios de digestibilidad in vitro, bajo condiciones gástricas de mamífero simuladas, conducidas en PAT expresada en *E. Coli*, revelan que ésta proteína se digiere como las proteínas de la dieta convencional.

El gen de tolerancia a glufosinato de amonio fue co-introducido como un marcador de selección que permite la identificación de los embriones transformados sobre medio selectivo y para permitir la localización de los genes introducidos durante el crecimiento (breeding) de la planta.

Como fue reportado (FSANZ, 2000) los datos moleculares indican que la línea Bt 176 contiene una copia del gen bar, bajo regulación transcripcional del promotor 35S y del terminador 35S del virus del Mosaico del coliflor (P-CaMV35S y T-CaMV35S, respectivamente).

Método de desarrollo

El evento Bt 176 fue obtenido por transformación biolística de la línea de maíz endogámica (inbred) CG00526 (*Zea mays* L) con dos plásmidos. Las dos construcciones del gen cryIA(b) sintético fueron co-clonadas en un vector plasmídico (pCIB4431).

Un segundo vector plasmídico (pCIB3064) contiene el gen de tolerancia a herbicida (bar) aislado de *Streptomyces higroscopicus* del suelo. Los vectores fueron introducidos en la línea de maíz CG00526 mediante bombardeo de microproyectiles en embriones inmaduros. El análisis molecular de la planta transformada indica que dos ó más copias de cada construcción plasmídica están integradas en el genoma de la línea de maíz.

Ensayos y análisis por Northern blot indican que el gen de resistencia a ampicilina (bla) regulado por un promotor bacteriano (usado para la selección de los vectores en bacterias backgrounds) no fue expresado ni en hojas ni en polen.

Dos eventos transgénicos de maíz independientes fueron elegidos para un cruzamiento posterior y caracterización: evento 171 y 176 (Kozziel, et al, 1993).

Estudios adicionales de caracterización confirman la presencia en Bt 176 de cryIA(b) (Kozziel et al, 1993), de los genes bar y bla (Privalle, 1994). Los datos como han sido reportados por Food Standards Australia Hew Zcaland (FSANZ, 2000), indican que puede haber tantas como seis copias de cryIA(b) y genes bla en el Bt 176, y dos copias del gen bar (junto con el promotor 35S), como se determina por análisis Southern contra DNA de maíz Bt 176 (Privalle, 1994).

Estabilidad de la inserción de la nueva cualidad

Como se reporta en (FSANZ, 2000), la producción de la proteína CRYIA(b) y PAT en hojas y polen, es estable por cuatro generaciones sucesivas.

Los análisis de segregación indican que la resistencia a ECB y la tolerancia a herbicida se co-segregan como caracteres mendelianos linked.

Un estudio de 3240 plantas indica que solo cinco plantas (0,15%) fueron identificadas como tolerantes al glufosinato de amonio pero susceptible a daño por larva ECB.

Características del maíz MON 810

Nombre común y científico: Maíz. *Zea mays* L

Denominación del evento: MON 810 (trade name Yield Gard®)

Nueva cualidad: Resistencia a lepidópteros (Taladro del maíz Europeo *Ostrinia nubilalis*)

Método utilizado para introducir la cualidad: Biolístico, aceleración de partículas sobre células de plantas.

Uso propuesto: Producción de *Zea mays* para consumo humano (molido seco o húmedo, o aceite de semilla), y alimento para ganado (ensilado o harina)meal

Descripción de la modificación

Resistencia al taladro de maíz europeo (ECB)

El *Bacillus thuringiensis* ssp *kurstaki* es una bacteria gram positiva formadora de esporas que se encuentra en el suelo. En el estado de espora, produce varios cristales de proteínas insecticidas, que incluyen la proteína δ -endotoxina CRYIA(b), activa contra ciertos insectos lepidópteros como el taladro de maíz europeo.

Se sabe que la proteína es no-tóxica contra humanos, otros vertebrados e insectos beneficiosos (Lee et al, 1995).

MON 810 fue transformado con una copia del gen *cryIA(b)* bajo el control del promotor CaMV35S constitutivo; y la secuencia leader del intrón HSP70 de maíz.

La secuencia codificante *cryIA(b)* de *Bacillus thuringiensis* ssp *kurstaki* HD-1 fue modificada para optimizar y maximizar la expresión de la proteína δ -endotoxina CRYIA(b) en plantas.

La proteína es tóxica para larvas de lepidópteros, seguida de cleavage bio-active, corazón resistente a tripsina.

La actividad insecticida depende de la unión del fragmento activo a los receptores específicos presentes en las células epiteliales del intestino medio de los insectos susceptibles y la subsecuente formación de poros que rompen el balance osmótico y eventualmente causan lisis celular.

La secuencia aminoacídica de la toxina expresada en el maíz modificado fue encontrada idéntica a la natural, y equivalente a la proteína producida como biopesticida ampliamente usada por la industria alimentaria orgánica.

Método de desarrollo

MON 810 fue obtenido de maíz genotipo Hi-II, por transformación biolística con una mezcla de DNAs plasmídicos, PV-ZMBK07 y PV-ZMGT10. El plásmido PV-ZMBK07 contiene el gen *cryIA(b)* y el plásmido PV-ZMGT10 contiene los genes CP4 EPSPS y *gox*.

Ambos plásmidos también contienen el gen *npt II* (para selección bacteriana), bajo el control de un promotor bacteriano, y un origen de replicación de un plásmido pUC(ori-pUC) requerido para la replicación de los plásmidos en *E. Coli*. Los dos vectores fueron introducidos por bombardeo con microproyectiles en células de cultivo de plantas.

Los análisis moleculares provistos por los autores indican que solo los elementos de la construcción PV-ZMBK07 fueron integrados en el genoma de la línea MON 810 como un inserto simple, que consiste en el promotor enhanced CaMV35S, la secuencia leader hsp70 y el gen truncado cryIA(b). La señal de terminación 3'nos, presente en el plásmido PV-ZMBK07, fue perdida por una truncación 3' del gen cassette y luego no fue integrada en el genoma hospedador (BATS, 2003)

Estabilidad de la inserción de la nueva cualidad

Los datos provistos por los autores muestran que la segregación y estabilidad eran consistentes con un solo sitio de inserción del gen cryIA(b) en el genoma del MON 810. La estabilidad de la inserción fue demostrada a través de múltiples generaciones de cruzamiento.

La línea de maíz fue cruzada con varios genotipos de maíz por cuatro generaciones con mantención de la protección contra ECB.

MON 810 fue derivado de la tercera generación de backcrossing.

Se demostró la integración estable del inserto único a través de tres generaciones por análisis por Southern Blot.

Características del maíz T 25

Nombre común y científico: Maíz. *Zea mays* L

Denominación del evento: T 25

Nueva cualidad: Tolerancia a herbicidas de la clase de las fosfinotricinas, incluyendo el glufosinato de amonio.

Método utilizado para introducir la cualidad: Transformación de protoplastos de la línea de maíz HE/89 inducida por electroporación.

Uso propuesto: Para utilizar las plantas transformadas como donantes del gen en cruzamientos con líneas comerciales elegidas.

Descripción de la modificación

La expresión del gen pat en la bacteria—— produce una enzima, la fosfinotricina-N-acetil transferasa, que inactiva a los herbicidas de la clase de las fosfinotricinas por introducción de un grupo acetilo en la molécula del herbicida.

Para ser expresado en la planta, el gen pat bacteriano fue modificado en su secuencia de nucleótidos, (ya que el uso de los codones de aa es diferente en plantas y bacterias), pero conservando la secuencia de aa de la proteína producida.

La homología entre ambos genes, el modificado (introducido en la planta) y el bacteriano es del 70%.

Otros elementos genéticos introducidos son:

- las secuencias promotoras y terminadoras del transcripto 35S del virus del mosaico del coliflor para permitir la expresión del gen pat en la planta, éstas secuencias no se traducen y regulan la expresión del gen pat introducido.
- Una porción (estimada en un 75%) del gen de resistencia a ampicilina (amp R), del plásmido pBR322 de la bacteria *E. Coli*, utilizado como marcador de selección en la construcción del plásmido empleado en la transformación. Este gen se encuentra truncado (estimándose que un 25% de la región 5' no se ha integrado a la planta) y bajo el control de su promotor bacteriano, por lo que se espera (tal como fue comprobado) que no se exprese en la planta.

Una copia de éste gen truncado se ha introducido en el OVGM.

Estabilidad de la inserción de la nueva cualidad

Los ensayos del comportamiento agronómico del maíz conteniendo el evento T 25 muestran que las características fenotípicas que se expresan debido a la introducción del gen pat, son establemente heredadas como un locus mendeliano dominante.

El patrón de segregación (tolerancia al herbicida glufosinato de amonio) se determinó en ensayos realizados con no menos de tres generaciones de plantas, las cuales han mostrado alto nivel de tolerancia cuando fueron tratadas con el herbicida glufosinato de amonio.

Características del maíz Bt 11

Nombre común y científico: Maíz. *Zea mays*

Denominación del evento: Bt 11

Nueva cualidad: Resistencia a lepidópteros y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio.

Método utilizado para introducir la cualidad:

Uso propuesto:

Descripción de la modificación

Genes expresados en la planta

- Una versión sintética (para optimizar la expresión en la planta, y tal que no modifica la secuencia de aa de la proteína para la que codifica) y truncada (en la región 3') de una copia del gen cryIA(b) de la bacteria *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* cepa HD-1 que codifica para la proteína insecticida CRYIA(b), tóxica para lepidópteros.
- Gen pat de la bacteria *Streptomyces viridochromogenes* cepa Tu 494, que codifica para la enzima fosfotricinacetil transferasa (prot PAT), que confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio, éste gen también ha sido modificado para optimizar su expresión en la planta, pero sin cambiar la secuencia de aa de la proteína para la que codifica.
- Estos genes se encuentran formando un segmento insertado único que se comporta como un único locus, formado por dos cassettes, uno con cada uno de los genes indicados arriba, la expresión de cada uno de éstos genes está controlada por sendos promotores derivados del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor.

Otros elementos

- El promotor del transcripto 35S del virus del mosaico del coliflor, el evento contiene dos copias de éste promotor, provenientes de diferentes aislados virales, cada una de las cuales controlan la expresión de cada gen cryIA(b) y pat en la planta.
- Secuencias (una diferente para cada uno de los genes cryIA(b) y pat) del primer intrón del gen 1S de la enzima alcohol deshidrogenasa (adh) de maíz (para incrementar la expresión de ambos genes desde el promotor 35S).
- La señal de terminación y poliadenilación del gen nos (que codifica para la enzima nopalina sintasa) de *Agrobacterium tumefaciens*, que determina el fin de la expresión, una para cada uno de los genes cryIA(b) y pat.
- Una secuencia de 1100 bases, del plásmido pUC19 utilizado en la transformación, incluyendo su origen de replicación pero que no incluye regiones codificantes.

Estabilidad de la inserción de la nueva cualidad

Los ensayos del comportamiento agronómico del maíz conteniendo el evento Bt 11 muestran que las características fenotípicas que se expresan debido a la introducción de los genes cryIA(b) y pat se encuentran fuertemente ligadas y son establemente heredadas como un único locus mendeliano.

No se observa segregación de los dos fenotipos (resistencia a insectos lepidópteros y tolerancia al herbicida glifosinato de amonio) en los ensayos realizados con 4300 plantas en tres generaciones.

Características del algodón MON 1445

Nombre común y científico: Algodón. *Gossypium hirsutum* L.

Denominación del evento: MON 1445

Nueva cualidad: Tolerancia al herbicida glifosato.

Método utilizado para introducir la cualidad: Transformación

Uso propuesto:

Descripción de la modificación

Secuencias nucleotídicas insertadas en el genoma de la planta

- El gen de la 5-enolpiruvil-3-fosfoshiquimato sintasa (EPSPS), derivado de la cepa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* CP4 (CP4 EPSPS), que confiere a la planta la tolerancia al herbicida glifosato.
- El gen de la neomicina-fosfo-transferasa II (nptII) del trasposón Tn5 (de *E. Coli*), que permite la selección de las células vegetales transformadas.
- El gen de la aminoglucósido-adenil-transferasa 3'' (aad) del trasposón Tn7 (de *E. Coli*), que se utiliza para la selección del vector de transformación.
- Una porción (aproximadamente de 200 pares de bases) de los 400 pares de bases del origen de replicación (Ori V) del plásmido de *A. tumefaciens* PV-GHGT07, necesario para el mantenimiento del plásmido PV-GHGT07 en *A. tumefaciens*.
- Están insertos en el genoma del MON 1445 una copia de cada uno de los genes CP4 EPSPS y nptII, junto con las secuencias que regulan su expresión.
- Además el gen CP4 EPSPS está precedido de una secuencia (ctp2) que codifica para un péptido para el tránsito de la proteína EPSPS al cloroplasto. El gen aad está presente en el inserto bajo el control de su propio promotor para expresión en bacterias y por lo tanto no contiene los elementos regulatorios normalmente necesarios para su expresión en la planta.
- Si bien el inserto al genoma de la planta contiene dos secuencias nucleotídicas derivadas de marcadores de selección bacterianos, solo uno de ellos (nptII) se expresa en la planta, por eso es utilizado en la selección de las células vegetales transformadas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Ahmed, F. (1995). Application of molecular biology to biomedicine and toxicology. *J. Environ. Sci. Health* 11, 1-51.

Altschul, S., Thomas, L., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.

Anklam, E. y Neumann, D. (2002). Method development in relation to regulatory requirements for detection of GMOs in the food chain. *Journal of AOAC International* 85, 754-756.

Anon (1999a). Genetically modified muddle. *Nature Biotechnology* 17, 311.

Anon. (1999b) Seeds of discontent. *The Economist*, 93-95.

Beachy, R. N. (1997). Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance (PDR) in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 8, 215-220.

Beninati, C; Oggioni, M; Boccanera, M; Spinosa, M; Maggi, T; Conti, S; Magliani, W; De Bernardi, F; Teti, G; Cassone, A; Pozzi, G; Polonelli, L. (2000). Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nature Biotechnology*, 18, 1060-1064.

Brinegar, C; Levee, D. (2004). A Simple Method for Detecting Genetically Modified Maize in Common Food Products. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 32, 35-38.

Borja, M., Rubio, T., Scholthof, H., y Jackson, A. (1999). Restoration of wild-type virus by double recombination of tombusvirus mutants with a host transgene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 53-162.

Boyle, J. y Lew, A. (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet* 11, 8.

Brett, G; Chambers, S; Huang, L; Morgan, M. (1999). Design and development of immunoassays for detection of proteins. *Food Control* 10, 401-406.

Brinch-Pedersen, H. Transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) with increased phytase activity in the grain. 1999. <http://www.agrsci.dk/PHD/pbi/pbrhenrikbrinchpedersen.html/>

Brinegar, C. y Levee, D. (2004). A simple method for detecting genetically modified maize in common food products. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 32, 35-38.

Brookes, M. (1998). Running wild. *New Scientist* October, 38-41.

Brunaud, V., Balzergues, A., Dubrencq, B., Aubourg, S., Samson, F., Chauvin, S., Bechtold, N., Cruaud, C., De Rose, R., Pelletier, G., Lepiniec, L., Caboche, M., y Lecharny, A. (2002). T-DNA integration into the Arabidopsis genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Rep* 12, 1152-1157.

Burachick, M. *Biología Agropecuaria en Argentina. Como enfrentar las nuevas exigencias mundiales*. 2003. SAGPyA:Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. UNEP: United Nations Environment. Programme GEF: Global environment Facility. 2 de Setiembre. Buenos Aires. Argentina.

Cardelli, P., Branquinho, M., Ferreira, R., da Cruz, F., y Gemal, A. (2004). Detection of GMO in food products in Brazil: the INCQS experience. *Food Control*.

Carolyn, D., Hurst, L., Augus, K., y Ian, J. (1999). PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Molecular Breeding* 5, 579-586.

Carrington, J.; Freed, D.; Leinicke, A. (1991). Bipartite signal sequence mediates nuclear translocation of the plant. *Plant Cell* 3, 953-962.

Carter, J. y Langridge, W. (2002). Plant-based vaccines for protection against infectious and autoimmune diseases. *Crit Rev Plant Sci* 21, 93-103.

Carver, J. y Walker, A. (1995). The role of nucleotides in human nutrition. *Nutr. Biochem.* 6, 58-72.

Cavan, G., Biss, P., y Moss, S. (1998). Herbicide resistant and gene flow in wild-oats (*Avena fatua* and *Avena sterilis* ssp. *ludoviciana*). *Annals of Applied Biology* 133, 207-217.

Chakraborty, S. y Datta, A. (2000). Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a non-allergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 3724-3729.

Cheikh, N., Miller, P., y Kishore, G. (2000). Role of biotechnology in crop productivity in a changing environment. In *Climate change and global crop productivity*, eds. Reddy, K. & Hodges, H., New York.

Cho, M., Wong, J., Marc, C., Jiang, W., Leneaux, P., y Buchanam, B. (1999). Overexpression of thioredoxin leads to enhanced activity of starch debranching enzyme pullulanase in barley grain. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96, 14641-14646.

Clover, C. (1999). Stores can't meet demand for organic food. *Electronic Telegraph* January 1322. <http://www.bio.indiana.edu/people/terminator.html>

Coghlan, A., Concar, D., y MacKenzie, D. (1999) Frankenfears. *New Scientist*, 4-5.

Collas, P. y Alestrom, P. (1997). Rapid targeting of plasmid DNA to zebrafish embryo nuclei by the nuclear localization signal of SV40 antigen. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 6, 48-58.

- Comis, D. (2000). Bringing you better beans. Agriculture Research Service Magazine September.
- Concar, D.(1999) Dispatches from the killing fields. New Scientist . 4-5.
- Conway, G. y Toenniessen, G. (1999). Feeding the world in the twenty-first century. Nature 402, 55-58.
- Council Directive 90/220/EEC (April 23, 1990) Off. J. Eur.Comm. L117,15.
- Council Directive 90/220/EEC (1998) Off. J. Eur.Comm. L131, 26.
- Council Directive 2001/18/EC (April 17, 2001) Off. J. Eur.Comm.L106, 1-39.
- Crouch, M. (1998) How the terminator terminates: an explanation for the non-scientist of a remarkable patent for killing second generation seeds of crop plants. <http://www.telegph.co.uk>
- Daniell, H., Streatfield, S., y Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants . Trends in plant science 6, 219-226.
- Dellaporta, S., Wood, J., y Hicks, J. (1983). A plant DNA mini-preparation: versión III. Plant Mol.Biol 41, 19-21.
- Denbow, D., Graban, E., Lacy, G., Komegay, E., Russell, D., y Umbeck, P. (1998). Soybeans transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability for broilers. Poultry Science 77, 878-881.
- Doerfler, W. (1991). Evolutionary Vestiges of foreing DNA inactivation as a host defence mechanism. A proposal. Biol.Chem.
- Doerfler, W. y Schubbert, R. (1997). Fremde DNA im Säugersystem. Deutsches Ärzteblatt.
- Doyle, J. J. y Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19, 11-15.
- Dyson, T. (1999). World food trends and prospects to 2025. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96, 5929-5936.
- Ec Regulation N° 49/2000 (January 10, 2000) Off.J. Eur. Comm. L6, 13-14.
- Ec Regulation N°1830/2003 (July 18, 2003) Off.J. Eur. Comm L268, 24-28.
- Ec Regulation N°1829/2003 (July 18, 2003) Off.J. Eur. Comm L268, 1-23.
- Ehlers, B., Strauch, E., Goltz, M., Kubsch, D., Wagner, H., Maidhof, J., Bendiek, B., Appel, B., y Bunk, H. (1997). Nachweis gentechnischer Veränderungen in Mais mittels PCR. Food Control.

- el Sanhoty, R., Broll, h., Grohmann, L., Linke, B., Spiegelberg, A., Bogl, K., y Zagon, J. (2002). Genetically modified maize and soybean on the Egyptian food market. *Nahrung* 5, 360-363.
- England, L., Holmes, S., y Trevors, J. (1998). Review: Persistence of viruses and DNA in soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*
- Falconi, C. (1999). Agricultural Biotechnology Research Capacity in Four Developing Countries. *Nature biotechnology*. ISNAR Briefing Paper 42.
- FAO (1995). Report of the FAO Technical Consultation on Food Allergies, Rome, Nov. 13-14. Food and Agric. Org. Rome.
- FAO/WHO (2000). Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. WHO, Geneva, Switzerland.
- Fearing, P., Brown, D., Vlachos, D., Meghji, M., y Privalle, L. (1997). Quantitative analysis of CryIA(b) expression in Bt maize plants, tissues and silage and stability of expression over successive generations. *Mol. Breed* 3, 169-176.
- Fennema, O. (1976a). Food Additives. In *Principles of food science: food chemistry*, ed. Dekker, M., pp. 709-773. New York.
- Fennema, O. (1976b). Lipids. In *Principles of food science: food chemistry*, ed. Dekker, M., pp. 157-274. New York.
- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. (1995). Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética, pp. 220. Brasília.
- Fischer, R., Storge, E., Schillberg, S., Christon, P., y Twyman, R. (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 152-158.
- Fischhoff, D., Fuchs, R., Lavrik, P., McPherson, S., y Perlack, F. Insect resistant tomato and potato plants. U.S Patent 5.495.071. 1996.
- Franck-Oberaspach, S. y Keller, B. (1997). Consequences of classical and biotechnological resistance breeding for food toxicology and allergenicity. *Plant Breeding* 116, 1-17.
- Frostegård, A., Courtois, S., Ramisse, V., Clerc, S., Bernillon, D., Le Gall, F., Pascale, J., Nesme, X., y Simonet, P. (1999). Quantification of bias related to the extraction of DNA directly from soils. *Applied and environmental microbiology*. 65, 5409-5420.

Gachet, E., Martin, G., Vigneau, F., y Meyer, G. (1999). Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Science & Technology* 9, 380-388.

Gelvin, S. (2003). Improving plant genetic engineering by manipulating the host. *TRENDS in Biotechnology* 21, 95-98.

Germi, A., Zanetti, A., Salati, C., Rossi, S., Forré, C., Schmid, S., y Marchelli, R. (2004). Development of a Seven-Target Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of Transgenic Soybean and Maize in Feeds and Foods. *J.Agric.Food Chem.* 52, 3275-3280.

GIBCO BRL and LIFE TECHNOLOGIES. Taq DNA Polymerase. [18038-042]. 2000. Instruction Manual.

Giddings, G., Allison, G., Brooks, D., y Carter, A. (2000). Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology* 18, 1151-1155.

Gomord, V. y Faye, L. (2004). Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 171-181.

Gorlick, D. y Mattaj, I. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science*.

Goto, F., Yoshihara, N., Toki, S., y Takaiwa, F. (1999). Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* 17, 282-286.

Grace, E. (1997). "Biotechnology Unzipped: Promises and Realities" Joseph Henry Press, Washington DC.

Gryson, N., Ronsse, F., Messens, K., De Loose, M., Verleyen, T., y Dewettinck, K. (2002). Detection of DNA during the Refining of Soybean Oil. *J.AOAC Int.* 79, 171-174..

Guerinot, M. y Salt, D. (2001). Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. *Plant Physiology* 125, 164-167.

Gutterson, N. y Zhang, J. (2004). Genomics applications to biotech traits: a revolution in progress? *Current Opinion in Plant Biology* 7, 226-230.

Hardon, J. (1997). Ethical issues in plant breeding, biotechnology and conservation. In *Ethics and equity in conservation and use of genetic resources for sustainable food security* pp. 43-50. Foz do Iguacu, Brazil.

Heinemann, J. y Traavik, T. (2004). Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nat Biotechnol* 9, 1105-1109.

- Herbel, W. y Montag, A. (1987). Nucleo-compounds in protein rich food. *Z.Lebensm.Unters.Forsch* 185, 119-122.
- Herbers, K. y Sonnewald, U. (1999). Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 163-168.
- Herman, E., Helm, R., Jung, R., y Kinney, A. (2003). Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiology* 132, 33-46.
- Hertzberg, M. (2001). cDNA microarray analysis of small plant tissue samples using cDNA target amplification protocols. *Plant J.* 25, 585-592.
- Hohn, B., Levy, A., y Puchta, H. (2001). Elimination of selection markers from transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 139-143.
- Hübner, P., Waiblinger, H. U., Pietsch, K., y Brodmann, P. (2001). Validation of PCR methods for quantitation of genetically modified plants in food. *J.AOAC Int.* 84, 1855-1864.
- Hupfer, C; Hotzel,H; Sachse,K; Engel,K. (1998). Detection of the genetic modification in heat-treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Z.lebensm.Unters.Forsch* 206, 203-207.
- Hupfer, C., Hotzel, H., Sachse, K., Moreano, F., y Engel, K. (2000). PCR-based quantitation of genetically modified Bt maize: single-competitive versus dual-competitive approach. *Eur.Food Res.Technol* 212, 95-99.
- Hupfer, C., Mayer, J., Hotzel, H., Sachse, K., y Engel, K. (1999). The effect of ensiling on PCR-based detection of genetically modified Bt maize. *Eur Food Res Technol* 209, 301-304.
- Hurst, C., Knight, A., y Bruce, I. (1999). PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Molecular Breeding* 5, 579-586.
- IFBC (1990). Assuring the safety of foods produced by biotechnology. Food Biotechnology Council.Reg Toxicol.Pharmaco 12.
- IFT. Reporte de expertos del IFT sobre Biotecnología y Alimentos. La Alimentación Latinoamericana 236, 19-33. 2000. Ed. Publitec S.A., Argentina.
- Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., y White, T. (1990). PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications ACADEMIC PRESS, California.
- ISO/FDIS 21569. Foodstuffs- Methos of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Qualitative nucleic acid based methods. ISO 21569. 2002.

ISO/FDIS 21570. Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Quantitative nucleic acid based methods. 2002

ISO/DIS 21568.2. Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Sampling. 2003.

ISO/FDIS 21571. Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products- Nucleic acid extraction. 2004.

Jaccaud, E., Höhne, M., y Meyer, R. (2003). Assessment of Screening Methods for the Identification of Genetically Modified Potatoes in Raw Materials and Finished Products . J.Agric.Food Chem 51, 550-557.

James, D., Schmidt, A., Wall, E., Green, M., y Masri, S. (2003). Reliable detection and identification of genetically modified maize, soybean, and canola by multiplex PCR analysis. J.Agric.Food Chem 51, 5829-5834.

Joersbo, M. y Okkels, F. (1996). A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection. Plant Cell Reports 16, 219-221.

Johnson, D. (1999). The growth of demand will limit output growth for food over the next quarter century. Proc.Natl.Acad.Sci. 96, 5915-5920.

Johnson, L., Myers, D., y Burden, D.(1992). Soy protein's history, prospects in food, feed. Food Tech. 3, 429-444.

Jonas et al (2001). Consideraciones sobre seguridad de ADN de alimento. Aun.Nutr.Metab.

Kay, S; Paoletti,C. (2002). Sampling Strategies for GMO Detection and/or Quantification. EUR 20239 EN. Joint Research Center. European Commission. Ispra. <http://biotech.irc.it/doc/EuroReport>

Kay,S y Van den Eede (2001) The limit of GMO detection. Nature Biotechnology 19, 205-206.

Klein, J., Altenbucher, J., y Mattes, R. (1998). Nucleic acid and protein elimination during sugar manufacturing process of conventional and transgenic sugar beets. J.Biotechnol 60, 145-153.

Kling, J. (1996). Could transgenic supercrops one day breed superweeds? Science 274, 180-181.

Kok, E., Aarts, H., Van Hoef, A., y Kuiper, H. (2002). DNA methods: critical review of innovative approaches. Journal of AOAC International 85, 797-800.

Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N., y Kumashiro, T. (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* 10, 165-174.

Kooter, J. (1999). Listening to the silent genes: transgene silencing, gene regulation and pathogen control. *Trends in plant science* 4, 340-347.

Kridl, J. y Shewmaker, C. (1996). Food for thought: improvement of food quality and composition through genetic engineering. *Ann New York Acad Sci* 792, 1-2.

Kumar, S. y Fladung, M. (2001). Controlling transgen integration in plants. *Trends in plant science* 6, 155-159.

Kuribara, H., Shindo, Y., Matsuoka, T., Takubo, K., Futo, S., Aoki, N., Hirao, N., Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M., y Hino, A. (2002). Novel reference molecules for quantitation of genetically modified maize and soybean. *Food composition and additives* 85, 1077-1089.

Lassek, E. y Montag, A. (1990). Nucleic-acid components in carbohydrate-rich food. *Z.Lebensm.Unters.Forsch* 190, 17-21.

Levidow, L. y Carr, S. (1997). How biotechnology regulation sets a risk/ethics boundary. *Agriculture and Human Values* 14, 29-43.

Lipp, M., Bluth, A., Eyquem, F., Kruse, L., Schimmel, H., Van den Eede, G., y Anklam, E. (2001). Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research Technology* 212, 497-504.

Lipp, M.; Shillito, R.; Giroux, R.; Spiegelhalter, F.; Charlton, S.; Pinero, D.; Seng, P.; (2005) Polymerase Chain Reaction Technology as Analytical Tool in Agricultural Biotechnology. *Journal of AOAC International*, 88, 136-155.

Matsuoka, T.; Kuribara, H.; Takubo, K.; Akiyama, H.; Miura, H.; Goda, Y.; Kusakabe, Y.; Isshiki, K.; Masatake, T.; Hino, A. (2002). Detection of Recombinant DNA Segments Introduced to Genetically Modified Maize (*Zea mays*). *J.Agric.Food.Chem.* 50, 2100-2109.

Mc Mindes, M. (1991). Applications of isolated soy protein in low-fat meat products. *Food Technol.* 61-64.

McBride, J. (2000). Tomatoes that age gracefully. *Agriculture Research Magazine* December.

Metcalfe, D., Astwood, J., Townsend, R., Sampson, H., Taylor, S., y Fuchs, R. (1996). Assessment of the allergenic potential of food derived from genetically engineered crop plants. *Crit.Rev.Food Sci.Nutr* 36, S165-S186.

Meyer, R. (1999). Development and application of DNA analytical methods for the detection of GMOs in food. *Food Control* 10, 391-399.

Meyer, R. y Jaccaud, E. (1997). Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of a PCR assay for the specific detection of Glyphosate-Tolerant Soybeans.

Meyer, R., Chardonnens, F., Hubner, P., y Luthy, J. (1996). Polimerase chain reaction (PCR) in the quality and safety assurance of food: detection of soya in processed meat products. *Z. Lebensm Unter Forsch* 203, 339-344.

Meza, T., Stangeland, B., Mercy, I., Skam, M., Nymoen, D., Berg, A., Butenko, M., Hakelien, A., Haslekas, C., Meza-Zepeda, L., y Aalen, R. (2002). Analyses of single-copy Arabidopsis T-DNA-transformed lines show that the presence of vector backbone sequences, short inverted repeats and DNA methylation is not sufficient or necessary for the induction of transgene silencing. *Nucleic Acids Res* 20, 4556-4566.

Miele, L. (1997). Plants as bioreactors for biopharmaceutical: regulatory considerations. *Trends in Biotechnology*. 15, 45-50.

Miller, D., Bryant, J., Madsen, E., y Ghiorse, W. (1999). Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4715-4724.

Miraglia, M., Berdal, K., Brera, C., Corbisier, P., Holst-Jensen, A., Kok, E., Marvin, H., Schimmel, H., Rentsch, J., nan Rie, J., y Zagon, J. (2004). Detection and traceability of genetically modified organisms in the food production chain. *Food and Chemical Toxicology* 42, 1157-1180.

Murphy, D. (1999). Production of novel oils in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 175-1780.

Mysore, K. y al (2000). An Arabidopsis histone H2A mutant is deficient in Agrobacterium T-DNA integration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97, 948-953.

Ort, D. (1997). Pros and cons of foering genes in crops. *Nature* 385-390.

Ortiz, R. (1998). Critical role of plant biotechnology for the genetic improvement of food crops: perspectives for the next millenium. *Electronic Journal of Biotechnology* 1. <http://www.ejb.org>

OTA 1984 Commercial biotechnology: An international analysis OTA-BA 218,p3 U.S. Congress Office of Technology Assessmellt. U.S. Govt, Printing Office, Washington D.C. 1984.

Paul, J. (1992). Intergenic Natural Plasmid Transformation between Escherichia coli and a Marine Vibrio Species. In *Genetic Transfers and Environment*, ed. M.J.Gauthier, pp. 61-67. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

Pauli, U., Liniger, M., y Zimmermann, A. (1998). Detection of DNA in soybean oil. *Z Lebensm Unters Forsch A* 207, 264-267.

Peano, C., Samson, C., Palmieri, L., Gulli, M., y Mamioli, N. (2004). Qualitative and Quantitative Evaluation of the Genomic DNA Extracted from GMO and Non-GMO Foodstuffs with Four Different Extraction Methods. *Journal of agricultural and food chemistry* 52, 6962-6968.

Permingeat, H., Reggiardo, M., y Vallejos, R. (2002). Detection and Quantification of Transgenes in Grains by Multiplex and Real-Time PCR. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 4431-4436.

Petrucelli, S. (1993). Modificaciones estructurales de aislados proteicos de soja producidas por tratamientos reductores y térmicos y su relación con propiedades funcionales. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata (UNLP).

Pew.(2001). Initiative on Food and Biotechnology. Harvest on the horizon: future uses of agricultural biotechnology

Pietsch, K., Waiblinger, H., Brodmann, P., y Wurz, A. (1997). Screeningverfahren zur Identifizierung "gentechnisch veränderter" pflanzlicher Lebensmittel. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 93, 35-38.

Pimentel Gomez, F. (1978). *Curso de Estadística Experimental.*, pp. 20. Editorial Hemisferio Sur S.A..

Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target hosts; environmental impacts and ethics. *Journal of Agriculture and Environmental Ethics* 8, 17-29.

Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M., Ratner, L., Lane, C., Moore, M., Blobel, G., y Bukrinsky, M. (1998). Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 preintegration complex. *EMBO J.* 17, 909-917.

Potrykus, I. V Meeting of the Latin American/Caribbean Plant Biotechnology Network. REDBIO. 21-25 June 2004, Santo Domingo, Dominican Republic

Protein Technology Inc. 2001. <http://www.protein.com/>

Puchta, H. (2000). Removing selectable marker genes: taking the shortcut. *Trends in plant science* 5, 273-274.

Querci, M. y Mazzara, M. Characteristics of Roundup Ready Soybean, MoN810, and Bt-176 Maize. The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms. 2002. JRC.

Reeves, R. y Baker, A. (2000). Phytoremediation of Toxic Metals. In Raskin I and ED Ensley. John Wiley and Sons, New Yor, NY 193-229.

EC Regulation N° 49/2000 (January 10, 2000) Off. J. Eur. Comm. L6, 13-14.

EC Regulation N° 1830/2003/EC (July, 2003) Off. J. Eur. Comm.

EC Regulation N° 1829/2003/EC (July, 2003) Off. J. Eur. Comm.

Remund, K., Dixon, D., Wright, D., y Holden, L. (2001). Statistical considerations in seed purity testing for transgenic traits. *Seed Science Research* 11, 101-119.

Robinson, C. (2001). GM-derived foods: the second generation. In *Genetic modification technology and food. Consumer health and safety*, ed. Hammes, W., Belgium 6, 135-137.

Robinson, J. (1999). Ethics and transgenic crops: a review. *Electronic Journal of Biotechnology* 2, 71-78.

Rogers, H., Burns, N., y Parkers, H. (1996). Comparison of small-Scale Methods for the Rapid Extraction of DNA Suitable for PCR Analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 14, 170-183.

Romano, E. (1998). Extração de DNA de Tecidos Vegetais. In *Manual de Transformação Genética de Plantas.*, ed. Brasileiro ACM, C. V., Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, Brasília.

Royal Society. Genetically modified plants for food use. 1998. www.royalsoc.ac.uk/files/statfiles/document-56.pdf.

Rubio, T., Borja, M., Scholthof, H., y Jackson, A. (1999). Recombination with host transgenes and effects on virus evolution: an overview and opinion. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 87-92.

Salati, L., Gross, C., Henderson, L., y Saviano, L. (1984). Absorption and metabolism of adenine, adenosine-5'-mono-phosphate, adenosine and hypoxanthine by the isolated vascularly perfused rat small intestine. *J.Nutr.* 114, 753-760.

Salyers, A. Genetically engineered foods: Safety issues associated with antibiotic resistance genes. *Reservoirs of Antibiotic Resistance Network.* 2000.

Sambrook, J., Fritsch, E., y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2 nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Col Spring Harbor, New York.

Saphire, A., Guan, T., Schirmer, E., Nemerow, G., y Gerace, L. (2000). Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70. *J.Biol.Chem.* 275, 4298-4304.

Sauders, G. y Parkers, H. *Analytical Molecular Biology: Quality and Validation*, Royal Society of Chemistry, Cambridge,UK. 1999.

Schubbert, R., Lettmann, C., y Doerfler, W. (1994). Ingested foreign phage M13 DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol.Gen.Genet.* 241, 495-504.

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

Scipioni, A., Saccarola, G., Arena, F., y Schiavon, A. (2004). Strategies to assure the absence of GMO in food products application process in a confectionery firm. *Food Control*.

Serageldin I. (1997). Ethics and equity in conservation and use of genetic resources for sustainable food security. *Proceedings of a workshop to develop guidelines for the CGIAR*,21-25. Foz do Iguacu, Brasil, IPGRI.

Shintani, D. y Dellapenna, D. (1998). Elevating the vitamin E of plants through metabolic engineering. *Science* 282, 2098-2100.

Sinclair, T. y Purcell, L. S. C. (2004). Crop transformation and the challenge to increase yield potential. *Trends in plant science* 9, 70-76.

Somerville, C. y Bonetta, D. (2001). Plants as factories for technical materials. *Plant Physiology* 125, 168-171.

Spencer, J., Allee, G., y Sauber, T. (2000). Phosphorus bioavailability and digestibility of normal and genetically modified low-phytate corn for pigs. *Journal of Animal Science* 78, 675-681.

St, S. (2001). *Stability of nucleic acids in Safety Considerations of DNA in Foods.*, ed. ILSI Press, Washington DC.

Stave, J. (1999). Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO-future needs. *Food Control* 10, 367-374.

Stoger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Keen, D., Perrin, Y., Christon, P., y Fischer, R. (2000). Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology* 42, 583-590.

Stratagene. Pfu DNA Polymerase. Instruction Manual. 1997.

- Studer, E., Dahinden, I., Lüthy, J., y Hübner, P. (1997). Nachweis des gentechnisch veränderten "Maximizer"-Mais mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). *Mitteilungen aus dem Gebiet der Lebensmittel und Hygiene* 88, 515-524.
- Taverniers, I., Windels, P., Van Bockstaele, E., y De Loose, M. (2001). Use of cloned DNA for event-specific quantitation of genetically modified organisms in pure and mixed food products. *Eur Food Res Technol* 3, 417-424.
- Taylor, S. (1997). Food from genetically modified organisms and potential for food allergy. *Environ.Toxicol.Pharmacol.* 4, 121-126.
- Terry, C., Harris, N., y Parkes, H. (2002). Detection of genetically modified crops and their derivatives: Critical steps in sample preparation and extraction. *Journal of AOAC International* 85, 768-774.
- Thein, S. y Wallace, R. (1986). The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. In *Human genetic diseases: a practical approach*, ed. Davis, K., pp. 33-50. IRL Press, Hemdon, Virginia.
- Thelen, J., Mekhedov, S., y Ohlrogge, J. (2001). Brassicaceae express multiple isoforms of biotin carboxil carrier protein in a tissue-specific manner. *Plant Physiol* 4, 2016-2018.
- Thompson, L. (2000). Are Bioengineering Foods Safe?. U.S. Food Drug Administration, FDA Consume.
- Tozzini, A., Martinez, M., Lucca, M., Vazquez Rovere, C., Distefano, A., del Vas, M., y Hoop, H. (2000). Semi-quantitative detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promotor amplification. *Electronic Journal of Biotechnology* 3, 1-5.
- Tozzini, A. (2004). Cap 4: Detección de OGM en la cadena alimentaria. Parte IX Bioseguridad y regulación de organismos vegetales genéticamente modificados (OVGM). *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Dra Echenique, V; Dra Rubinstein, C; Ing Agr. Mroginski, L. Consejo Arg. Para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. INTA.
- Twyman, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P., y Fischer, R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *TRENDS in Biotechnology* 21, 670-678.
- Ursin, V. (2000). Genetic modification of oils for improved health benefits. *Dietary Fatty Acids and Cardiovascular Health*. American Heart Association June, 5-6.
- Vaitiligom, M., Pijnenburg, H. G. F., y Brignon, P. (1999). Real-Time Quantitative PCR Detection of Genetically Modified Maximizer Maize and Roundup Ready Soybean in some Representative Foods. *J.Agric.Food Chem* 47, 5261-5266.

Van den Eede, G., Kay, S., Anklam, E., y Schimmel, H. (2002). Analytical Challenge: Bridging the gap from regulation to enforcement. *Journal of AOAC International* 85, 757-761.

van Duijn (1999). Detection methods for genetically modified crops. *Food Control* 10, 375-378.

van Duijn, G., van Biert, R., Bleeker-Marcelis, H., van Boeijen, I., Adams, A., Jhakrie, S., y Hensing, M. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods by protein- and DNA-based techniques: Bridging the methods. *Journal of AOAC International* 85, 787-791.

Van Hoef, A., Kok, E., Bouw, E., Kuiper, H., y Keijer, J. (1998). Development and application of a selective detection method for genetically modified soy and soy-derived products. *Food additives and Contaminants* 15, 767-774.

Vanni, A., Anfossi, L., Giovannoli, C., Oddenino, L., y Giraudi, G. (2004). Evaluation of purification procedures of DNA from maize-meal samples by exploiting different analytical techniques for the assessment of DNA quality. *Ann Chim* 94, 269-280.

Visser, A. y Thomas, A. Soya protein products-their processing, functionality and application aspects. *Food Rev.Int.* 3, 1-32. 1987.

Vodkin, L., Rhodes, P., y Goldberg, R. (1983). cA Lectin Gene Insertion Has the Structural Features of a Transposable Element. *Cell* 34, 1023-1031.

Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J., y Kroath, H. (1999). Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerasa chain reaction. *J.Agric.Food Chem* 47, 5038-5043.

Walmsley, A. y Arntzen, C. (2003). Plant cell factories and mucosal vaccines. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 145-150.

Ward, L. y Hall, S. (1999). GM foods of school menus. *Guardian Weekly March*, 8.

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., y Meyer, W. (1995). DNA fingerprinting in plants and fungi.

WHO (1993). Health aspects of marker genes in genetically modified plants. Report of WHO Workshop. WHO/FNU/FOS/ 93.6. World Health Org., Geneva.

Wiley, J. y Sons (2000). Proteins. In *Current Protocols in Protein Science*.

Wiseman, G. (2002). State of the art and limitations of quantitative polymerasa chain reaction. *Journal of AOAC International* 85, 792-796.

Wood, M. New safeguards against glycoalkaloids. *Agriculture Research Service Magazine* . 1997.

- Wurz, A., Bluth, A., Zeltz, P., Pfeifer, C., y Willmund, R. (1999). Quantitative analysis of genetically modified organisms (GMO) in processed food by PCR-based methods. *Food Control* 10, 385-389.
- Wurz, A., Rüggeberg, H., Brodmann, P., Waiblinger, H., y Pietsch, K. (1998). DNA-Extraktionsmethode für den Nachweis gentechnisch veränderter Soja in Sojalecithin. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 94, 159-161.
- Ye, X., Al-Balili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., y Potrykus (2000). Engineering provitamin A (b-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287, 303-305.
- Zaid, A., Hughes, H., Porceddu, E., y Nicholas, F. (1999). Glossary of biotechnology and genetic engineering. In *FAO Research and Technology paper*, ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.
- Zeimienowicz, A., Gorlich, D., Lanka, E., Hohn, B., y Rossi, L. (1999). Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96, 3729-3733.
- Zimmermann, A., Wolfram, H., Liniger, M., Luthy, J., y Pauli, U. (1998). A sensitive detection method for genetically modified MaisGard™ corn using a nested PCR system. *Wiss.u.Technol* 31, 664-667.
- Zitnak, A. y Johnston, G. (1970). Glycoalkaloid content of B5141-6 potatoes. *Am.Potato J.* 47, 256-260.
- Zubko, E. (2000). Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. *Nat.Biotechnol.* 18, 442-445.
- Zuo, J., Niu, Q., Ikeda, Y., y Chua, N. (2002). Marker-free transformation: increasing transformation frequency by the use of regeneration-promoting genes. *Current Opinion in Biotechnology* 13, 173-180.