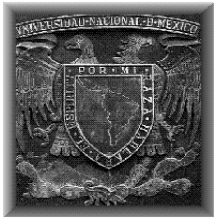


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**Detección de secuencias transgénicas en maíz y productos derivados no
industrializados por la técnica de PCR**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A:
ROCIO MADRID AYALA



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

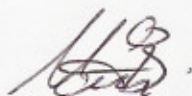
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Amanda Gálvez Mariscal
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
1er. Suplente	Dr. Javier Plasencia De La Parra
2o. Suplente	Dr. Francisco Ruiz Teran

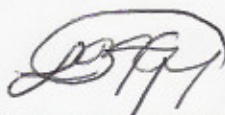
Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 312, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM



Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Asesora



Rocío Madrid Ayala

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a todas las personas que ayudaron a que mi trabajo en esta Tesis saliera adelante y muy especialmente:

Al Dr. Javier Plasencia por todas las facilidades prestadas para el desarrollo de esta Tesis y por las secuencias facilitadas de oligos RPA.

A la Dra. Maricarmen Quirasco por todas sus enseñanzas, su paciencia, experiencia y apoyo para el término de esta Tesis.

A la Dra. Amanda Gálvez por todos sus comentarios, observaciones, enseñanzas y oportunidades que me ha brindado para desarrollarme profesionalmente.

Al Dr. Marcelo Signorini por su amistad, apoyo, comprensión y preocupación en aquellas situaciones dentro de mi vida profesional; por enseñarme a que todo se tiene que fundamentar científica y técnicamente.

A la Dra. Amelia Farrés, Dra. Carmen Wachter, Dra. Adriana Llorente, M. en C. Sandra Pérez, M. en C. Idalia Flores y a mis compañeros del Lab. 312 por sus observaciones y apoyo prestados para la realización de la Tesis.

A la Pas. M. en C. Alejandra Barrios por su amistad, sus consejos siempre tan certeros y por su experiencia en el ámbito de los organismos genéticamente modificados.

Al Arq. Octavio Vazquez por despejarme mis dudas y colaborar en el diseño de la Tesis.

Esta tesis se pudo desarrollar gracias a la beca y al financiamiento otorgadas por el proyecto DGAPA-PAPIIT IN218101.

DEDICATORIAS

Esta tesis va dedicada muy especialmente a todas aquellas personas que han contribuido a mi desarrollo tanto personal como profesional, que a pesar de no estar involucradas al 100% en este proyecto, fueron inspiración para que lo concluyera:

A mi abuelo, Salvador Eugenio Ayala Manilla *q.e.p.d*, por enseñarme desde siempre a amar la vida, a apasionarme de lo que emprenda, a ser constante y honesta con todo lo que haga y, a sentirme siempre muy orgullosa de todo lo que logre.

A mis papás, Víctor Manuel y Marta, por su amor, respeto, apoyo, comprensión y nobleza a pesar de que a veces no entendieran las razones para tantas cosas que he hecho y por complacerme, en cierta forma, todos mis caprichos. Los quiero muchísimo y adoro.

A mis hermanos, Víctor Manuel y Rafael, por ser mi motor a seguir adelante, por enseñarme a defender y a vivir en un mundo de hombres, por apoyarme en los momentos difíciles y a no dejarme vencer por las cosas.

A mis perros, Tobías y Sancho, por aguantar las desveladas junto a mí y ser testigos fieles de mi vida y mi aprendizaje en la UNAM. Por ser cómplices de todas mis locuras y sueños.

A mis amigos, Celina, Marina, Raúl, Abraham, Bere, Alejandro, Gaby, Sonia y Naomi por todo su apoyo, por hacer los momentos difíciles pasables y hacer mi vida en la UNAM lo más divertida y amena posible. Sin ustedes, seguramente no hubiera acabado donde estoy ahora.

A mis amigos, Marcelo, Sandra, Carlos y Mauricio por enseñarme nuevas cosas en el día a día y demostrarme que existen personas como yo, que luchan a pesar de las adversidades y que a veces hay que tomar un descanso para seguir adelante.

A todas las personas que en algún momento de mi carrera contribuyeron a que yo siguiera adelante, especialmente a mis amigos de Cadbury Adams, que me dieron otra visión de lo que se puede llegar a ser, siendo Química de Alimentos.

Y finalmente y no menos importante, a ti, MI CIELO, que a pesar de llegar al final de este camino en mi vida, fuiste él que más me impulsó a concluir este proyecto y por quien me siento muy orgullosa de vivirlo. Tú, con todo tu amor, me has dado grandes lecciones de vida y me has ayudado a crecer y a madurar aspectos que había olvidado. Hasta en el último momento has estado aquí y quiero que esto sea tuyo también, por aquel pequeñito Químico que llevas dentro. Te amo.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
ECB	Gusano barrenador europeo
ELISA	Ensayo enzimático ligado a un inmunoadsorbente
OGM	Organismo genéticamente modificado
OVM	Organismo vivo modificado
P – 35S	Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor
RPA – 1	Proteína de replicación A – 1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
T – NOS	Terminador de nopalina sintasa
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
TM	Tonelada métrica
Ha	Hectárea

CONTENIDO

ABREVIATURAS	3
1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	6
3. ANTECEDENTES	9
3.1 Biotecnología en plantas e ingeniería genética	9
3.2 Maíz, productos tradicionales y eventos modificados genéticamente	13
3.3 Perspectivas del maíz transgénico en México	27
3.4 Maíz transgénico evaluado en México	28
3.5 Monitoreo de OGMs	40
4. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	48
5. OBJETIVOS	50
5.1 Objetivo general	50
5.2 Objetivos particulares	50
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	51
7. MATERIALES Y MÉTODOS	52
7.1 Muestras y Controles	52
7.2 Preparación de las Muestras y Controles	55
7.3 Extracción de ADN	55
7.4 Cuantificación de ADN	55
7.5 Diseño de cebadores (<i>primers</i>)	56

7.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	59
7.7 Purificación de los Productos de PCR	67
7.8 Reacción de restricción	67
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
8.1 Extracción de ADN	70
8.2 Amplificación para Gen Endógeno RPA – 1	72
8.3 Amplificación, Purificación y Análisis de Restricción de P – 35S	78
8.4 Amplificación y Análisis de Restricción de T – NOS	89
8.5 Amplificación para identificar el evento CBH351	93
9. RESUMEN DE RESULTADOS	101
10. CONCLUSIONES	103
11. PERSPECTIVAS	105
12. BIBLIOGRAFÍA	106
APÉNDICE	112

1. RESUMEN

México enfrenta normatividad escasa en materia de manejo, utilización y comercialización de organismos genéticamente modificados (OGMs) y posee poca experiencia en el monitoreo de maíz genéticamente modificado o alguna otra planta transgénica, lo que genera la necesidad de implantar técnicas modernas de análisis, por lo que debe contar con las herramientas analíticas y con los recursos humanos capacitados para la detección de material transgénico en materias primas y productos que pudieran contenerlos. Además, el maíz es la base de la alimentación mexicana; por ello, en el presente trabajo se aplicó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de secuencias transgénicas en diferentes productos alimenticios, no industrializados, elaborados a base de maíz.

Como primer paso se extrajo ADN de maíz transgénico (Bt11, Bt176 y MON810) y de maíz no transgénico (maíz criollo chalqueño y maíz blanco) y se comprobó la especificidad de los cebadores diseñados para la detección del terminador NOS (T – NOS) y para el transgen *cry9C* del evento de maíz CBH351 Starlink™ (el evento CBH351 Starlink™ se escogió por ser el único maíz transgénico no aprobado para consumo humano y estar disponible en el laboratorio), con la obtención de amplicones específicos (159 pb para el T – NOS y 100 pb para el transgen *cry9C*) aplicando la técnica de PCR. A su vez, se corroboró el diseño de los cebadores para la detección del T – NOS con la reacción de restricción en muestras con

Starlink™ usando la enzima *HinfI*, obteniéndose los dos fragmentos esperados de 108 pb y 51 pb.

Posteriormente, se analizaron diversas muestras de maíz y alimentos adquiridos en mercados municipales y “tianguis” del estado de Oaxaca, detectándose la presencia de la secuencia transgénica del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (P – 35S, diseñado en un estudio previo a esta Tesis) en el 76.6% de ellas. Para corroborar la presencia del fragmento de 151 pb perteneciente al P – 35S se escogieron 14 muestras para realizarles un análisis de restricción con la enzima *BssSI*, obteniéndose los fragmentos esperados de 89 pb y 62 pb para el P – 35S. Para la secuencia transgénica T – NOS no hubo amplificación en ninguna muestra por lo que se pudo inferir que ninguna de ellas era el evento CBH351 Starlink™, evento con ambos, P – 35S y T – NOS dentro de su construcción.

La integridad del ADN fue determinante para obtener amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa.

2. INTRODUCCIÓN

La biotecnología representa una herramienta muy valiosa para el desarrollo de organismos con capacidades mejoradas, pero para que éstos sean utilizados a nivel comercial y, sobre todo, sean liberados al ambiente, se debe llevar a cabo una evaluación de riesgos, donde se analicen los posibles impactos en la salud pública, el entorno ecológico e incluso impactos socioeconómicos en la población (Quirasco y Gálvez, 2002). Este es el caso de las plantas modificadas genéticamente, como el maíz transgénico.

Como centro de origen y diversificación del maíz, México debe contar con las herramientas y con los recursos humanos capacitados para la detección y caracterización de maíz transgénico, ya que la posibilidad de flujo génico entre las especies criollas de maíz y los nuevos eventos de maíz transgénico es real, lo que podría actuar en detrimento de los recursos genéticos y la diversidad biológica de nuestro país. La introgresión de transgenes en maíz criollo ya ha sido analizada; el Dr. Ignacio Chapela de la Universidad de California en Berkeley publicó, en la revista *Nature* en 2001, un estudio que realizó en el estado de Oaxaca donde encontró la presencia del promotor CaMV35S (P – 35S) en muestras de semilla de algunas comunidades. Sus resultados han sido muy cuestionados pero alertaron sobre la posible presencia de maíz transgénico en el territorio nacional.

Si así fuera, habría implicaciones socioeconómicas, por el hecho de que la utilización de maíz transgénico podría afectar las costumbres agronómicas de la

mayoría de los campesinos mexicanos. Ellos no acostumbran comprar semilla para sembrar en cada temporada, sino que utilizan grano de la temporada anterior para sembrar en la siguiente. Las semillas provenientes de algunos cultivos modificados genéticamente son estériles, o pierden vigor al resembrarse, lo que obligaría al agricultor a comprar semilla cada temporada y el campesino se vería afectado económicamente (Quirasco y Gálvez, 2002).

Por otra parte, en México existe normatividad escasa acerca del manejo, utilización y comercialización de organismos genéticamente modificados y falta de implantación de las técnicas de análisis para su detección y monitoreo.

En lo que respecta a la normatividad, el Honorable Congreso de la Unión aprobó recientemente la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, que entró en vigor a partir del mes de Mayo del 2005, entre otras cosas regular la entrada y comercialización en México de maíz transgénico y organismos genéticamente modificados, donde se subraya la necesidad de vigilar sanitaria y epidemiológicamente a los OGMs, los productos que los contengan y los productos derivados estableciendo normas para el manejo de organismos manipulados genéticamente (LBOGM, 2005).

Respecto a la capacidad de detección de OGMs en nuestro país, actualmente existe la necesidad de implantar técnicas modernas de análisis en el sector público y privado. México, como país signatario del Protocolo de Cartagena de Bioseguridad debe contar con las herramientas y con los recursos humanos capacitados para la detección de materias primas y productos que contengan transgénicos.

Por lo anteriormente expuesto, es evidente que como primer paso se deben implantar métodos para la detección de OGMs; que sean específicos y rápidos, por lo que la técnica de PCR representaría uno de los métodos de elección.

3. ANTECEDENTES

3.1 Biotecnología en plantas e ingeniería genética

El mejoramiento genético de especies económicamente importantes se ha realizado durante milenios mediante el cruzamiento de especies con características deseables al aplicar las técnicas tradicionales de fitomejoramiento, obteniéndose nuevas variedades o cepas de vegetales mejor adaptadas a las condiciones ambientales y con características mejoradas de calidad. Con el desarrollo de las técnicas de ADN recombinante, genes independientes, incluso pertenecientes a otras especies lejanas filogenéticamente, pueden ser específicamente integrados a la constitución genética de organismos completos (Balbás, 2002).

Un organismo genéticamente modificado (OGM) es un organismo cuya información cromosomal ha sido alterada mediante técnicas de ADN recombinante también denominada ingeniería genética. La modificación usualmente implica la inserción de una combinación de varias secuencias de ADN en el genoma del organismo (Jensen, 2001). Por organismo vivo modificado (OVM) se entiende cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de biotecnología moderna (CDB, 2000). El término de OVM se utiliza cuando se refiere a cualquier organismo capaz de transferir o replicar material genético, como por ejemplo las semillas transgénicas (Quirasco y Gálvez, 2002).

3.1.1 Ingeniería genética en plantas

Al igual que otros organismos, las plantas han sido utilizadas como hospederos para moléculas de ADN recombinante con propósitos variados, como la producción de metabolitos, el desarrollo de resistencia a condiciones ambientales y enfermedades, el aumento de la productividad, la alteración de las cualidades organolépticas, sensoriales, nutricionales y la textura de alguno de sus derivados, etc.

Como se sabe, se requiere de vectores de clonación¹ para la ingeniería genética de cualquier organismo; para las plantas se han desarrollado sistemas que se basan en dos vectores: virus específicos de plantas y el plásmido² Ti de la bacteria gramnegativa *Agrobacterium tumefaciens*.

Los virus que atacan plantas tienen la capacidad de infectar las células eficientemente, aunque su alcance de infección está determinado por la especie de las plantas. Estos virus deben ser capaces de mantener y acarrear el ADN clonado, no producir deterioro en las células que infectan y ser fácilmente purificables. El problema más generalizado en el uso de vectores virales en plantas es que los genes que se introducen son inestables y no se heredan a las

¹Los vectores de clonación o vehículos moleculares se han construido a partir de entidades extracromosomales con capacidad de replicación autónoma, conocidas como replicones, categoría que incluye a los plásmidos, virus y bacteriófagos (Balbás, 2002).

² Los plásmidos son moléculas de ADN de doble cadena, covalentemente cerrados y circulares, localizados extracromosomalmente, que se encuentran en la naturaleza y que pueden ser aislados como entidades individuales. Pueden ser utilizados como vectores de clonación (Balbás, 2002).

siguientes generaciones. Se emplean dos tipos de vectores con genomas de ADN: los caulimovirus (virus del mosaico de la coliflor) y los geminivirus.

Los virus con genomas de ARN aún no se explotan debido a la dificultad de clonar material genético. Esto podría hacerse a través de la síntesis enzimática de una copia de ADN_c³ para llevar a cabo la manipulación genética, pero luego queda aún por resolver el problema de su encapsidación y la infección de las células blanco.

Los vectores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* son a la fecha los vectores más eficientes. Esta bacteria es un fitopatógeno que vive naturalmente en el suelo y, como parte normal de su ciclo de vida, se introduce a las plantas a través de una herida y las transforma genéticamente. Así se genera un tumor que interfiere con el crecimiento normal de ciertas plantas gimnospermas y angiospermas dicotiledóneas, como son las rosas, uvas, frijol, soya y algunos árboles.

Los vectores construidos a partir de Ti se basan en la capacidad del ADN-T⁴ de transformar las células vegetales. Este es un método muy utilizado, sin embargo, varios problemas inherentes a Ti han tenido que solucionarse, por ejemplo, la disminución del tamaño del plásmido para hacerlo manejable, la introducción de un origen de replicación para mantener y propagar el vector en una bacteria, etc.

³ ADN_c o ADN complementario se obtiene mediante el copiado enzimático (transcriptasa inversa) de una molécula de ARN mensajero (Balbás, 2002).

⁴ ADN-T o ADN transferido es un segmento específico del plásmido Ti que habita en *Agrobacterium* (Balbás, 2002).

Además de la infección por virus y bacterias, existen otros métodos de transformación para plantas. De éstos, uno de los más utilizados es el bombardeo por microproyectiles, en el que esferas de oro o tungsteno de 0.4 a 1.2 micras de diámetro se recubren de ADN y se disparan hacia el interior de las células para que penetren hasta el interior del núcleo o del cloroplasto. Una vez dentro, el ADN puede integrarse en el genoma y estabilizarse. Este sistema se ha utilizado para transformar un gran número de especies diferentes que no son susceptibles al ataque por *A. tumefaciens*, como son maíz, arroz, cebada, trigo, entre otros.

La transformación por electroporación o choque eléctrico también se utiliza para transformar protoplastos (Balbás, 2002).

3.1.2 Aplicaciones de la ingeniería genética en plantas

Se ha buscado el desarrollo de plantas con características de resistencia a condiciones ambientales y plagas, mejores cualidades sensoriales, nutricionales, de crecimiento y pigmentación. Las plantas más estudiadas son las económicamente más relevantes, así como algunos frutos hortícolas, plantas ornamentales y plantas productoras de fibras textiles. El desarrollo de plantas transgénicas se ha llevado a cabo, principalmente en compañías de países desarrollados y utilizadas a nivel comercial en condiciones climáticas, de tecnificación y de entorno ecológico y cultural muy distantes a las de nuestro país, como es el caso de Estados Unidos de Norteamérica y Canadá. Dentro de las principales preocupaciones sobre la utilización de estos OVMs en México podemos mencionar que no necesariamente son eficientes en climas tropicales y en sistemas agrícolas poco tecnificados, que

no presentan ventajas contra las plagas de nuestro país, la posible generación de plagas resistentes, el posible efecto sobre insectos benéficos del ecosistema y el riesgo de flujo génico a parientes silvestres o a variedades criollas, si se trata de especies de polinización abierta (maíz); (Quirasco y Gálvez, 2002).

Las primeras plantas transgénicas que se cultivaron fueron aquellas con características agronómicas que les conferían resistencia a herbicidas, a insectos y esterilidad masculina. A estas primeras plantas se les conoce como primera generación y han sido ampliamente utilizadas en un gran número de países. Una segunda generación de plantas transgénicas son aquellas que por su modificación genética adquieren características fenotípicas diferentes a sus homólogas, como por ejemplo soya con diferente concentración de ácidos grasos o tabaco con baja nicotina (AgBios, 2005). Una tercera generación de plantas transgénicas son aquellas que por manipulación genética sintetizan sustancias farmacéuticas o no alimenticias. Esta nueva generación de plantas representa, hoy en día, un tema de análisis profundo que debería realizarse en todos y cada uno de los foros internacionales, para permitir su comercialización.

3.2 Maíz, productos tradicionales y eventos modificados genéticamente

3.2.1 Maíz, producción en México

El cereal más importante para el pueblo mexicano, el de mayor producción, al que se destinan más hectáreas del cultivo y el de mayor consumo *per capita* sin lugar a duda es el maíz. Este cereal fue un factor clave en el desarrollo de las culturas

prehispánicas en Mesoamérica y en México todavía se siembra como cultivo de subsistencia por campesinos y pequeños agricultores. Los estados que más producen son: Jalisco, Veracruz, Edo. de México, Zacatecas, Guanajuato y, recientemente, Sinaloa (Serna, 1996).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, señala que en nuestros días la importancia que tiene el cultivo de maíz abarca tres aspectos diferentes (De La Barrera, 2003):

1. Importancia agrícola: se le encuentra sembrado en todos los estados de la República Mexicana, ocupando 7 810 850 Ha de superficie cultivada y su rendimiento promedio es de 2.578 TM/Ha.

2. Importancia económica: su producción es de 20 134 300 TM en el país. En el año 2000, México importó 5 445 202 TM de maíz y exportó 57 441 TM. Las principales razas que se exportan son maíz dulce, maíz forrajero, maíz reventón y maíz azul.

3. Importancia social: su uso principalmente es para la alimentación humana ya que el 90% de los mexicanos lo consumen. Se utilizaron 12 849 348 TM para la alimentación por consumo directo en México, 1 109.421 TM para la elaboración de alimentos procesados y 43 930 TM para otros usos.

Por otra parte, existen datos acerca de que el 40% de las proteínas ingeridas en la dieta mexicana, proviene del consumo de maíz y se convierte entonces en la fuente de proteína más económica (Bourges, 2000).

Es sin duda alguna, un cultivo de gran importancia en México, pues en su consumo descansa la alimentación de millones de personas (De La Barrera, 2003).

3.2.2 Nixtamalización, proceso tradicional

La nixtamalización es el proceso de cocer el cereal en presencia de cal (CaO o Ca(OH)_2), antiguamente se utilizaban cenizas de hogueras, para posteriormente molturarlo y formar la masa. El objetivo de este proceso es facilitar la remoción del pericarpio de la semilla y, adicionalmente, ahora se sabe que juega un papel crítico en el mejoramiento del valor nutritivo del maíz ya que hace biodisponible a la niacina, aumenta la digestibilidad de los amino ácidos y aumenta la concentración de calcio (Serna, 1996). La masa es la materia prima que sirve para la elaboración de muchos productos típicos.

En la actualidad y principalmente en segmentos de menos recursos económicos, los productos nixtamalizados son todavía el principal sustento de la población mexicana. Indudablemente, el principal producto nixtamalizado es la tortilla. La tecnología para la elaboración de tortillas ha sido transmitida a través de las generaciones, siguiendo prácticamente los mismos pasos y procedimientos utilizados por los aztecas (Figura No. 1). La tortilla se puede definir como un pan no leudado elaborado a partir de maíz nixtamalizado.

Otro uso importante de la masa nixtamalizada es en la elaboración de atoles o bebidas nutritivas. Los atoles son muy consumidos, principalmente por niños en el sur de México y Centroamérica. Para su fabricación se toma un poco de masa, la cual se diluye en agua o leche y se calienta para propiciar la gelatinización

completa del almidón. Al final del proceso, se agrega azúcar, canela, hojas de naranja y otros saborizantes para mejorar su palatabilidad. Cabe mencionar que no todos los atoles son elaborados a partir del grano nixtamalizado (Serna, 1996).

En la Tabla No. 1 se describen otros productos tradicionales obtenidos a partir de maíz.

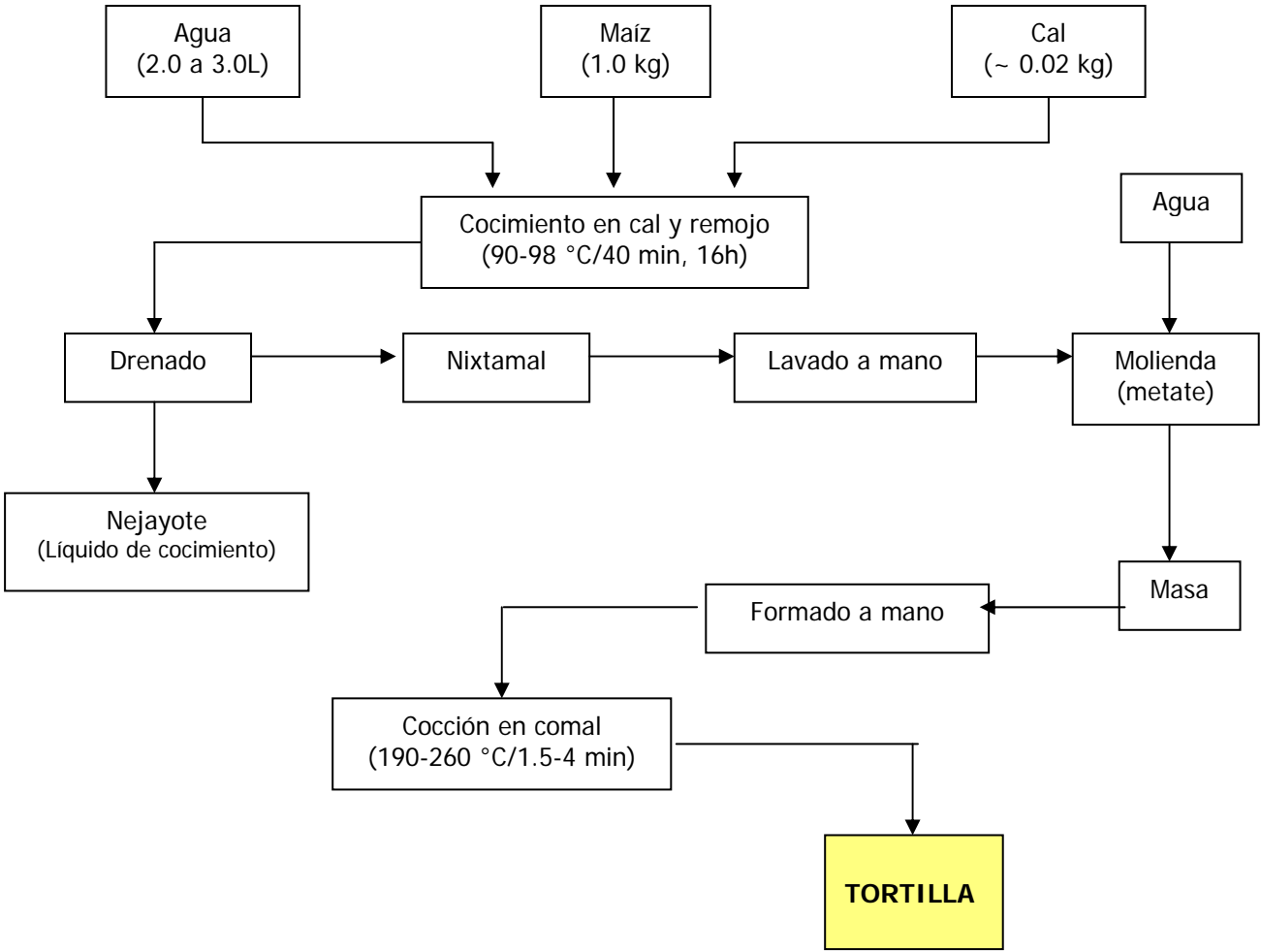


Figura No. 1 Diagrama de flujo del proceso tradicional utilizado para elaborar tortillas en México y Centroamérica (Serna, 1996).

Tabla No. 1 Algunos alimentos típicos procesados a partir de maíz nixtamalizado.

Alimento	Proceso
Tortilla	El maíz es cocido en cal (nixtamal), lavado, molido en una pasta llamada masa, la cual es moldeada en discos de 15-20 cm de diámetro y aproximadamente 2 mm de espesor para posteriormente ser cocidos en un comal (Serna, 1996).
Tlayuda	Sigue el mismo proceso que la tortilla sólo que la diferencia está en el tamaño. La tlayuda mide entre 30-40 cm de diámetro.
Fritos	El nixtamal es molido en una masa gruesa, extruido o laminado en tiras para posteriormente ser freído (Serna, 1996).
Totopos	El nixtamal es molido en una masa gruesa, laminado y cortado en círculos de diferentes tamaños para posteriormente ser horneado.
Tostadas	La masa gruesa es moldeada en discos para posteriormente ser horneada y frita en forma plana o de taco (Serna, 1996).
Tamales	El nixtamal es molido en una masa, la cual es mezclada con una cuarta parte de manteca, sal, consomé de pollo, polvo para hornear y especias. Una pequeña porción de esta masa se coloca en hojas de maíz u hojas de plátano cocidas (25 X 25 cm) para ser rellenas de frijoles con especias, pollo, carne de res, puerco, pescado, maíz dulce molido, etc. Los

	tamales se cuecen a vapor por 60-90 min En México, existen más de 20 tipos diferentes de tamales (Serna, 1996).
Pozol o Tejate	En el sur de México, el pozol es masa de maíz nixtamalizado moldeada en esferas y cubierta con hojas de plátano para ser fermentada por un periodo de 1-14 días. Las bolas de masa fermentadas se diluyen en agua, obteniéndose una bebida densa y pesada. El tejate es una bebida muy parecida al pozol sólo que aquí usan un poco de cacao para saborizar.
Atole	El nixtamal es molido para la producción de una masa, la cual es tamizada en húmedo para remover las partículas grandes. El colado es cocido en agua por aproximadamente 15-20 min y mezclado con agua y saborizantes (leche, azúcar, canela y hojas de naranja); (Serna, 1996).
Pinole	El maíz (ya sea cocido con cal o crudo) se tuesta en una plancha por 3-15 min, se muele en seco y se mezcla con especias (canela y anís) y azúcar morena. Esto posteriormente se mezcla con agua o leche, se cuece por 4 min y se consume como atole. Tiene una textura granular (Serna, 1996).
Nicuatole	Postre de maíz parecida a la gelatina. Podría describirse como gelatina de atole.

Es importante considerar que en México se consume el maíz también en forma de granos cocidos sin nixtamalizar, como es el caso de elotes, esquites y algunos tipos de pinole.

3.2.3 Maíz transgénico

El maíz transgénico es un organismo genéticamente modificado, vivo, capaz de transferir o replicar el material genético que le fue insertado mediante técnicas de ADN recombinante. La información adquirida le confiere a este cereal nuevas características. Las que han sido introducidas en forma comercial más frecuentemente son:

- Resistencia a herbicidas como glufosinato, glifosato, imidazolinona y setoxidima,
- Resistencia a plagas como lepidópteros (barrenador Europeo) y
- Esterilidad masculina.

Hasta ahora, existen 25 eventos de transformación genética de maíz, que han sido usados con fines comerciales:

Tabla No. 2 Eventos comerciales de maíz genéticamente modificado (AgBios, 2005).

Evento Comercial	Compañía Productora	Descripción
176	Syngenta Seeds, Inc.	Maíz resistente al barrenador Europeo (ECB). Esta resistencia es producida por la inserción del gen <i>cry1Ab</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> .

3751IR	Pioneer International Inc.	Hi-Bred	Resistente a imidazolinona.
676,678,680	Pioneer International Inc.	Hi-Bred	Esterilidad masculina y tolerancia a glufosinato de amonio (herbicida). Producido por la inserción del gen que codifica para la adenina metilasa y la fosfinotricina-acetiltransferasa (<i>pat</i>) de <i>Escherichia coli</i> y <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
B16 (DLL25)	Dekalb Corporation	Genetics	Tolerancia a glufosinato de amonio (herbicida) producida por la inserción del gen que codifica para la enzima PAT de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .
BT11(X4334CBR,X4734 CBR)	Syngenta Seeds, Inc.		Resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas producida por la inserción de los genes <i>cry1Ab</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> , y el gen que codifica para la enzima PAT de <i>S. viridochromogenes</i> .
CBH-351	Aventis CropScience		Resistencia a insectos y tolerante a glufosinato de amonio por la inserción de los genes que codifican para la

		proteína Cry9C de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>tolworthi</i> y la enzima PAT de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .
DAS-06275-8	DOW AgroSciences LLC	Resistente a insectos (lepidópteros) y tolerante al glufosinato de amonio (herbicida). Variedad producida por la inserción del gen <i>cry1F</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> y del fosfinotricina-acetiltransferasa (<i>pat</i>) de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .
DAS-59122-7	DOW AgroSciences LLC	Resistente a insectos (ECB). Variedad producida por la inserción de los genes <i>cry34Ab1</i> y <i>cry35Ab1</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> cepa PS149B1. La proteína PAT proviene de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> introducida como un marcador de selección.
DBT418	Dekalb Genetics Corporation	Resistencia a insectos y a glufosinato de amonio (herbicida) producida por la inserción de los genes que codifican para la proteína

		Cry1AC de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> y la enzima PAT de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .
DK404SR	BASF Inc.	Tolerancia a setoxidima.
EXP1910IT	Syngenta Seeds, Inc. (formerly Zeneca Seeds)	Tolerancia a imidazolinona inducida por mutagénesis química de la acetolactato sintetasa (ALS) usando metanosulfonato de etilo (EMS).
GA21	Monsanto Company	Modificación de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), involucrada en la ruta metabólica de la producción de amino ácidos aromáticos.
IT	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Tolerancia a imidazolinona.
MON80100	Monsanto Company	Resistencia a insectos (ECB) producida por la inserción del gen <i>cry1Ab</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> .
MON802	Monsanto Company	Resistencia a insectos y a glifosato (herbicida) producida por la inserción de los genes que codifican para la proteína Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> y para la enzima

		EPSPS de <i>A. tumefaciens</i> CP4
MON809	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Resistencia a insectos (ECB) por la inserción del gen sintético <i>cry1Ab</i> . Resistente a glifosato por la inserción del gen que codifica para EPSPS.
MON810	Monsanto Company	Resistencia a insectos (ECB) por la inserción del gen <i>cry1Ab</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1.
MON832	Monsanto Company	Introducción de los genes que codifican para la enzima glifosato oxidasa (GOX) y para EPSPS.
MON863	Monsanto Company	Resistencia a insectos producida por la inserción del gen <i>cry3Bb1</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> .
MON88017	Monsanto Company	Resistencia a insectos (ECB) producida por la inserción del gen <i>cry3Bb1</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumamotoensis</i> cepa EG4691. Tolerancia a glifosato por la inserción del gen <i>epsps</i> de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa CP4.
MS3	Aventis CropScience	Esterilidad masculina causada

	(formerly Plant Genetic Systems)	por la expresión del gen <i>barnasa</i> ribonucleasa de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; Resistencia a fosfotricina.
MS6	Aventis CropScience	Esterilidad masculina causada por la expresión del gen <i>barnasa</i> ribonucleasa de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; Resistencia a fosfotricina.
NK603	Monsanto Company	Modificación de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), involucrada en la ruta metabólica de la producción de amino ácidos aromáticos.
T14,T25	Aventis CropScience	Tolerante a glufosinato debido a la inserción del gen que codifica para la enzima PAT de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .
TC1507	Mycogen (c/o Dow AgroSciences); Pioneer (c/o Dupont)	Resistencia a insectos y al herbicida glufosinato de amonio debido a la inserción de los genes <i>cry1F</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> y del gen que codifica para la enzima PAT de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> .

De los 25 eventos comerciales mencionados en la Tabla No. 2, el evento **CBH351**, **Starlink™** es el único maíz transgénico no aprobado para consumo humano. Este evento comercial contiene, además del promotor CaMV35S y el terminador NOS, el gen *cry9C* (*Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthia*) que codifica para la proteína Cry9C. A esta proteína, por sus propiedades bioquímicas, se le ha considerado potencialmente alergénica ya que es estable al calor (90 °C/10 min) y a la degradación proteolítica durante la digestión enzimática (resistente a la pepsina a pH 2.0, ensayos *in vitro*). En cuanto a los ensayos de toxicidad, ésta parece no ser tóxica (AgBios, 2005).

Para la construcción de estos eventos comerciales se utilizaron las técnicas de ADN recombinante. En las secuencias insertadas se pueden distinguir tres elementos fundamentales que constituyen lo que se conoce como construcción genética (Figura No. 2):

1. El promotor que es indispensable para que se lleve a cabo la transcripción del gen de interés.
2. El gen o transgen que codifica para una característica específica.
3. El terminador que detiene la transcripción del gen de interés.

El transgen, el promotor y el terminador pueden proceder de un organismo distinto en especie o género al organismo que lo recibe por lo que se los denomina exógenos o heterólogos, aunque recientemente se han empleado promotores y terminadores que son propios del mismo maíz (endógenos).

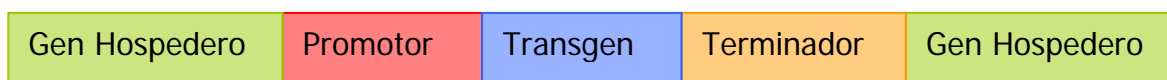


Figura No. 2 Esquema de una construcción modelo para su integración al cromosoma (Zimmermann *et al.*, 2000).

La técnica de PCR se emplea para detectar organismos modificados genéticamente a través de la amplificación de regiones determinadas de la construcción, de esto se hablará más adelante.

A continuación se presentan los principales promotores y terminadores de los eventos comerciales de maíz expuestos.

Tabla No. 3 Promotor y terminadores más usados en eventos de maíz transgénico liberados para comercialización (AgBios, 2005).

Promotor CaMV35S	Terminador NOS	Terminador CaMV35S
176	-	176
676,678,680	-	-
B16 (DLL25)	-	-
BT11(X4334CBR,X4734CBR)	BT11(X4334CBR,X4734CBR)	-
CBH351	CBH351	CBH351
DBT418	-	-
MON80100	MON80100	-
MON802	MON802	-
MON809	MON809	-
MON810	-	-

Promotor CaMV35S	Terminador NOS	Terminador CaMV35S
MON832	MON832	-
MON863	MON863	-
MS3	MS3	-
MS6	MS6	-
NK603	NK603	-
T14,T25	-	T14,T25
TC1507	-	TC1507
-	GA21	-
DAS-06275-8	-	-
DAS-59122-7	-	DAS-59122-7
MON88017	MON88017	-
20 Eventos con Promotor CaMV35S	12 Eventos con terminador NOS	5 Eventos con terminador CaMV35S

Los eventos comerciales que contienen promotores / terminadores endógenos son los eventos 3751IR, DK404SR, EXP1910IT, IT.

En cuanto a los transgenes o insertos más empleados en maíz se encuentran los genes para la proteína Cry (*cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry3Bb1*, *cry1F* y *cry9C*) que le confieren a las plantas resistencia a insectos (lepidópteros), genes *pat* y *epsps* que permiten al maíz ser tolerantes a herbicidas (glufosinato y glifosato) y el gen *barnasa* que le da esterilidad masculina a la planta.

3.3 Perspectivas del maíz transgénico en México

Los impactos potenciales, que más se deben vigilar, al liberar OVMs al medio ambiente se generan durante el ciclo de vida del organismo manipulado, ya que

éste es capaz de cruzarse con parientes silvestres o especies relacionadas y, por lo tanto, transferir o intercambiar el material genético modificado, lo que se conoce como flujo génico (Quirasco y Gálvez, 2002).

El caso del maíz transgénico es crítico para México, ya que, como centro de origen y diversificación de este cultivo, presenta un riesgo de flujo génico real que podría resultar en detrimento de los recursos y la diversidad biológica de nuestro país. Adicionalmente, en México, una gran proporción del maíz se destina a consumo humano y no a procesamiento, a diferencia de Estados Unidos, por lo que se debe hacer una evaluación rigurosa sobre la posible alergenicidad y/o impactos a la salud del producto transgénico.

Por lo anterior, se considera que en México la utilización de plantas transgénicas presenta una problemática multifactorial que no se puede negar ni sobre simplificar (Quirasco y Gálvez, 2002) y, para poder liberar cultivos transgénicos, deben haber programas de investigación dirigidos a una completa determinación de las características ecológicas y socioeconómicas que éste posee (Serratos, 1996).

3.4 Maíz transgénico evaluado en México

A través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), la Secretaría de Salud ha realizado evaluaciones de inocuidad de los OGMs destinados al uso y consumo humano, desde el año 1995.

El proceso de evaluación de la inocuidad de los OGMs que realiza la COFEPRIS, involucra una serie de pasos que, en conjunto, permiten detectar peligros

asociados al consumo de los mismos (FAO/WHO, 2005). Estos pasos son los siguientes:

1.- Información sobre la planta receptora: Se toma en consideración para realizar la evaluación de inocuidad, que las plantas empleadas estén bien caracterizadas, sean estables y que posean historia de uso y/o consumo seguro, considerando especialmente la ausencia de patogenicidad o toxicogenicidad. El historial de uso incluye información sobre la forma en que suele cultivarse, transportarse y almacenarse, si se requiere una elaboración especial a fin de que pueda consumirse con seguridad y el papel que ocupa normalmente en la dieta (por ej. qué parte de la planta se utiliza como fuente de alimento, si su consumo es importante en subgrupos particulares de la población, qué macro o micro nutrientes importantes aporta a la dieta).

2.- Información del/los donante/s: Se analiza la información sobre el organismo u organismos donantes y, cuando sea apropiado, sobre otros miembros del género correspondiente. Es particularmente importante que se determine si el organismo u organismos donantes, o bien otros miembros de la familia estrechamente vinculados, presentan características naturales de patogenicidad, de producción de toxinas u otros rasgos que afecten a la salud humana.

3.- Introducción del ADN: Se evalúa el método de transformación empleado, el tipo de material genético insertado, la localización y orientación del ADN en el vector, número de copias insertadas, se analizan posibles componentes genéticos responsables de efectos toxicológicos, factores de patogenicidad o irritantes.

Adicionalmente, se evalúa la habilidad del material transgénico para ser expresado en la planta transformada y en sus líneas derivadas (ciclos vegetativos de propagación) de una forma consistente y de una manera predecible.

4.- Información del producto: En este apartado se analiza el resultado de la modificación genética, evaluándose posibles modificaciones en el perfil metabólico del organismo modificado, alteraciones en la composición de micro y macro nutrientes críticos, antinutrientes, toxinas endógenas (mayor expresión de toxinas normalmente producidas o activación de genes normalmente no expresados), alérgenos y sustancias activas fisiológicamente. Adicionalmente, se evalúa la estabilidad del material genético insertado en el organismo receptor.

5.- Información nutricional: Un aspecto central a evaluar son las modificaciones que el OGM pueda contener con respecto a su homólogo no modificado y el impacto que dichos cambios pueden generar en la salud de los consumidores. Estos análisis se llevan a cabo comparando esta información con su equivalente homólogo no modificado presente en la dieta mexicana y producido en las mismas condiciones. Deben utilizarse los datos sobre los patrones locales conocidos de uso y consumo de un alimento y sus derivados para calcular la ingesta probable del alimento que posea un OGM.

Este concepto se denomina "*equivalencia sustancial*" y es uno de los principales componentes que rigen la evaluación de la inocuidad de alimentos derivados de OGMs. Este concepto incorpora un criterio de base científica por el que se compara un alimento modificado genéticamente con el homólogo apropiado

existente y consumido en México. No tiene por finalidad establecer la inocuidad absoluta, que es un objetivo inalcanzable para cualquier alimento, lo que se propone es garantizar que un alimento, así como cualquier sustancia que haya sido introducida en él como resultado de una modificación genética, sea tan inocuo como su homólogo tradicional bajo las condiciones de consumo en México.

Cualquier modificación en los niveles de nutrientes se evalúa teniendo en cuenta el impacto que puede generar sobre el consumo. En estos casos será importante determinar las alteraciones en el contenido de nutrientes y su biodisponibilidad, su estabilidad con el tiempo, procesamiento y almacenamiento, así como monitorear los cambios en los patrones alimenticios como resultado de la introducción de alimentos genéticamente modificados y evaluar el efecto sobre la nutrición y salud de los consumidores.

6.- Información toxicológica: La evaluación de la toxicidad potencial se concentra en la analogía entre las secuencias de aminoácidos de la proteína examinada y de toxinas conocidas, así como en la estabilidad térmica o durante la elaboración y la degradación en modelos apropiados y representativos de los sistemas gástrico e intestinal.

Se evalúan estudios toxicológicos diseñados apropiadamente (tiempo, dosis, número de animales, grupos control, estadística, etc.), sobre el efecto que las nuevas proteínas expresadas en el OGM tienen a la salud de los consumidores, considerando su función y concentración en el alimento (teniendo en cuenta los patrones mexicanos de consumo).

Se analizan los estudios de toxicidad empleando modelos animales y se corrigen los resultados para homologarlos a las características fisiológicas humanas. En esos estudios se prueban concentraciones de proteína recombinante que superen la exposición normal en el orden de 10^3 a 10^6 . Esta dosificación exageradamente elevada da la garantía de que, si la proteína es tóxica, sus efectos se observarán inmediatamente.

Como resultado de los estudios toxicológicos se obtiene el Nivel Máximo sin Efectos Adversos Observables (NOAEL), es decir, la máxima cantidad de proteína consumida que no genera efectos nocivos. La Secretaría de Salud cuenta con información sobre el consumo alimenticio en México por día según el nivel socioeconómico de la población, aportada por el Instituto Nacional de Ciencias de la Nutrición. A partir de esa información se calcula el máximo consumo diario de la población mexicana de todos los alimentos elaborados a partir del cultivo modificado. Posteriormente, se estima la ingesta de proteína recombinante potencial al considerar que todos los alimentos son elaborados a base del producto transgénico y que éste posee la máxima concentración de proteína recombinante observada (análisis del peor escenario). Con esta información, se obtiene el factor de seguridad (NOAEL/consumo diario de proteína recombinante), es decir, cuánto más alimento se debería consumir para ingerir una cantidad de proteína recombinante y aún así no ser tóxico. De acuerdo a estudios, los factores de seguridad superan 8,000 unidades, es decir, que si el máximo consumo de maíz en México es de 400 gramos diarios y, si todo el maíz fuera transgénico y sus

proteínas no se digiriesen en el estómago e intestino, una persona debería ingerir 3,200 Kg de alimentos para alcanzar una concentración de proteína recombinante que aún no sería tóxica. Además, se realizan supuestos con base al consumo de niños o grupos vulnerables.

Cabe destacar que, en estudios toxicológicos avalados por la OMS para calcular la Ingesta Diaria Admisible (IDA), se debe dividir al NOAEL por 10 o por 100 si se le comprueba toxicidad aguda o carcinogenicidad a la proteína recombinante (hecho no demostrado en ninguna proteína recombinante evaluada). Esto nos hace suponer que, aún siendo carcinogénica la proteína recombinante, un individuo debería consumir 32 Kg. de alimentos a base de maíz transgénico para sufrir efectos; esto significa que un adulto de 60Kg debería ingerir la mitad de su peso diariamente.

7.- Alergenicidad: Dado que los alimentos genéticamente modificados suelen contener proteínas nuevas, la evaluación de su inocuidad debe incluir aspectos relacionados a la alergenidad del mismo:

- a) Origen del material genético transferido, adoptándose especial precaución si la fuente de ese material contiene alérgenos conocidos. Cuando el alimento genéticamente modificado contiene genes seleccionados de fuentes con efectos alérgicos conocidos, debe suponerse que el nuevo producto génico es alérgico a menos que se demuestre lo contrario. En estos casos se realizan estudios más profundos para descartar la presencia de proteínas con potencial alérgico.

- b) Homología de secuencias aminoacídicas entre la nueva proteína y alergenos conocidos. Muchos de los alergenos (porción de la proteína responsable de generar respuestas inmunológicas) de las proteínas, contienen menos de 8-12 aminoácidos. Existen bases de datos, como Farrp Allergen Database, que contienen las secuencias aminoacídicas de proteínas conocidas como alergenos, las cuales sirven para comparar con las secuencias de aminoácidos de las proteínas transgenicas. Si existe homología en por lo menos 8 aminoácidos consecutivos, la proteína transgenica es considerada como potencialmente alergica y requerirá mayores estudios.
- c) Efecto del pH o de la digestión enzimática (gástrica e intestinal), estabilidad frente al calor o procesamiento. Se estudia el efecto de la temperatura, pH bajos y resistencia a la digestión enzimática. Si una proteína es termosensible, se supone que será destruida durante los procedimientos culinarios normales. Si se consumiera el producto sin procesar, se analiza la estabilidad de la misma simulando el ambiente gástrico e intestinal. Las proteínas recombinantes presentaron una gran sensibilidad a la digestión gástrica, hidrolizándose completamente dentro de los 15 segundos de exposición. Todos estos estudios nos informan sobre qué cantidad de proteína recombinante está expuesta la población.
- d) Modificaciones post-transduccionales (glicosilaciones).
- e) La reactividad cruzada de IgE entre una proteína de nueva expresión y un alergeno conocido debe considerarse posible cuando hay más de 35% de

identidad en un segmento de 80 o más aminoácidos o se cumple otros criterios científicamente fundados.

Las proteínas alergénicas tienden, en general, a presentar ciertas características como poseer un peso molecular entre 10 y 70 kDa, resistir a la digestión de enzimas proteolíticas y ambientes ácidos, ser termorresistentes, poseer un punto isoeléctrico ácido, ser hidrosolubles, constituir una parte sustancial del contenido proteínico del alimento (1-80%) y sufrir modificaciones post-transduccionales (glicosilaciones). Por ende, sólo aquellas proteínas que reúnan todas las condiciones anteriormente citadas, poseen potencial para sensibilizar a un organismo; por lo que, la Secretaría de Salud analiza que las proteínas recombinantes no presenten estos atributos y, por lo tanto, no son sujetos de sospecha como causantes de reacciones alérgicas en individuos sensibilizados. Cada uno de estos aspectos se analiza en profundidad y si se detectara algún riesgo en cualquiera de estos puntos, la evaluación se detiene y se puede, o bien solicitar información adicional que responda a los cuestionamientos, o si el peso de la evidencia es suficiente, negar la libre comercialización del producto.

Este proceso de evaluación de riesgos llevado a cabo en la COFEPRIS no opera bajo el concepto de ponderación de riesgos, sino que un solo punto que demuestre peligrosidad es suficiente para detener el proceso.

En virtud de que la biotecnología moderna es una disciplina relativamente nueva, dinámica y susceptible a cambios, los eventos aprobados son reevaluados una vez por año, atendiendo especialmente a los aspectos toxicológicos y de alergenicidad;

actualizando la información a los nuevos conocimientos que se generen. La COFEPRIS cuenta con una base de datos de todas las proteínas recombinantes que evaluó hasta la actualidad y anualmente se realiza una verificación de su inocuidad al introducirlas a dos bases de datos que periódicamente agregan las proteínas con reconocida actividad tóxica o alergénica. Si, producto de esa evaluación inicial se identificaran homologías entre la proteína recombinante con proteínas tóxicas o alergénicas, se daría una señal de alerta y se quitaría la aprobación del producto mientras se realiza una evaluación más profunda.

El proceso de evaluación de la inocuidad de OGMs que lleva a cabo la COFEPRIS, rebasa las directrices que la Comisión del Codex Alimentarius ha declarado. Asimismo, el Codex ha determinado que la evaluación de la inocuidad previa a la comercialización garantiza que el alimento es tan seguro como su homólogo convencional y menciona que sería muy improbable que los efectos a largo plazo fueran específicamente atribuibles a los alimentos genéticamente modificados y que los estudios epidemiológicos de observación pudieran distinguir esos efectos de los producidos por los alimentos convencionales.

De los OGMs evaluados en México por la COFEPRIS, 9 eventos son de maíz transgénico que ya cuentan con la calificación de “no inconveniente de comercialización” (Tabla No. 4).

Tabla No. 4 Maíz genéticamente modificado que se ha evaluado y aceptado para su comercialización en México (COFEPRIS, 2005)

Nombre del Evento de Maíz	Gen(es) Expresado(s)
<p>1. GA21 (Roundup Ready®) Maíz (<i>Zea mays</i> L.) tolerante al herbicida glifosato Identificador OECD: MON-ØØØ21-9 Desarrollador: Monsanto Comercial, S.A. de C.V. Fecha de Liberación: Mayo 24, 2002</p>	<p>a) Gen <i>epsps</i> de maíz</p>
<p>2. NK 603 (Roundup Ready®) Maíz (<i>Zea mays</i> L.) tolerante al herbicida glifosato Identificador OECD: MON-ØØ6Ø3-6 Desarrollador: Monsanto Comercial, S.A. de C.V. Fecha de Liberación: Junio 7, 2002</p>	<p>a) Gen <i>cp4 epsps</i> y <i>cp4 epsps L214p</i> de <i>Agrobacterium</i> sp cepa CP4</p>
<p>3. MON 810 (Yieldgard®) Maíz (<i>Zea mays</i> L.) resistente a insectos lepidópteros Identificador OECD: MON-ØØ81Ø-6 Desarrollador: Monsanto Comercial, S.A. de C.V. Fecha de Liberación: Noviembre 6, 2002</p>	<p>a) Gen <i>cry1Ab</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i></p>
<p>4. TC1507</p>	<p>a) Gen <i>cry1F</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i></p>

<p>Maíz (<i>Zea mays</i> L.) resistente a insectos y lepidópteros y tolerante al herbicida glufosinato de amonio</p> <p>Identificador OECD: DAS-Ø15Ø7-1</p> <p>Desarrollador: Híbridos Pioneer de México, S.A. de C.V.</p> <p>Fecha de Liberación: Septiembre 15, 2003</p>	<p>var. <i>oizawai</i> cepa PS 811</p> <p>b) Gen <i>pat</i> (fosfinotricina acetil transferasa) de <i>Streptomyces viridochromogenes</i></p>
<p>5. MON 863</p> <p>Maíz (<i>Zea mays</i>) resistente a insectos, a coleópteros y a Kanamicina.</p> <p>Identificador OECD: MON-ØØ863-5</p> <p>Desarrollador: Monsanto Comercial, S.A. de C.V.</p> <p>Fecha de Liberación: Octubre 7, 2003</p>	<p>a) Gen <i>cry3Bb1</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kumatoensis</i></p> <p>b) Gen <i>ntpII</i> (neomycin fosfo-transferasa tipo II)</p>
<p>6. MON 810 x NK 603</p> <p>Maíz (<i>Zea mays</i>) resistente a insectos lepidópteros</p> <p>Línea MON810 y Maíz solución faena, tolerante al herbicida glifosato línea NK 603</p> <p>Identificador OECD: MON-ØØ603-6 X MON-ØØ81Ø-6</p> <p>Desarrollador: Monsanto Comercial, S.A. de C.V.</p> <p>Fecha de Liberación: Evaluado el Marzo 3, 2004</p>	<p>a) Gen <i>cry1Ab</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp <i>kurstaki</i>.</p> <p>b) Proteína CP4 EPSPS de <i>Agrobacterium sp.</i></p>
<p>7. DAS 59122-7</p>	<p>a) Gen <i>cry34Ab1</i></p>

<p>Maíz (<i>Zea mays</i> L.) resistente a <i>Diabrotica virgifera</i>, <i>Diabrotica berberis</i> y <i>Diabrotica virgifera zea</i></p> <p>Identificador OECD: DAS-59122-7</p> <p>Desarrollador: Híbridos Pioneer de México, S.A. de C.V.</p> <p>Fecha de Liberación: Diciembre 6, 2004</p>	<p>b) Gen <i>cry35Ab1</i></p> <p>c) Gen <i>pat</i></p>
<p>8. MON 863 x NK 603</p> <p>Maíz (<i>Zea mays</i>) resistente al gusano de la raíz (<i>Diabrotica</i> spp) evento MON 863 y tolerante al herbicida glifosato, evento NK603.</p> <p>Identificador OECD: MON-ØØ863-5 X MON-ØØ6Ø3-6</p> <p>Desarrollador: Monsanto Comercial, S.A. de C.V.</p> <p>Fecha de Liberación: Diciembre 10, 2004</p>	<p>a) Gen <i>cry3Bb1</i></p> <p>b) Gen <i>cp4 epsps</i></p>
<p>9. TC1507 x NK 603</p> <p>Maíz (<i>Zea mays</i> L.) resistente a insectos y lepidópteros y tolerante al herbicida glufosinato de amonio y glifosato.</p> <p>Identificador OECD: DAS-Ø15Ø7-1 x MON-ØØ6Ø3-6</p> <p>Desarrollador: Híbridos Pioneer de México, S.A. de C.V.</p> <p>Fecha de Liberación: Diciembre 13, 2004</p>	<p>a) Gen <i>cry1F</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>oizawai</i> cepa PS 811</p> <p>b) Gen <i>pat</i> (fosfinotricina acetil transferasa) de <i>Streptomyces viridochromogenes</i></p> <p>c) Gen <i>cp4 epsps</i></p>

3.5 Monitoreo de OGMs

La detección específica de una región determinada de ADN es el paso más importante en cualquier estrategia de clonación y monitoreo; debe buscarse aquel sistema que permita la detección e identificación inequívoca del fragmento deseado en un tiempo corto. La estrategia general incluye la técnica de PCR, el análisis de patrones de restricción del amplicón y la hibridación de ácidos nucleicos. Otra estrategia utilizada es la identificación de proteínas (sondeo inmunológico) aunque resulta menos sensible (Balbás, 2002).

3.5.1 La reacción en cadena de la polimerasa o PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es un procedimiento efectivo para generar grandes cantidades de una secuencia específica de ADN *in vitro*. Esta amplificación se logra mediante un proceso cíclico de reacciones enzimáticas. Los requerimientos esenciales para esta técnica son:

- a) Un ADN de doble cadena que actúe como molde.
- b) Dos oligonucleótidos sintéticos (primers o cebadores) como iniciadores de la síntesis, que deben ser complementarios a las regiones en la doble cadena de ADN molde. La hibridación de los cebadores debe ser en regiones que flanquean al ADN de interés y con los extremos 3' orientados hacia el centro de la secuencia a sintetizar.
- c) Una ADN polimerasa termoestable, que resista temperaturas mayores a 95 °C, como la polimerasa Taq de *Thermus aquaticus*.

- d) Los cuatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) en un buffer adecuado.
- e) Iones de Magnesio en exceso molar con respecto a los dNTPs.

El procedimiento cíclico del PCR es en tres pasos: la desnaturalización del ADN molde es el primero. La muestra se somete a calentamiento hasta llegar alrededor de 95 °C por espacio de algunos minutos, para romper los puentes de hidrógeno que le confieren al ADN su estructura de doble hélice.

El segundo paso, la renaturalización, implica la hibridación de los cebadores con sus regiones específicas en el molde, un cebador en cada una de las cadenas, para lo cual la reacción se enfría alrededor de los 55 °C.

En el tercer paso, la síntesis del ADN, la temperatura se aumenta hasta alrededor de 75°C, que al ser la óptima para la función catalítica de la ADN polimerasa Taq, permite la síntesis de las cadenas del ADN a partir del extremo –OH 3 ' de los cebadores y procede en dirección 5 ' a 3 '.

Estos tres pasos (Figura No. 3) se repiten entre 25 – 40 ciclos, lo que genera la amplificación exponencial de las cadenas de ADN.

Al contar con oligonucleótidos específicos (primers o cebadores) que permitan la síntesis de ADN de doble cadena, la PCR permite el análisis de los fragmentos generados, como ya se explicó anteriormente (Balbás, 2002).

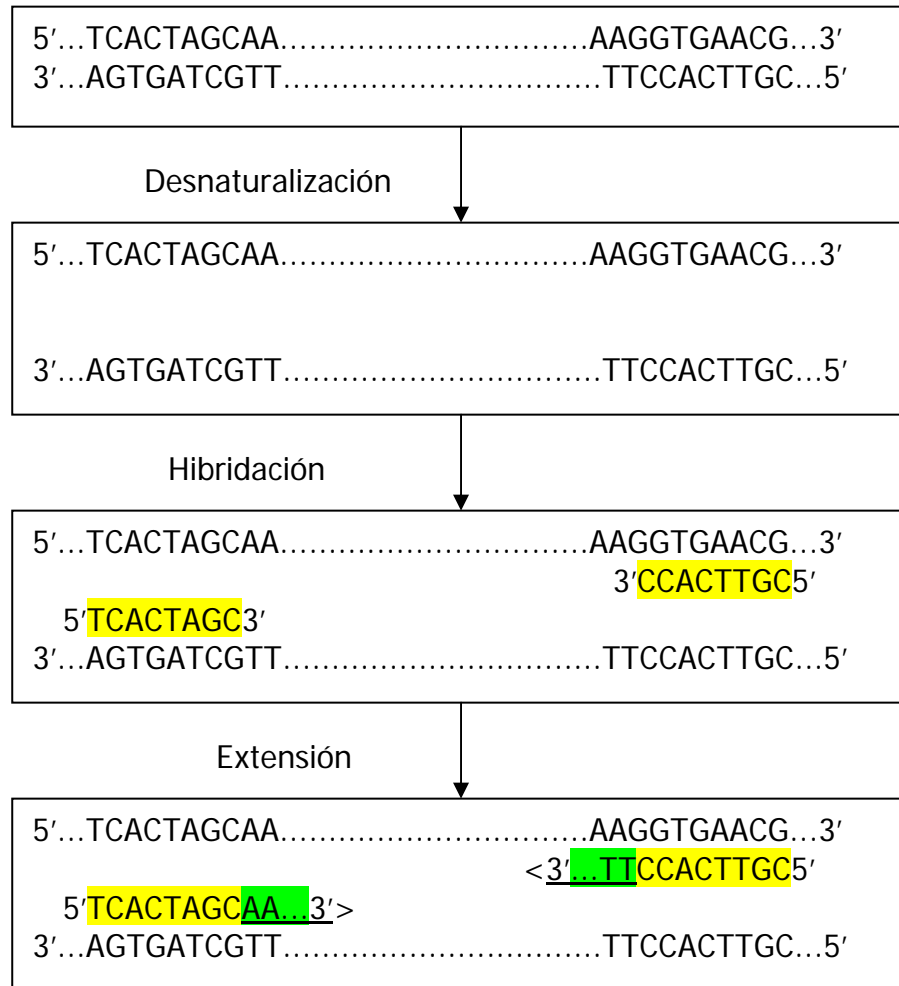


Figura No. 3 Ejemplificación de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Watson, 1992).

La necesidad de monitorear y verificar la presencia y la cantidad de un OGM tanto en cultivos como en productos alimenticios ha generado la demanda de métodos analíticos capaces de detectar, identificar y cuantificar tanto el ADN como la proteína recombinante expresada en la planta. Hoy en día existen diferentes tipos de PCR que se usan para la detección de OGMs como son PCR Multiplex, PCR – QC (cuantitativa competitiva) y PCR tiempo real (Hae-Yeong, 2004). Ésta última es la

más conveniente ya que permite cuantificar la cantidad de transgen presente en la muestra, resultando esto en un beneficio para aquellos países donde su regulación les exige utilizar este tipo de estudios para indicar la cantidad de transgénico presente en la etiqueta de un producto o conocer la cantidad de la presencia adventicia de transgénicos en un embarque y detectar si estos están autorizados para su uso y consumo o no; aunque también es la más costosa.

Los alimentos procesados generalmente son analizados a través de PCR ya que los ensayos inmunológicos, que también se emplean para detectar OGMs, son menos sensibles ante este tipo de productos, puesto que la matriz del alimento se ve afectado por los distintos procesos a los que se somete. Como el ADN es una estructura relativamente estable ante el procesado de los alimentos, éste es el analito que se prefiere para cualquier tipo de muestra (materias primas, ingredientes, alimentos procesados); (Marmioli, 2003).

Lo que se busca específicamente dentro del ADN de alguna planta o alimento que se sospeche sea transgénico es alguna parte de la construcción integrada al cromosoma. Al respecto, a un primer nivel de detección, lo que se busca es el CaMV35S o el terminador NOS de *Agrobacterium tumefaciens*, siendo ambos elementos no propios del genoma de las plantas. A esta búsqueda se le conoce como *screening* o tamizaje ya que lo único que nos va aportar es si la muestra es transgénica o no, sin arrojar más información. Un segundo nivel de detección sería tratar de identificar al transgen presente en la planta modificada genéticamente. A esto se le conoce como identificación gen específico. Un tercer

nivel sería identificar a los elementos de la construcción presentes en el OGM (promotor – transgen / transgen – terminador / promotor – terminador) y a este nivel se le conoce como identificación construcción específica. Un cuarto nivel, en el que el análisis es muy detallado, es la identificación de una parte del genoma de la planta con la construcción transgénica. Aquí se tiene certeza absoluta del evento transgénico del que se trata por lo que se le conoce como identificación evento específico (Holst-Jensen, 2003). La Figura No. 4 explica en forma resumida lo expuesto anteriormente.

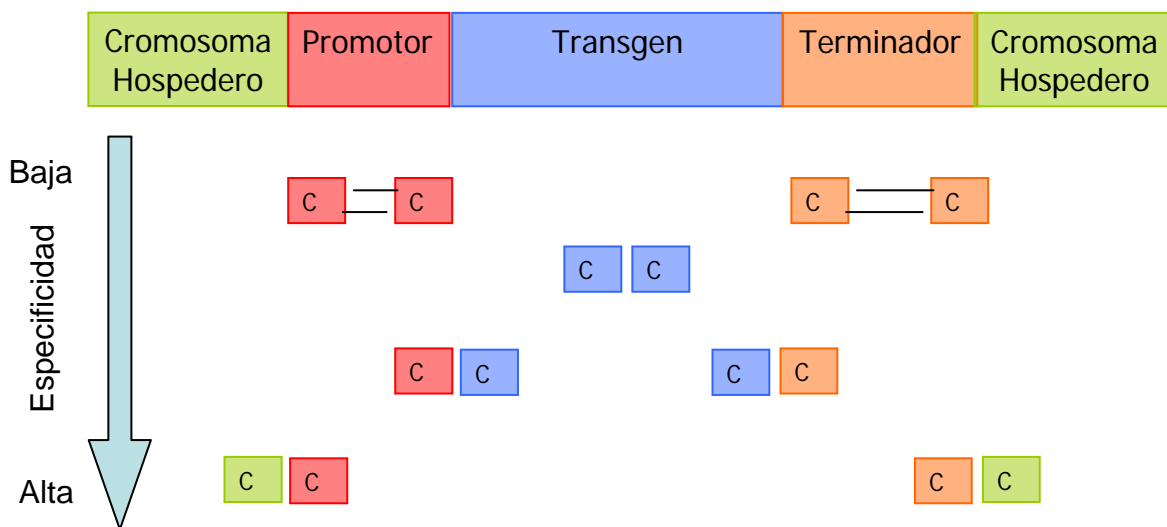


Figura No. 4 Fundamento de la detección de transgénicos por PCR a diferentes niveles de especificidad en la detección (Kessler, 2001); (c = cebador)

3.5.2 Análisis de patrones de restricción

Es el análisis comparativo de los fragmentos de ADN generados por hidrólisis, mediante endonucleasas de restricción. Aplicado al monitoreo de OGMs, este análisis se usa para corroborar los resultados obtenidos en PCR. Lo que se hace es comparar el patrón de fragmentos del amplicón obtenido con los fragmentos resultantes de la hidrólisis, por lo que es útil tener un mapa preciso del amplicón utilizado y fragmentos de ADN con peso molecular conocido para saber el tamaño aproximado. La comparación de los patrones obtenidos indica la ausencia o presencia de ADN transgénico, ya que el tamaño de las bandas resultantes debe ser igual al esperado. Este método es muy útil cuando el inserto es de bajo peso molecular, además de hacerse en un tiempo corto.

3.5.3 Hibridación de ácidos nucleicos

El hecho de que las cadenas parcial o totalmente complementarias de ADN o ARN pueden hibridar entre sí formando los puentes de hidrógeno correctamente para generar dúplex de ADN-ADN o ARN-ADN es la base conceptual de una serie de técnicas que incluyen a la hibridación en colonia, en punto o en filtros donde los ácidos nucleicos se hayan transferido. Un fragmento de ADN o de ARN aislado puede utilizarse como rastreador o sonda de una secuencia de ADN similar, por lo que la sonda debe marcarse de alguna forma, generalmente con radioisótopos. La sonda se pone en contacto con la muestra problema y las moléculas homólogas hibridan entre sí. El soporte se lava de modo que se elimine el resto de la sonda radioactiva no hibridada, y el resultado se obtiene al exponer el soporte a una

película de rayos X. Los métodos conocidos como Southern blot y Northern blot se basan en el principio antes dicho (Balbás, 2002), el primero es para ADN y el segundo es para ARN. En el monitoreo de OGMs se emplea el Southern Blot para identificar las partes de la construcción transgénica y este método, por su sensibilidad, puede ser utilizado para confirmar los resultados de un PCR normal aunque la técnica es muy cara y tardada.

3.5.4 Métodos Inmunológicos

Se han desarrollado varias pruebas inmunológicas dependientes de la disponibilidad de anticuerpos dirigidos contra el producto codificado por la secuencia de ADN exógeno. El sondeo inmunológico ofrece una opción de elevada especificidad para el análisis de transgenes, en donde la limitación más importante es el hecho de que las células hospederas tienen que ser capaces de sintetizar la proteína en cantidades detectables (Balbás, 2002).

Adicionalmente, hay que considerar que las proteínas son moléculas lábiles, por lo que pueden no ser detectadas debido a la pérdida de la estructura que permite la generación de epítopes capaces de reaccionar con un anticuerpo (análisis ELISA⁵) o dar falsos positivos por reconocer estructuras de proteínas parecidas (Popping, 2003).

⁵ Esta técnica inmunológica emplea un anticuerpo para reconocer específicamente a una proteína de interés. Se forma un complejo antígeno-anticuerpo estable que puede visualizarse al añadir a la reacción un segundo anticuerpo unido a una enzima que, al reaccionar con un sustrato, ocasiona un cambio de coloración en el medio. La técnica se hace cuantitativa cuando se corre paralelamente una curva patrón (Balbás, 2002). Sus siglas indican un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas.

Otro factor a considerar es que algunas proteínas heterólogas son capaces de expresarse en un tejido específico, por lo que existen diferencias importantes de acuerdo al tejido del que se trate. Es decir, que existen genes que se expresan preferentemente en hoja, por lo que la producción de proteína exógena en semilla es baja.

4. JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

En la Tesis titulada *La Técnica de PCR Aplicada a la Detección del Promotor 35S en Granos y Alimentos Derivados de Maíz* (Luis, 2002), se diseñaron cebadores para la detección del promotor CaMV35S en productos de maíz procesados industrialmente. Este estudio es parte de un proyecto global para el desarrollo e implantación de metodologías para la detección de transgenes en maíz y derivados del laboratorio 312 del Conjunto E de la Facultad de Química, por lo que ahora, en esta Tesis se diseñaron cebadores para la detección del terminador NOS (T – NOS) debido a que en los estudios tanto de la SAGARPA como del INE (Ortiz-García, 2005) sólo se ha utilizado la detección del promotor CaMV35S, además, la detección del promotor CaMV35S no resulta confiable en alimentos con cierta cantidad de vegetales susceptibles naturalmente a la infección del virus del mosaico de la coliflor (principalmente *brassicáceas*), por lo que se considera que el desarrollo de una metodología para el T – NOS será un buen complemento para poder detectar el 48% de los eventos comercializados de maíz transgénico.

Por otro lado, al considerarse la probabilidad de que haya introgresión de transgenes en el estado de Oaxaca y que existe la posibilidad de detectar por PCR alguna de estas dos secuencias (promotor o terminador) en alimentos tradicionales elaborados a base de maíz de la región; se podrá detectar la presencia del promotor CaMV35S o del terminador NOS en maíz y alimentos tradicionales derivados de éste en el estado de Oaxaca a través de la técnica de PCR. Un

resultado positivo posiblemente indicaría que los alimentos fueron elaborados con maíz transgénico.

Además, se eligió el evento comercial transgénico CBH351 Starlink™ como sistema de análisis a identificar debido a que posee un transgen (*cry9C*) que codifica para una proteína que por sus propiedades bioquímicas se ha considerado potencialmente alergénica, por lo que el evento comercial sólo ha sido aprobado para consumo animal.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

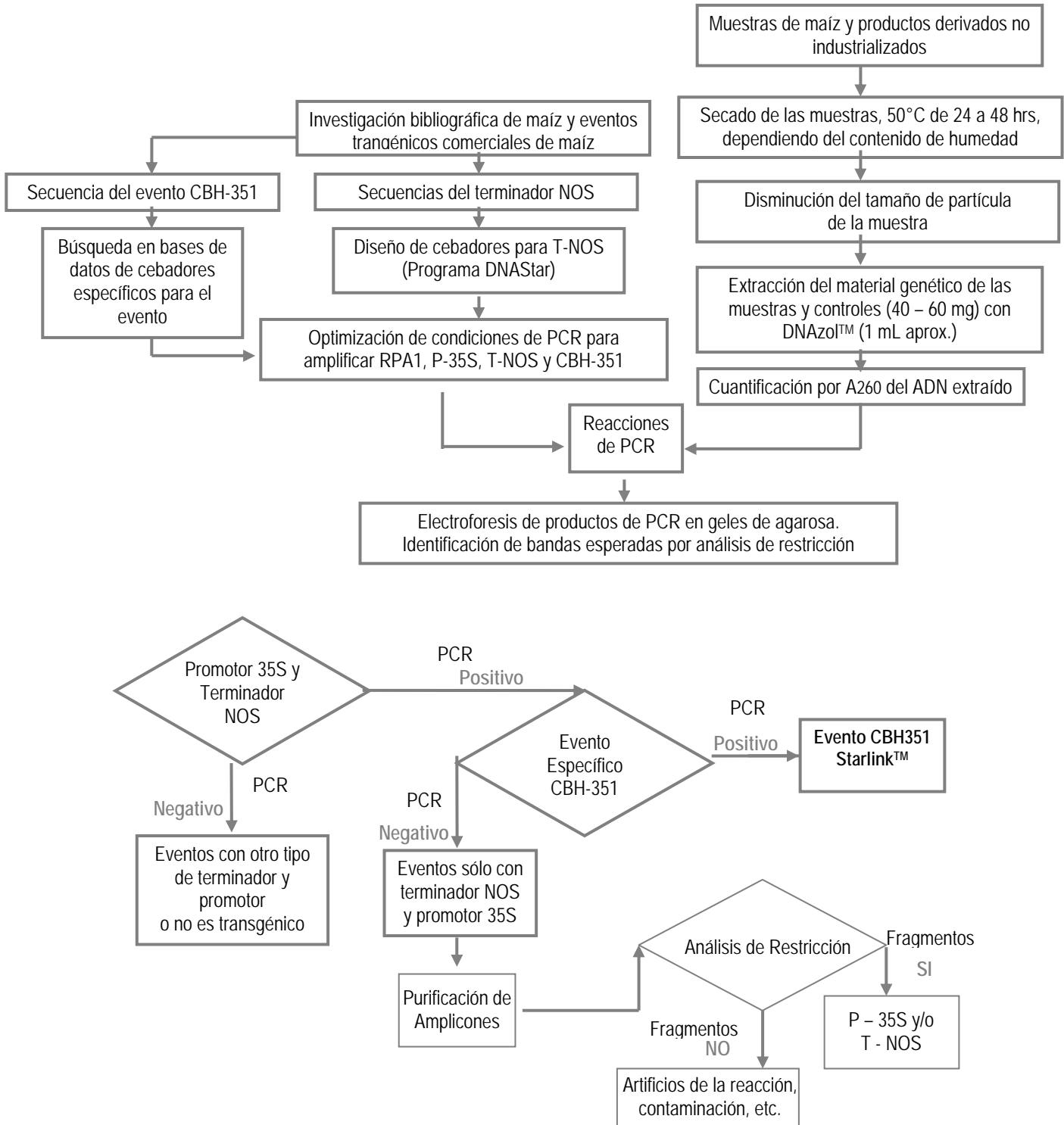
- ❖ Identificación de la presencia de secuencias transgénicas en maíz y productos derivados tradicionales del estado de Oaxaca con la reacción en cadena de la polimerasa.

5.2 Objetivos particulares

- ❖ Diseño de los cebadores para la amplificación del terminador NOS en eventos de maíz.
- ❖ Detección de secuencias transgénicas en alimentos tradicionales del valle de Oaxaca buscando la presencia del promotor CaMV35S y/o del terminador NOS.
- ❖ Corroboración indirecta de la presencia de los amplicones obtenidos (promotor CaMV35S y/o terminador NOS) por análisis de restricción.
- ❖ Detección del evento comercial **CBH351**, **Starlink™** en controles positivos para el promotor CaMV35S, el terminador NOS y el transgen *cry9C*.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El siguiente diagrama de flujo explica la estrategia experimental:



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Muestras y Controles

La mayoría de las muestras analizadas en el proyecto se adquirieron en mercados municipales y “tianguis” del estado de Oaxaca. Dentro de estas muestras se contó con granos de maíz de diferentes variedades, harinas y masa nixtamalizadas, tamales, tlayudas, totopos, tortillas, etc. Adicionalmente, en supermercados de EUA se compraron granos enlatados, tamales y tortillas. En la Tabla No. 5 se describen las muestras analizadas clasificadas de acuerdo a su tipo.

Como controles positivos para la detección de maíz transgénico se emplearon granos y productos elaborados en el laboratorio a partir del evento CBH351 Starlink™ y maíz blanco (tortillas, totopos y masa frita). Estos controles se encontraban al 0.1%, 1% y 10% (p/p) de transgénico.

Otros controles positivos para la detección de transgénicos, para el P – 3 5S y el T – NOS, que se utilizaron en el trabajo fueron las harinas de maíz transgénico certificadas por el Institute for Reference of Materials and Methods (IRMM) de los eventos: Bt11 (2%), Bt176 (5%) y MON810 (2%). (FLUKA no. catálogo 09757, 17111 y 0221, respectivamente). Estas harinas certificadas también se emplearon como controles negativos para la identificación del gen *cry9C*, específico del evento CBH-351 Starlink™.

Como control negativo de la detección de transgénicos se emplearon granos de maíz no modificados genéticamente certificado por GeneticID (maíz blanco y criollo chalqueño). En la Tabla No. 6 se resumen las características de los controles.

Tabla No. 5 Clasificación de muestras

No. de Muestras	Tipo de Muestra	Lugar de Origen
2	Harinas de maíz	Tlacolula, Oaxaca
6	Semillas	Tlacolula y Mdo. 20 Nov., Oaxaca
1	Masa de nixtamal	Mercado 20 Nov, Oax
7	Totopos y tostadas	Mdo. 20 Nov, Oax y Pochutla, Arroyo Blanco, Oaxaca
2	Tamales	Mdo. 20 Nov, Oaxaca California, EUA
3	Tortillas	Tlacolula, Oaxaca Texas, EUA California, EUA
19	Tlayudas	Atzompa 2, Oaxaca Tlacolula, Oaxaca Mercado 20 Nov, Oax Magda Tlatipac, Oax
2	Grano de maíz enlatado	California, EUA
3	Bebidas y Postres	Tlacolula y Mdo. 20 Nov., Oaxaca
2	Hojas de Maíz (tamal)	Mercado 20 Nov, Oax California, EUA
47	TOTAL	

Tabla No. 6 Clasificación de controles

CONTROL	Promotor 35S	Terminador NOS
Maíz Blanco	-	-
Maíz Criollo Chalqueño	-	-
Bt11 (2%)	+	+
Bt176 (5%)	+	-
MON810 (2%)	+	-
Grano de maíz con Starlink al 0.01%	+	+
Grano de maíz con Starlink al 0.1%	+	+
Grano de maíz con Starlink al 1%	+	+
Grano de maíz con Starlink al 10%	+	+
Tortilla 0.1% *	+	+
Tortilla 1% *	+	+
Tortilla 10% *	+	+
Tortilla frita 0.1% *	+	+
Tortilla frita 1% *	+	+
Tortilla frita 10% *	+	+
Masa frita 0.1% *	+	+
Masa frita 1% *	+	+
Masa frita 10% *	+	+

* Productos elaborados en el laboratorio a partir de la nixtamalización de granos en mezclas controladas empleadas para la publicación del artículo de Quirasco *et al*, 2004.

7.2 Preparación de las Muestras y Controles

Para facilitar la extracción de ADN, las muestras se secaron en un horno marca Yamamoto, modelo DX300 a 50-60 °C/24-72 h. Posteriormente, se molieron en licuadora hasta obtener un polvo fino. Entre molienda y molienda se tuvo la precaución de limpiar el vaso de la licuadora con cloro para evitar la contaminación cruzada entre muestras.

Los controles, tanto negativos como positivos, ya se encontraban molidos y listos para la extracción de ADN.

7.3 Extracción de ADN

7.3.1 Extracción de ADN con el reactivo DNAzol[®] (Invitrogen Life Technologies)

El reactivo DNAzol[®] es útil para extraer ADN genómico de muestras de diverso origen. Está compuesto por una mezcla de guanidina-detergente que permite la lisis celular y la solubilización del ADN que posteriormente se precipita con isopropanol. El método permite la extracción de ADN en un 70-100% del total presente en las muestras. El ADN que se obtiene es de la pureza requerida para realizar reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).

En el Apéndice No. 1 se describe detalladamente el protocolo a seguir.

7.4 Cuantificación de ADN

Con el fin de saber la cantidad de ADN obtenido en cada extracción se realizó la cuantificación espectrofotométrica de los extractos para posteriormente ajustarlos

a una concentración de ADN de 20 ng/μL. En el Apéndice No. 2 se detalla el procedimiento seguido.

7.5 Secuencias de cebadores (*primers*)

7.5.1 Cebadores para la amplificación de un fragmento del gen endógeno RPA-1 (Control positivo de reacción)

Los cebadores RPA-1 y RPA-2 empleados para la detección del gen endógeno RPA-1, que codifica para la proteína de replicación A – 1, amplifican una secuencia de 307 pb de la región 3' del gen de la proteína de replicación A-1 de maíz (Jaimes, 2001).

5'gct ggt ggt ttc aag tcc at 3' (sentido) *Primer* RPA-1 Tm = 60 °C

5'atc cag atc caa aag ttt c 3' (antisentido) *Primer* RPA-2 Tm = 52 °C

Secuencia del fragmento de interés del gen RPA-1 (Jaimes, 2001)

001 gctggtggtt tcaagtccat gtattctgat agagtttttc tgtctcacat
051 cacaagtgat cctgccatgg gccaggaaaa ggtactatcc tgaatattca
101 ctgaaatatg aactgttctg tatotttaat tgaagaattg caaatctgga
151 gaagctccaa ttcgacttctg acttcttggt tttcccttgc agcctgtttt
201 cttcagtttg tatgccacca taagccacat caagcctgac cagaacatgt
251 ggtaccgtgc ttgcaagacc tgcaacaaga aggtgactga aacttttggga
301 tctggat

Fragmento esperado 307 pb

7.5.2 Cebadores para la amplificación de un fragmento del promotor CaMV35S

Los cebadores 35S-F y 35-INV empleados para la detección del promotor del virus del mosaico de la coliflor (p-CaMV35S) amplifican una secuencia de 151 pb dentro del mismo (Luis, 2002).

5' gct cct aca aat gcc atc a 3' (sentido) *Primer* 35S-F T_m = 56 °C

5' cat caa tcc act tgc ttt gaa g 3' (antisentido) *Primer* 35-INV T_m = 62 °C

Secuencia del gen CaMV35S (Luis, 2002)

001 gaattcccat ggagtcaaag attcaaatag aggacctaac agaactcgc
050 cgtaaagact ggcgaacagt tcatacagag tctcttacga ctcaatgac
099 aagaagaaaa tcttcgtcaa catggtggag cacgacacgc ttgtctact
148 ccaaaaatat caaagataca gtctcagaag accaaagggc aattgagac
197 ttttcaacaa aggtaatat ccggaacct cctcggattc cattgccc
246 gctatctgtc actttattgt gaagatagtg gaaaaggaag gtggctcct
295 acaaatgccca tcaattgcgat aaaggaaagg ccatcgttga agatgcctc
344 tgccgacagt ggtcccaaag atggaccccc acccacgagg agcatcgtg
393 gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtg
442 atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac aatcccacta tccttcgca
491 agacccttcc tctatataag gaagttcatt tcatttggag aggacaggg
540 ta

Fragmento esperado 151 pb

7.5.3 Cebadores para la amplificación de un fragmento del evento CBH351 Starlink™

Los cebadores nos1NEST y SL2 se han reportado para la detección del evento CBH351. Amplifican una secuencia de 100 pb que abarca parte del inserto del transgen y la secuencia de ADN de la planta (Windels, 2002).

5' gcg cgg tgt cat cta tgt ta 3' (sentido) Primer nos1NEST Tm = 60 °C

5' aca acg ggg agt tgt atg ct 3' (antisentido) Primer SL2 Tm = 60 °C

Secuencia del evento CBH351 Starlink™ (Windels, 2002)

001 gcgcggtgtc atctatgtta ctagatcgca gatcctctaa **atagactcct**

051 **tttcgggagc gattcatcct tcccgaaacgc agcatacaac tccccgttgt**

101 **actgcgctct tcaagtgtgc**

(Genoma silvestre de la planta)

Fragmento esperado 100 pb

7.5.4 Diseño de cebadores para la amplificación de un fragmento del terminador NOS

Tomando en cuenta los eventos comerciales de maíz, se diseñaron los cebadores para la detección del terminador NOS con el paquete DNASTar, programa PrimerSelect, versión 5.01 (1993-2001); (www.dnastar.com/web/index.php). Este programa ayuda a seleccionar los mejores cebadores para la secuencia blanco y considera: la secuencia del ADN inserto, el tamaño del cebador (20 nucleótidos aproximadamente), el tamaño del amplicón deseado (100-300 pb), la Tm de los

cebadores, la formación de híbridos entre los mismos cebadores, etc. Se eligieron los siguientes cebadores por presentar las mejores características:

5' tgc cgg tct tgc gat gat ta 3' (sentido) *Primer* NOS-DIR T_m = 60 °C

5' gcg cgc tat att ttg ttt tct a 3' (antisentido) *Primer* NOS-INV T_m = 60 °C

Secuencia del terminador NOS (www.ncbi.nlm.nih.gov, AB003142 gi: 3798730)

```
001 gatccccgat cgttcaaaca tttggcaata aagtttctta agattgaatc
051 ctgttgcgcg tcttgcgatg attatcatat aatttctggt gaattacggt
101 aagcatgtaa taattaacat gtaatgcatg acgttattta tgagatgggt
151 ttttatgatt agagtccgc aattatacat ttaatacgcg atagaaaaca
201 aaatatagcg cgcaaaactag gataaattat cgcgcgcggt gtcatctatg
251 ttactagatc ggaattgcc a
```

Fragmento esperado 159 pb

7.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

7.6.1 Polimerasa utilizada en el estudio

La polimerasa que se empleó para realizar las reacciones de PCR fue la Platinum[®] PFX DNA Polymerasa (Invitrogen Life Technologies) y se escogió por las ventajas que le atribuyen sus características: alta fidelidad, alto proceso de síntesis con una rápida capacidad de extensión, alta precisión y especificidad.

Debido a que esta enzima es más eficiente que las utilizadas en los otros trabajos, su uso requirió la optimización de los protocolos reportados, con el fin de hacer las amplificaciones en las condiciones lo más severas posibles para obtener el menor número de amplicones inespecíficos.

7.6.2 PCR para identificar el gen endogeno RPA-1

La búsqueda de condiciones óptimas de reacción se llevó a cabo variando la temperatura de hibridación en el intervalo (54-56 °C), empleando el termociclador Techgene (FTGENE 2D ENGLAND) de acuerdo al siguiente programa:

3 min a 94 °C 1 ciclo

40 s a 94 °C

40 s a 54, 55 y 56 °C

40 s a 68 °C

7 min a 68 °C 1 ciclo

35 ciclos

Tiempo total aproximado: 2h

En cada reacción se incluyó:

- Blanco o control de reactivos (agua filtrada, desionizada, esterilizada en vez de ADN molde).

En todas se empleó de 100 – 200 ng de ADN molde.

Tabla 7. Reactivos empleados para la amplificación por PCR del gen endógeno RPA-1.

REACTIVO	[INICIAL]	[FINAL]	GRADO	MARCA
Amortiguador PCR	10X	2X	B. M.	Invitrogen
MgSO ₄	50 mM	1,1.5 y 2.5 mM	B. M.	Invitrogen
dNTP´s Mix	2.5 mM	0.2 mM	B. M.	Invitrogen

<i>Primer</i> RPA-1	10 μ M	0.5 μ M	B. M.	Invitrogen
<i>Primer</i> RPA-2	10 μ M	0.5 μ M	B. M.	Invitrogen
Taq Pol	2.5 U/ μ L	1.0 U/reacción	B. M.	Invitrogen
ADN molde	20 ng/ μ L	200 ng/reacción		
H ₂ O	c.b.p.	25 μ L		

7.6.3 PCR para identificar el promotor 35S.

La búsqueda de condiciones óptimas de reacción se llevó a cabo variando la temperatura de hibridación en el intervalo (54-56 °C), empleando el termociclador Techgene (FTGENE 2D ENGLAND) de acuerdo al siguiente programa:

3 min a 94 °C 1 ciclo

40 s a 94 °C

40 s a 54, 55 y 56 °C

40 s a 68 °C

7 min a 68 °C 1 ciclo

} 35 ciclos

Tiempo total aproximado: 2 h.

Las pruebas para determinar las condiciones de reacción se realizaron con granos de maíz Starlink™ al 10% como control positivo.

En cada reacción se incluyó:

- Blanco o control de reactivos (agua filtrada, desionizada, esterilizada en vez de ADN molde).

- Control negativo (ADN de maíz no transgénico)
- Control positivo (ADN Starlink™, Bt11, Bt176 y MON810)

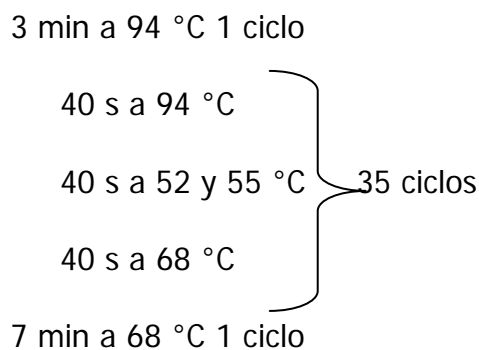
Las reacciones se calcularon para un volumen de 25 µL, y las reacciones empleadas para el análisis de restricción se escalaron a 100 µL. En todas se empleó de 100 – 200 ng de ADN molde.

Tabla 8. Reactivos empleados para la amplificación por PCR del promotor CaMV35S.

REACTIVO	[INICIAL]	[FINAL]	GRADO	MARCA
Amortiguador PCR	10X	2X	B. M.	Invitrogen
MgSO ₄	50 mM	1,1.5 y 2.5 mM	B. M.	Invitrogen
dNTP´s Mix	2.5 mM	0.2 mM	B. M.	Invitrogen
<i>Primer</i> 35S – F	10 µM	0.5 µM	B. M.	Invitrogen
<i>Primer</i> 35 – INV	10 µM	0.5 µM	B. M.	Invitrogen
Taq Pol	2.5 U/µL	1.0 U/reacción	B. M.	Invitrogen
ADN molde	20 ng/µL	200 ng/reacción		
H ₂ O	c.b.p. 25 µL			

7.6.4 PCR para identificar el terminador NOS.

La búsqueda de condiciones óptimas de reacción se llevó a cabo variando la temperatura de hibridación (52 y 55 °C), empleando el termociclador Techgene (FTGENE 2D ENGLAND) de acuerdo al siguiente programa:



Tiempo total aproximado: 2 h.

Las pruebas para determinar las condiciones de reacción se realizaron en granos de maíz Starlink™ al 10% con el objetivo de comprobar que los cebadores diseñados funcionaran.

En cada reacción se incluyó:

- Blanco o control de reactivos (agua filtrada, desionizada, esterilizada en vez de ADN molde).
- Control negativo (ADN de maíz no transgénico, Bt176 y MON810)
- Control positivo (ADN de Starlink™ y Bt11)

Las reacciones se calcularon para un volumen de 25 µL, y las reacciones empleadas para el análisis de restricción se escalaron a 100 µL. En todas se empleó de 100 – 200 ng de ADN molde.

Tabla 9. Reactivos empleados para la amplificación por PCR del terminador NOS.

REACTIVO	[INICIAL]	[FINAL]	GRADO	MARCA
Amortiguador PCR	10X	2X	B. M.	Invitrogen
MgSO ₄	50 mM	1.5 y 2 mM	B. M.	Invitrogen

dNTP´s Mix	2.5 mM	0.2 mM	B. M.	Invitrogen
<i>Primer</i> NOS – DIR	10 µM	0.5 µM	B. M.	Invitrogen
<i>Primer</i> NOS – INV	10 µM	0.5 µM	B. M.	Invitrogen
Taq Pol	2.5 U/µL	1.0 U/reacción	B. M.	Invitrogen
ADN molde	20 ng/µL	200 ng/reacción		
H ₂ O	c.b.p.	25 µL		

7.6.5 PCR para identificar el evento CBH351

La búsqueda de condiciones óptimas de reacción se llevó a cabo variando la temperatura de hibridación en el intervalo (57-58 °C), empleando el termociclador Techgene (FTGENE 2D ENGLAND) de acuerdo al siguiente programa:

3 min a 94 °C 1 ciclo

20 s a 94 °C	}	35 ciclos
30 s a 57 y 58 °C		
60 s a 68 °C		

7 min a 68 °C 1 ciclo

Tiempo total aproximado: 2 h.

Las pruebas para determinar las condiciones de reacción se realizaron en granos de maíz Starlink™ al 10%.

En cada reacción se incluyó:

- Blanco o control de reactivos (agua filtrada, desionizada, esterilizada en vez de ADN molde).
- Control negativo (ADN de maíz no transgénico, Bt11, Bt176 y MON810)
- Control positivo (ADN de Starlink™)

Tabla 10. Reactivos empleados para la amplificación por PCR del evento CBH351.

REACTIVO	[INICIAL]	[FINAL]	GRADO	MARCA
Amortiguador PCR	10X	2X	B. M.	Invitrogen
MgSO ₄	50 mM	1 y 1.5 mM	B. M.	Invitrogen
dNTP´s Mix	2.5 mM	0.2 mM	B. M.	Invitrogen
<i>Primer</i> nos1NEST	10 µM	0.5 µM	B. M.	Invitrogen
<i>Primer</i> SL2	10 µM	0.5 µM	B. M.	Invitrogen
Taq Pol	2.5 U/µL	1.0 U/reacción	B. M.	Invitrogen
ADN molde	20 ng/µL	200 ng/reacción		
H ₂ O	c.b.p. 25 µL			

La Tabla No. 11. describe lo que se espera obtener como resultado de cada una de las amplificaciones con los controles positivos, negativos y muestras.

Tabla 11. Respuesta esperada para las muestras control en las amplificaciones por PCR.

	RPA1	P – 35S	T - NOS	Starlink™
Producto esperado	307 pb	151 pb	159 pb	100 pb
Maíz no transgénico	+	-	-	-
Bt 11	+	+	+	-
Bt 176	+	+	-	-
MON 810	+	+	-	-
Maíz Starlink™	+	+	+	+
Muestras	+	¿?	¿?	¿?

7.6.6 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los productos de la amplificación por PCR se corrieron en geles de agarosa para poder observar posteriormente en un transiluminador de luz UV, las bandas correspondientes a los amplicones para cada cebador probado.

Tabla 12. Reactivos empleados en la electroforesis de ácidos nucleicos.

REACTIVO	COND. USO	GRADO	MARCA
Agarosa	1.5, 2, 2.5 ó 3%	B. M.	Invitrogen
Bromuro de Etidio	1 µg/mL	B. M.	Invitrogen
TAE 10X	1X	B. M.	
Marcador molecular	500 ng/carril	B. M.	Invitrogen

100 y 50 pb

Blue Juice Loading 1X

B. M

Invitrogen

Buffer 10X

En el Apéndice No. 3 se detalla la metodología.

7.7 Purificación de los Productos de PCR

Los productos de la amplificación por PCR se purificaron para realizar posteriormente un análisis con enzimas de restricción y así confirmar la identidad de cada amplicón. Debido a que algunas muestras presentaron bajo rendimiento en la amplificación o amplificación inespecífica, se emplearon dos tipos de metodologías:

7.7.1 Purificación de los amplicones

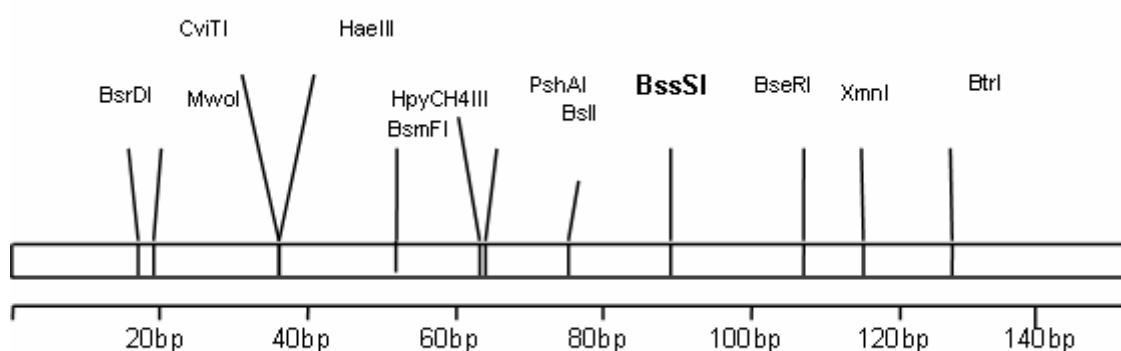
La purificación fue a partir de los productos de la amplificación en geles de agarosa o por adsorción en una membrana de sílica. Los amplicones obtenidos del P – 35S y T – NOS se purificaron mediante el kit GenElute[®] Agarose Spin Columns (SIGMA) y el resto con el kit High Pure PCR Product Purification (Roche). Consultar los Apéndices No. 4 y 5 para las metodologías detalladas de cada uno de los kits.

7.8 Reacción de restricción

Con el propósito de corroborar indirectamente la identidad del fragmento de 151 pb y 159 pb obtenido con la PCR P – 35S y T – NOS, respectivamente, se realizó la digestión enzimática de los amplicones y para lograrlo se procedió de la forma siguiente:

Las secuencias de los fragmentos de 151 pb y 159 pb correspondientes al promotor 35S y al terminador NOS respectivamente, se analizaron en el programa MapDraw™, de la paquetería DNASTar, versión 5.02 (1990-2001), en la que se identificaron los posibles sitios de corte con enzimas de restricción siguientes:

7.8.1 Patrón de Restricción del Fragmento de 151 pb del Promotor 35S.



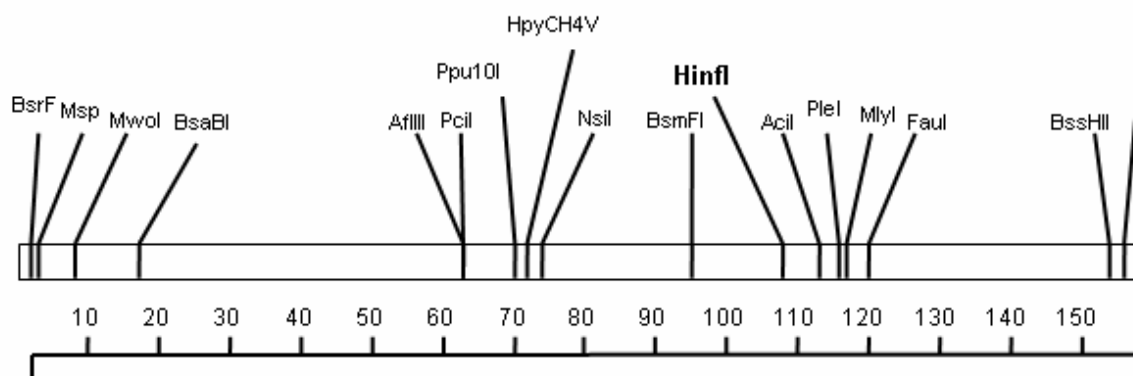
Del diagrama antes presentado se eligió la enzima ***BssSI*** que escinde en la secuencia 5'...C/TCGTG...3' 3'...GAGCA/C...5' y permite obtener dos fragmentos uno de 89 pb y otro de 62 pb.

Tabla 13. Reactivos y condiciones empleadas en la reacción de restricción para el promotor CaMV35S

REACTIVO	[INICIAL]	[FINAL]	GRADO	MARCA
Enzima BssSI	4 U/μL	1 U/reacción	B.M.	New England BioLabs
NEBuffer 3	10 X	1 X	B.M.	New England BioLabs
Agua desionizada	c.b.p. 25 μL		Estéril	
Temp. Incubación	37 °C			

Tiempo total 6 horas

7.8.2 Patrón de Restricción del Fragmento de 159 pb del Terminador NOS



Del diagrama antes presentado se eligió la enzima *Hinf I* que escinde en la secuencia 5'...G/ANTC...3' 3'...CTNA/G...5' y permite obtener dos fragmentos uno de 108 pb y otro de 51 pb.

Tabla 14. Reactivos y condiciones empleadas en la reacción de restricción para el terminador NOS

REACTIVO	[INICIAL]	[FINAL]	GRADO	MARCA
Enzima Hinf I	10 U/μL	1 U/reacción	B.M.	New England BioLabs
REact2	10 X	1 X	B.M.	New England BioLabs
Agua desionizada	c.b.p. 25 μL		Estéril	
Temp. Incubación	37 °C			
Tiempo total	6 horas			

El Apéndice 6 detalla la metodología seguida para este paso.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Extracción de ADN

El método de extracción de ADN empleado fue resultó en extracciones de concentración e integridad de ADN molde aceptable para realizar las reacciones de PCR, ya que estos dos son los factores determinantes para que se lleve a cabo la amplificación. Otro aspecto importante fue el tipo de muestra del que había que extraer el ADN. Se observó que para tener un buen rendimiento en la extracción, las muestras debían estar secas y molidas. Las muestras con alto contenido de grasa (como los tamales y tortillas fritas) presentaron una fase oleosa que se eliminó durante el proceso de la extracción para evitar bajos rendimientos. Las hojas de tamal tuvieron que ser molidas con N₂ líquido para disminuir lo más posible el tamaño de partícula, sin embargo presentaron un bajo cociente de A_{260}/A_{280} , lo que puede indicar una preparación que todavía contiene proteína y que podría repercutir en una baja eficiencia de amplificación. El tejate (bebida) se centrifugó y del paquete obtenido se extrajo el ADN.

La Tabla No. 15 muestra los valores promedio de A_{260}/A_{280} y [ADN] que se obtuvieron en este estudio.

Por ser éste un paso crítico para la reacción de PCR, hoy en día se pretende establecer protocolos certificados de extracción de ADN de alimentos, sólo que estos esfuerzos no han tenido gran éxito para establecer un protocolo único por los diferentes tipos de alimentos y productos que existen (Holst-Jensen, 2003).

Tabla No. 15 Valores del cociente de A_{260}/A_{280} y [ADN] de las muestras y controles analizados en este estudio

Muestras	A260/A280	[ADN] ng/μL
Harina de Maíz	1.79	52.8
Harina de Maíz Amarillo	1.89	67.9
Grano Naranja	1.96	116.8
Grano Azul	1.98	117.0
Grano Amarillo	1.77	76.4
Grano Pozolero	1.79	75.3
Tejate (Bebida)	1.97	71.2
Tamales	1.79	94.7
Masa de nixtamal	1.83	82.2
Nicuatole (postre)	1.95	113.7
Totopos	1.84	80.0
Tlayudas blancas	1.87	72.1
Tlayudas cafes	1.77	99.0
Tlayudas amarillas	1.91	79.0
Tlayudas azules	1.84	93.4
Tortilla blanca	1.68	103.1
Tortilla amarilla (EUA)	1.81	82.2
Tortilla blanca (EUA)	1.79	97.0
Tamales (EUA)	1.70	95.8
Maíz enlatado	1.57	135.6
Hojas de Maíz	1.39	132.2
Tostadas	1.86	89.4
Controles		
Grano no transgénico	1.93	86.1
Bt 11 (2%)	1.73	103.2

Bt 176 (5%)	2.03	86.0
MON 810 (2%)	2.04	67.5
Grano de maíz Starlink™ al 10%	1.88	96.1
Tortilla 10%	1.90	122.4
Tortilla frita 10%	1.85	113.3
Masa frita 10%	1.80	96.4

8.2 Amplificación para Gen Endógeno RPA-1

El gen endógeno de maíz, RPA – 1, que codifica para la proteína de replicación A – 1 se empleó como control positivo de reacción de PCR debido a que se encuentra en bajo número de copias; al igual que el P – 35S y el T – NOS en las plantas modificadas genéticamente. Si se obtiene amplificación para el gen RPA – 1 en el maíz, entonces la reacción de PCR funcionaría para amplificar genes presentes dentro del genoma que se encuentran en bajo número de copias. Adicionalmente, si hay amplificación de este gen significa que la integridad y pureza del ADN es la adecuada para hacer las reacciones de PCR; además indicaría que la enzima (Pfx polimerasa) está activa.

Para la amplificación de este gen se emplearon los cebadores RPA-1 y RPA-2 que flanquean un fragmento de 307 pb (Jaimes, 2001). En la Figura No. 1 se presentan los productos de amplificación obtenidos de acuerdo a las condiciones reportadas por Luis (2002). Las bandas del peso molecular esperado se mostraron en forma abundante y de alta brillantez pero se obtuvieron más amplicones además del esperado, probablemente, debido a que la polimerasa utilizada en este

estudio tiene una mayor eficiencia y se evidencia la importancia de optimizar condiciones.

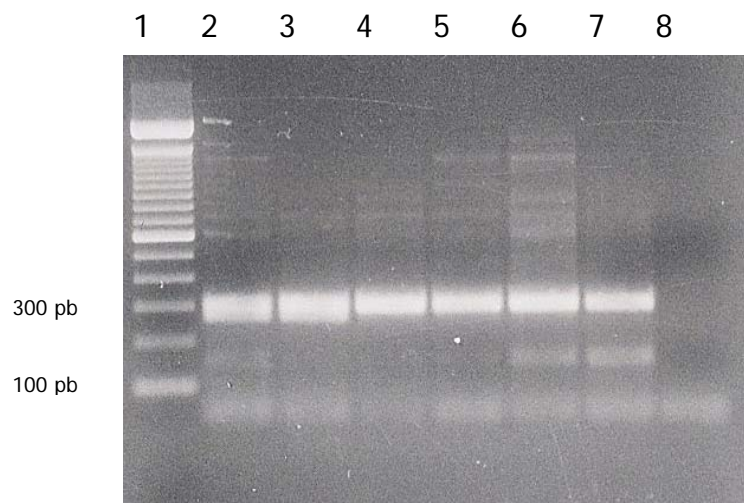


Figura No. 1 Análisis de los productos de la amplificación del gen endógeno RPA-1 en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 100pb (1), Maíz Blanco (2 y 3), Maíz Criollo Chalqueño (4, 5 y 6), Harina certificada Bt11 2% (7) y Blanco de Reactivos (8). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

La reacción se optimizó según las condiciones mencionadas en el apartado 7.6.2 y la Tabla 7. Como condiciones óptimas se establecieron 1 mM $[MgSO_4]$ y 56 °C de temperatura de hibridación.

De acuerdo a lo reportado por Quirasco *et al* (2004), el ADN de los extractos de productos nixtamalizados se encuentra degradado como consecuencia del proceso al que fueron sometidos, sin embargo es posible utilizarlo como molde para llevar a cabo la amplificación (Figuran No. 2).

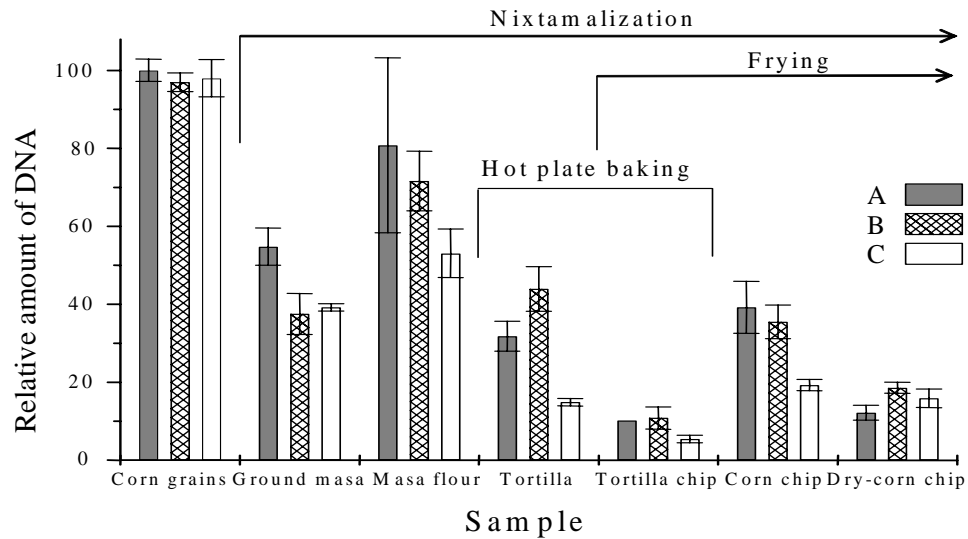


Figura No. 2 Diagrama que muestra lo obtenido en las amplificaciones por PCR del gen endógeno de referencia utilizado en el trabajo a lo largo de todo el procesamiento de maíz. Abcisa: Muestras de las diferentes etapas del proceso del maíz para 0.1% (A), 1% (B) y, 10% (C) de Starlink™. Ordenadas: Concentraciones relativas detectadas de ADN por PCR tiempo real. (Quirasco *et al*, 2004)

Según se muestra en la Figura No. 2, es posible emplear ADN de tortillas fritas como molde para realizar la reacción de PCR y obtener amplificación (Quirasco *et al*, 2004).

El análisis electroforético de los productos de la amplificación del fragmento del gen endógeno por PCR a las condiciones óptimas encontradas, se presenta en las figuras 3 y 4:

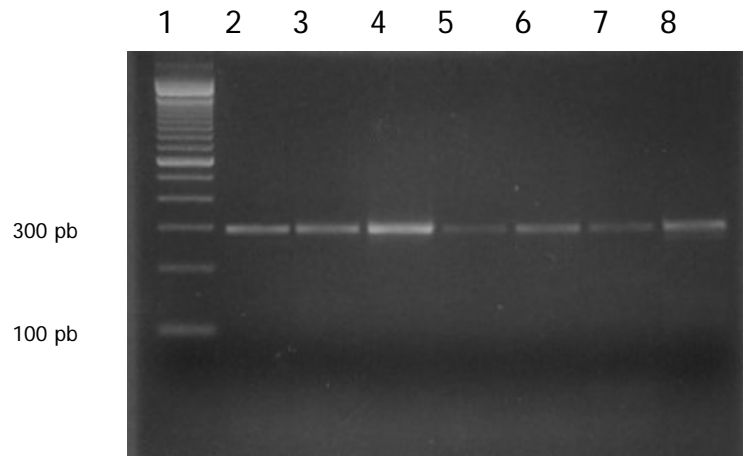


Figura No. 3 Análisis de los productos de la amplificación del gen endógeno RPA-1 en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 100pb (1), Grano Amarillo de Oaxaca (2), Grano Azul de Oaxaca (3), Grano Azul de Puebla (4), Grano Amarillo Paja de Oaxaca (5), Tortilla de E.U.A (6), Tostada de Maíz Criollo de Oaxaca (7) y Tostada de Maíz Amarillo de Oaxaca (8). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

En la Figura No. 3, el fragmento de gen RPA – 1 de 307 pb se amplificó para cada una de las muestras. Se observa que la banda de amplificación cambia de intensidad dependiendo de la muestra que se trate; cabe mencionar que en todos los casos se utilizaron 200 ng de ADN molde en la reacción. Los amplicones obtenidos a partir de granos de maíz son mucho más intensos que las bandas obtenidas a partir de las tortillas y de las tostadas, como consecuencia del grado de procesamiento al que se sometieron las muestras, corroborando así que la integridad del ADN es un factor que afecta la amplificación. Este mismo efecto fue observado y analizado cuantitativamente por PCR en tiempo real por Quirasco *et al*, (2004).

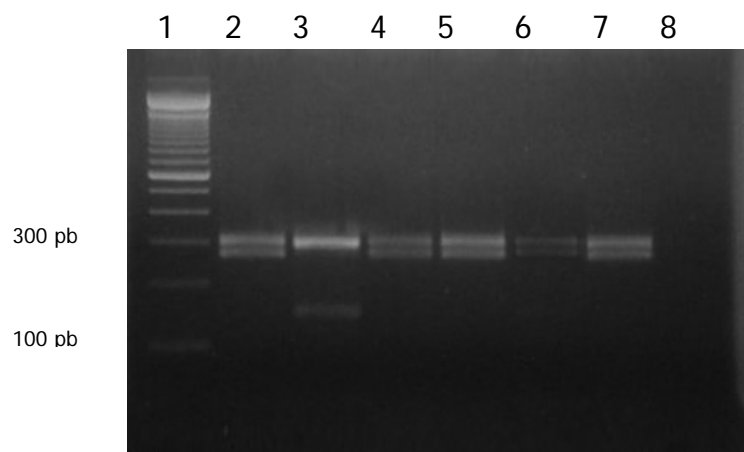


Figura No. 4 Análisis de los productos de la amplificación del gen endógeno RPA-1 en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 100pb (1), Maíz Blanco (2), Maíz Criollo Chalqueño (3), Grano Starlink al 1% (4), Tortilla con Starlink al 1% (5), Tortilla Frita con Starlink al 1% (6), Masa Frita con Starlink al 1% (7) y Blanco de Reactivos (8) . Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

En la Figura No. 4 se observa, de igual forma, la banda esperada de 307 pb y la diferencia de intensidades por el tipo de procesamiento al que fue sometida cada muestra. Adicionalmente, se observa una banda menor a 300 pb en todas las muestras que contienen maíz blanco. Es importante hacer notar que las diluciones de maíz Starlink™ se hicieron con el mismo tipo de maíz blanco en todos los casos. El doble bandeo que presentan las muestras de maíz blanco podría indicar, entre otras cosas, la presencia de un pseudogen de RPA – 1. Un pseudogen es un gen que deja de ser funcional pero continúa presente en el genoma, es decir, que puede contener una o varias mutaciones. Como el gen está representado varias veces en el genoma, la mutación presente en alguna de las copias no afectó la supervivencia del organismo. Subsecuentemente, pudieron ocurrir mutaciones adicionales que se fueron acumulando en el mismo gen, originando a la secuencia

denominada pseudogen (Watson, 1992). Otras posibles causas del doble bandeo podrían indicar la presencia de un gen activo en una segunda copia o una microheterogeneidad; pero para comprobar lo anterior se tendría que hacer una secuenciación del fragmento y así corroborar su identidad. Así mismo, en la Figura No. 4 en el carril 3 se observa también una segunda banda (~ 150 pb) que podría deberse a lo mencionado anteriormente y ser característica del maíz criollo Chalqueño analizado.

A partir de casi todas las muestras analizadas se obtuvo el fragmento de 307 pb correspondientes al gen RPA – 1. Esto indica además que por el proceso de extracción con DNAzol™ (Invitrogen) se obtiene ADN en cantidad y calidad suficiente para lograr la amplificación del fragmento deseado; sin embargo, en dos muestras (hoja de maíz y tamal verde) no hubo amplificación. Estas muestras fueron sometidas a otra extracción con cloroformo seguida de precipitación con etanol; no obstante, no se logró amplificar el fragmento deseado (estos datos no se presentan dado que no se observó nada en las fotos). Probablemente, esto se debió a la presencia de inhibidores en la reacción por lo que hubiera sido necesario otro método de purificación de ADN, ya que éste resultó no ser el adecuado para este tipo de muestras, por ejemplo, los basados en la interacción de ADN con una membrana de sílica.

8.3 Amplificación, Purificación y Análisis de Restricción de P – 35S.

8.3.1 Optimización de condiciones de reacción de amplificación.

El promotor 35S (virus del mosaico de la coliflor) es un elemento usual en las construcciones empleadas para la manipulación genética de organismos vivos como por ejemplo el maíz transgénico. Por lo que, las muestras en las que se obtenga el producto de amplificación de 151 pb, probablemente, contengan ADN foráneo correspondiente al promotor 35S.

La amplificación del P – 35S se llevó a cabo con los cebadores 35 – SF y 35 – INV que flanquean un fragmento de 151 pb, diseñados por Luis (2002). Se siguió el protocolo de PCR reportado, sin embargo, se obtuvieron varios amplicones por lo que hubo que modificarlo, dado que se empleó una polimerasa diferente a la utilizada por Luis (2002).

La búsqueda de nuevas condiciones de amplificación se inició según las condiciones mencionadas en la Tabla 8 variando la temperatura de hibridación entre 54 – 56 °C y la concentración de MgSO₄ entre 1 – 2.5 mM. Para esta reacción se obtuvo un fragmento único de 151 pb a T_h de 56°C / 1 mM [MgSO₄] con el protocolo de amplificación descrito en la sección 7.6.3.

El análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR del promotor 35S se presentan en las siguientes figuras:

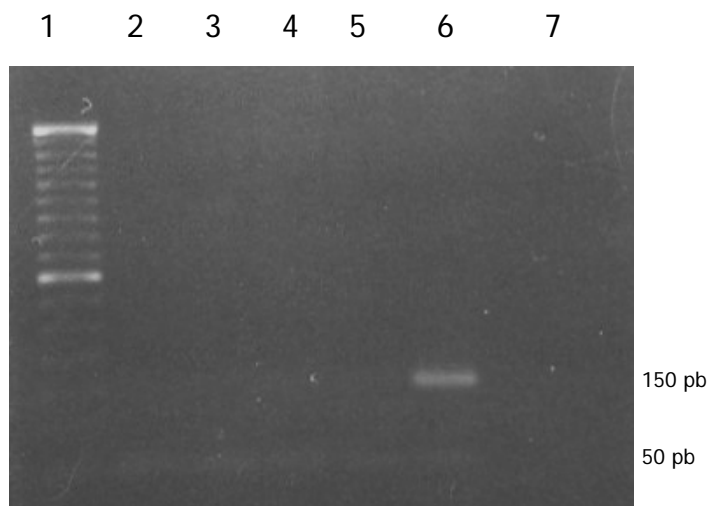


Figura No. 5 Análisis de los productos de la amplificación del Promotor 35S en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Maíz Blanco (2 y 3), Maíz Criollo Chalqueño (4 y 5), Grano Starlink al 10% (6) y Blanco de Reactivos (7). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

En la Figura No. 5 se observa la especificidad del par de cebadores diseñados y las condiciones óptimas encontradas para detectar el P – 35S, propio de ciertas construcciones transgénicas. El fragmento de 151 pb se presentó sólo para las muestras de maíz Starlink al 10% y no para las demás muestras que no poseen esta secuencia y son, en este caso, los controles negativos para la reacción de amplificación.

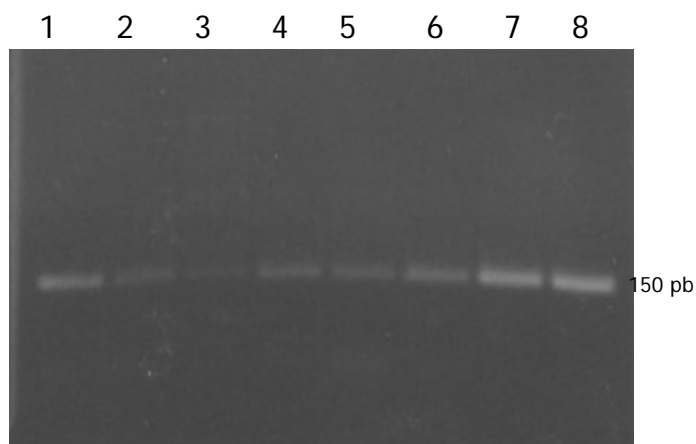


Figura No. 6 Análisis de los productos de la amplificación del Promotor 35S en un gel de agarosa (2%): Grano Starlink 1% (1 y 2), Tortilla Starlink 0.1% (3 y 4), Tortilla Starlink 1% (5 y 6), Tortilla Starlink 10% (7 y 8). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

En la Figura No. 6 se observa la amplificación de P – 35S para diferentes concentraciones de Starlink en un mismo producto, tortilla. Lo que se aprecia en esta foto es la intensidad de la banda, que cambia proporcionalmente con el aumento de la concentración de transgénico en la muestra.

Cabe resaltar que la banda de 151 pb que se visualiza es el único producto de la amplificación.

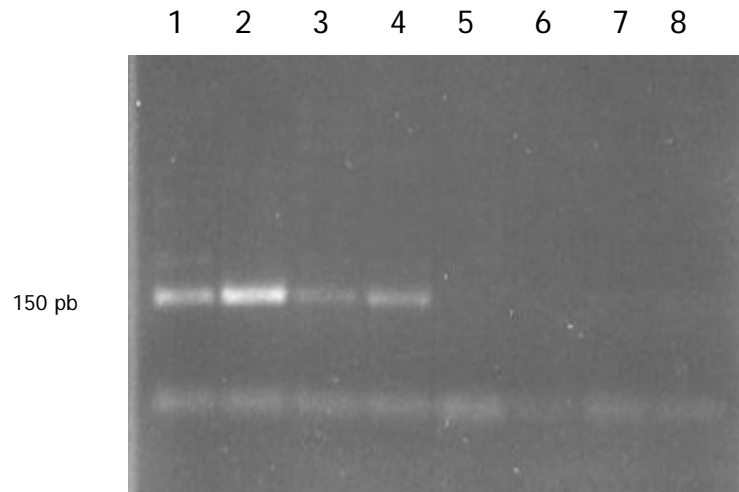


Figura No. 7 Análisis de los productos de la amplificación del Promotor 35S en un gel de agarosa (2%): Harina Certificada Bt11 2% (1), Harina Certificada Bt176 5% (2), Harina Certificada MON810 2% (3 y 4), Maíz Grano Starlink 0.01% (5 y 6), Maíz Grano Starlink 0.1% (7 y 8). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

Como se muestra en la Tabla No. 11, Respuesta esperada para las muestras control en las amplificaciones por PCR, el P – 35S se detecta en las harinas certificadas de diferentes eventos transgénicos, siendo estos controles positivos para la detección de P – 35S en Bt11, Bt176, MON 810 y Starlink (Figura No. 7). Cabe destacar, que a pesar de que por PCR punto final es difícil observar en gel el amplicón obtenido a partir de ADN de grano Starlink™ al 0.1%, en PCR tiempo real sí es posible cuantificarlo (Quirasco *et al*, 2004), lo que corrobora la utilidad de la metodología cuantitativa.

8.3.2 Análisis de Muestras

Del total de las 47 muestras analizadas, 36 presentaron el fragmento esperado de 151 pb del P-35S dentro de las que se encuentran granos de maíz, tlayudas tortillas, etc., del Estado de Oaxaca y E.U.A. En la Figura No. 8, se muestran ejemplos representativos de estos productos, se incluye un control negativo, maíz crillo Chalqueño (carril 5). En la Tabla No. 16 se muestran los resultados de las muestras analizadas.

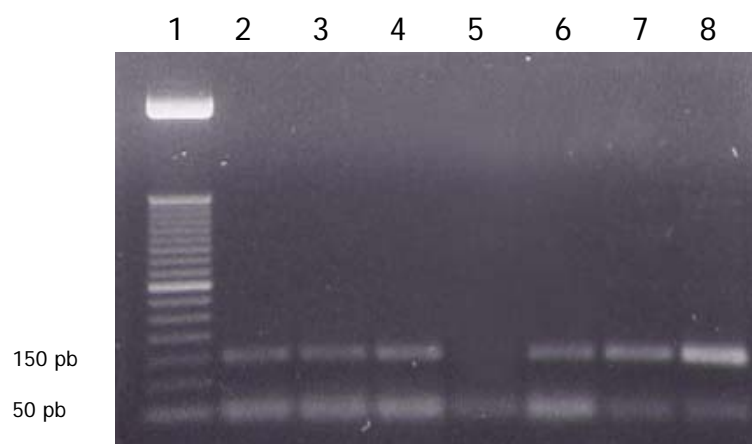


Figura No. 8 Análisis de los productos de la amplificación del Promotor 35S en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Tlayuda de maíz café/gris de Tlacolula Oaxaca (2), Tlayuda de maíz amarillo de Tlacolula Oaxaca (3 y 4), Maíz Criollo Chalqueño (5), Tortillas marca "Mission" – Gruma de maíz amarillo de Irving Texas (6), Tortilla Starlink 1% (7), Tortilla Starlink 10% (8) . Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

8.3.2.1 Purificación

De las muestras que resultaron positivas para la detección de P – 35S, se escogieron 14 al azar para purificar y realizar los análisis de restricción para corroborar la identidad del P – 35S de acuerdo a lo descrito en la sección de

Materiales y Métodos. Se verificó la pureza de los amplicones en gel de agarosa previo a la reacción de restricción. En las Figuras No. 9 y 10 se observa la pureza de las preparaciones de ADN previa al análisis de restricción.

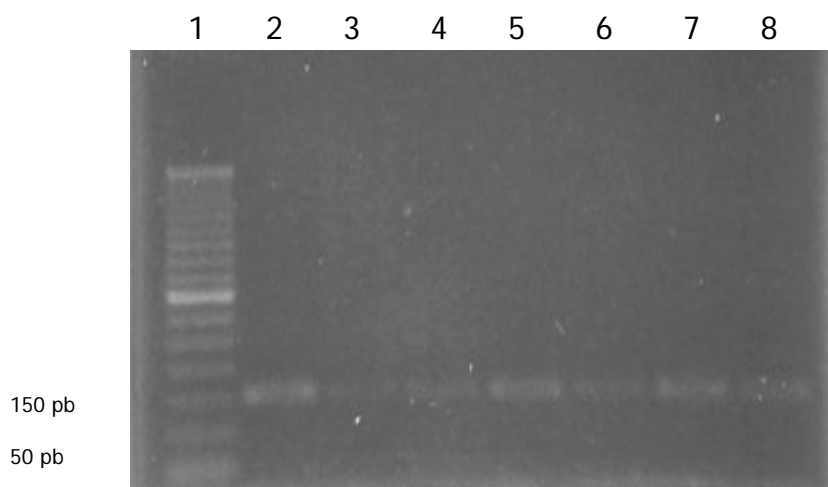


Figura No. 9 Purificados de los productos de la amplificación del Promotor 35S en un gel de agarosa (2.5%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Harina de Maíz Tlacolula Oaxaca (2), Grano azul/verde Oaxaca (3), Tejate de Tlacolula Oaxaca (4), Tamal de Oaxaca (5), Masa de nixtamal de Oaxaca (6), Nicuatole de Oaxaca (7), Totopos marca "La Confianza" de Oaxaca (8). Se cargaron 5 μ L de cada muestra.

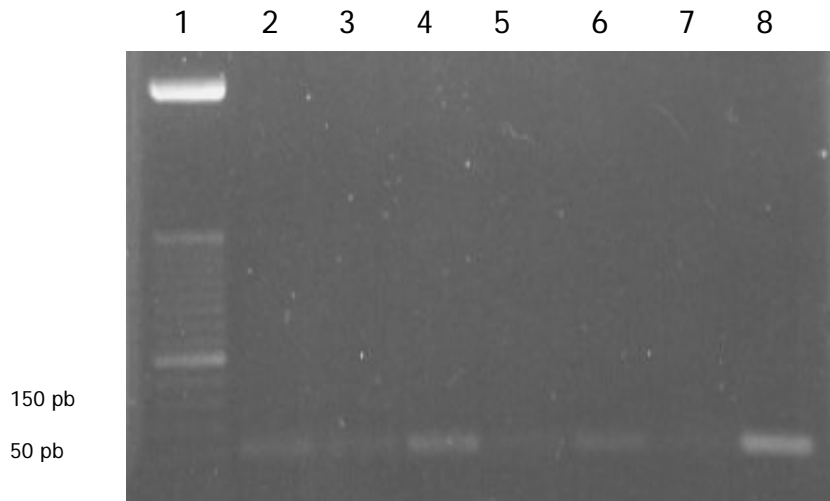


Figura No. 10 Purificados de los productos de la amplificación del Promotor 35S en un gel de agarosa (2.5%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Tlayuda blanca de Atzompa 2 Oaxaca (2), Tlayuda de maíz café/gris de Tlacolula Oaxaca (3), Tlayuda de maíz amarillo de Tlacolula Oaxaca (4), Tlayuda de maíz blanco de Oaxaca (5), Tlayuda verde/azul de Oaxaca (6), Tortillas marca "Mission" – Gruma de maíz amarillo de Irving Texas (7), Maíz Starlink 10% (8) . Se cargaron 5 μ L de cada muestra.

8.3.2.2 Pruebas Confirmativas, Análisis de Restricción

Los productos de amplificación del P – 35S purificados se sometieron a la acción del enzima *BssSI* durante 2 horas a 37°C según el protocolo descrito en la metodología. Sin embargo, no hubo hidrólisis significativa por lo que se incubaron 4 horas adicionales (tiempo total de incubación: 6 horas).

La enzima *BssSI* utilizada en la reacción de restricción escinde en la secuencia 5'...C/ACGAG...3' 3'...GTGCT/C...5' , generando dos fragmentos, uno de 89 pb y otro de 62 pb.

El análisis electroforético de los productos de restricción de la reacción de PCR del promotor 35S se presentan a continuación:

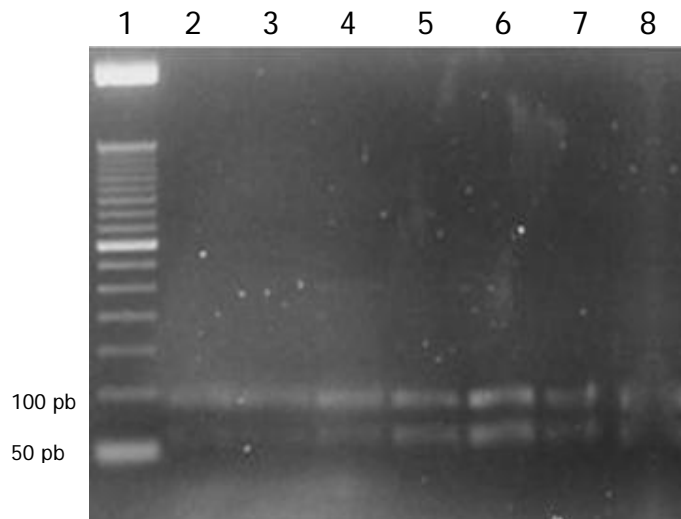


Figura No. 11 Análisis de restricción, con la enzima *BssSI*, de los productos de la amplificación del Promotor 35S en un gel de agarosa (2.5%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Harina de maíz de Tlacolula Oaxaca (2), Grano azul/verde Oaxaca (3), Tejate de Tlacolula Oaxaca (4), Masa de nixtamal de Oaxaca (5), Totopos marca "La Confianza" de Oaxaca (6), Tlayudas blancas de Atzompa 2 Oaxaca (7), Tlayudas café/gris de Tlacolula Oaxaca (8). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

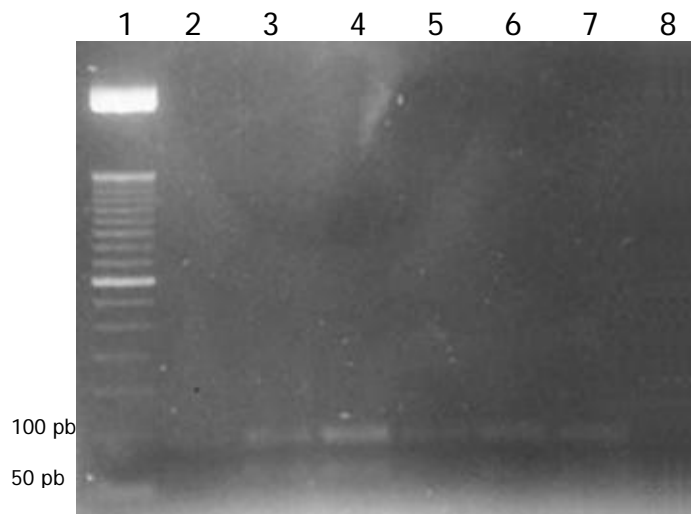


Figura No. 12 Análisis de restricción, con la enzima *BssSI*, de los productos de la amplificación del Promotor 35S en un gel de agarosa (2.5%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Tlayuda de maíz amarillo de Tlacolula Oaxaca (2), Tlayuda de maíz blanco de Oaxaca (3), Tlayuda de maíz verde/azul de Oaxaca (4), Tortillas marca "Mission - Gruma" de Irving Texas (5), Maíz Grano Starlink al 10% (6), Tortilla Starlink 10% (7), Maíz Cacahuacintle de Tlacolula Oaxaca (8). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

En las Figuras No. 11 y No. 12 se observa que de las 14 muestras analizadas, 13 presentaron las bandas esperadas, a excepción del maíz cacahuacintle de Tlacolula, Oaxaca. Esto corrobora la identidad del fragmento de 151 pb para P – 35S. Para tener un comparativo más claro, la Figura No. 13 muestra el producto de la amplificación puro y el resultado del análisis de restricción para las muestras de tejate de Tlacolula, Oaxaca (bebida similar al pozol) y Grano Azul/Verde del Mercado 20 Noviembre de Oaxaca:

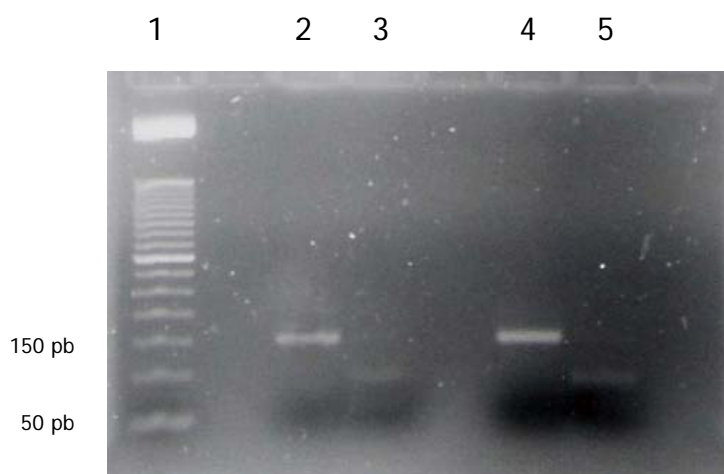


Figura No. 13 Análisis de los productos de amplificación del Promotor 35S y su respectiva reacción de restricción con la enzima *BssSI* en un gel de agarosa (2.5%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Grano Azul/Verde de Oaxaca (2 y 3), Tejate de Tlacolula Oaxaca (4 y 5). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

Los resultados anteriores, resaltando sobre todo lo obtenido para el grano azul de Oaxaca, indicarían la posible presencia de maíz transgénico en muestras propias de este estado, aunque para corroborar este hecho se deben secuenciar los amplicones para el P – 35S o hacer un Southern Blot.

Tabla No. 16 Muestras que resultaron positivas para P – 35S

No. Muestras	Tipo de Muestra	Muestras (+) PCR P – 35S	No. Muestras Anal. Restricción	Muestras (+) Anal. Restricción	Lugar de Origen
2	Harinas de maíz	2	1	1	<ul style="list-style-type: none"> • Tlacolula, Oaxaca
6	Semillas	6	2	1	<ul style="list-style-type: none"> • Tlacolula, Oaxaca • Mdo. 20 Nov., Oaxaca
1	Masa de nixtamal	1	1	1	<ul style="list-style-type: none"> • Mercado 20 Nov, Oaxaca
7	Totopos y tostadas	3	1	1	<ul style="list-style-type: none"> • Mdo. 20 Nov, Oaxaca • Pochutla, Oaxaca • Arroyo Blanco, Oaxaca
2	Tamales	2	1	1	<ul style="list-style-type: none"> • Mdo. 20 Nov, Oaxaca • California, EUA
3	Tortillas	3	1	1	<ul style="list-style-type: none"> • Tlacolula, Oaxaca • Texas, EUA • California, EUA
19	Tlayudas	15	5	5	<ul style="list-style-type: none"> • Atzompa 2, Oaxaca

					<ul style="list-style-type: none"> • Tlacolula, Oaxaca • Mercado 20 Nov, Oax • Magda Tlatipac, Oax
2	Grano de maíz enlatado	-	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • California, EUA
3	Bebidas y Postres	3	2	2	<ul style="list-style-type: none"> • Tlacolula, Oaxaca • Mdo. 20 Nov., Oaxaca
2	Hojas de Maíz (tamal)	1	-	-	<ul style="list-style-type: none"> • Mercado 20 Nov, Oax • California, EUA
47	TOTAL	36	14	13	TOTAL

La tabla muestra los resultados obtenidos para la detección del P – 35S, el número de muestras escogidas para hacerles el análisis de restricción con la enzima *BssSI* y, el número de muestras que obtuvieron las bandas esperadas para el análisis de restricción.

La Tabla No. 16 muestra en forma resumida los resultados obtenidos para el P – 35S tanto en la reacción de PCR como en el análisis de restricción en todas las muestras analizadas dentro del estudio, destacando el lugar de origen de cada muestra. Como se menciona anteriormente, 13 muestras analizadas con la enzima *BssSI* presentan las bandas esperadas.

8.4 Amplificación y Análisis de Restricción de T – NOS.

8.4.1 Optimización de condiciones de amplificación

Otro elemento usual en las construcciones genéticas empleadas para modificar la composición genética de plantas es el terminador NOS (nopalino sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*).

Para la amplificación del T – NOS se emplearon los cebadores NOS – DIR y NOS – INV, diseñados en este trabajo, que flanquean un fragmento de 159 pb. Por lo tanto, las muestras en las que se obtenga el producto de amplificación esperado (159 pb) es probable que contengan ADN foráneo correspondiente al terminador NOS.

La búsqueda de condiciones optimas de amplificación se inició según las condiciones mencionadas en la Tabla 9 variando la temperatura de hibridación entre 52 y 55 °C y la concentración de MgSO₄ entre 1.5 – 2 mM, empleando ADN genómico de maíz Starlink™ como molde. Para esta reacción se obtuvo un

fragmento único de 159 pb a T_h de 55°C / 1 mM [MgSO₄] con el protocolo de amplificación descrito en el apartado 7.6.4.

El análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR del terminador NOS se presentan en la Figura 14:

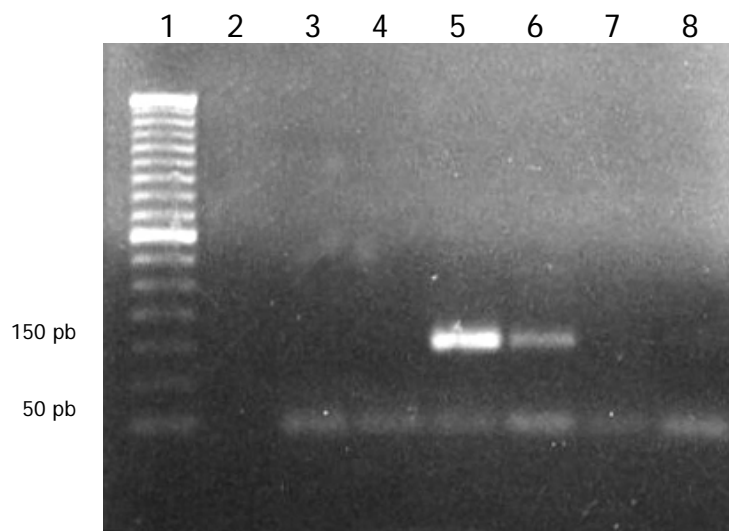


Figura No. 14 Análisis los productos de la amplificación del Terminador NOS en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Blanco de reactivos (2), Maíz Criollo Chalqueño (3), Maíz Blanco (4), Maíz Starlink 10% (5), Harina certificada Bt11 2% (6), Harina certificada Bt176 5% (7), Harina certificada MON810 2% (8). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

En esta figura se observa la especificidad del par de cebadores diseñados y las condiciones óptimas de reacción encontradas. Estos detectan el T – NOS propio de algunos eventos transgénicos que se comercializan principalmente en E.U.A. El fragmento de 159 pb se presenta, como se observa, en muestras de Starlink al 10% y en la harina certificada del evento Bt11 2%. En los demás casos se corroboró, al no obtener amplificación, que las muestras no presentan dentro su

ADN el fragmento de T – NOS, siendo estos controles negativos para esta reacción de amplificación.

8.4.2 Análisis de Muestras

La Figura No. 15 muestra el resultado de la amplificación para T – NOS en diferentes muestras de maíz incluyendo controles positivos de reacción. Sólo se observa la banda de 159 pb en los controles positivos (Carriles 7 y 8). Se muestra la foto en negativo para visualizar mejor las bandas obtenidas.

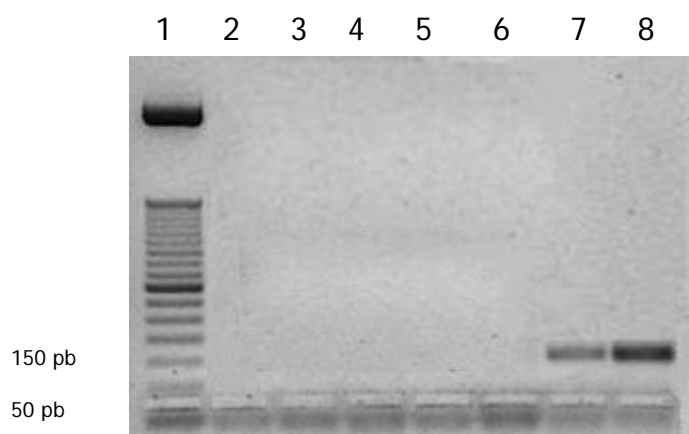


Figura No. 15 Análisis los productos de la amplificación del Terminador NOS en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Tlayuda blanca de Atzompa 2 Oaxaca (2), Tejate de Tlacolula Oaxaca (3), Tamal de Oaxaca (4), Hoja de Maíz de Tamal de Oaxaca (5), Tostada de Maíz amarillo Hanoni (6), Tortilla Starlink 1% (7), Tortilla Starlink 10% (8). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

Aún así, se corrió un duplicado de la reacción de PCR para dos muestras de maíz (Tejate de Tlacolula, Oaxaca y Tamal de Oaxaca) que se consideraron que probablemente pudieran producir el fragmento de 159 pb.

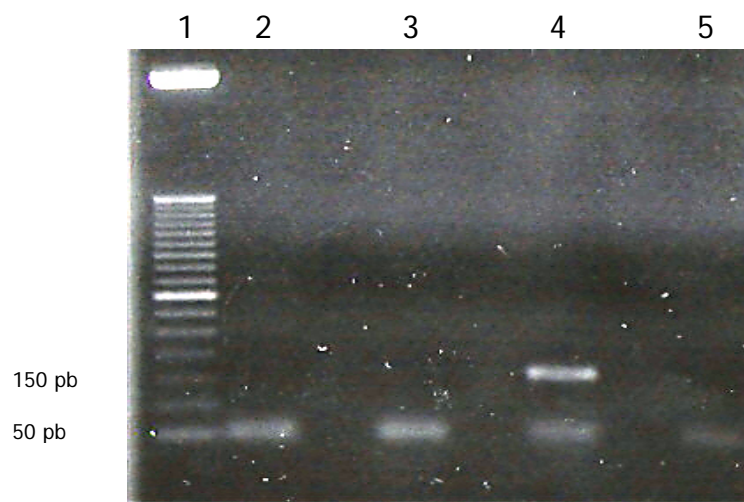


Figura No. 16 Análisis los productos de la amplificación del Terminador NOS en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Tejate de Tlacolula Oaxaca (2), Tamal de Oaxaca (3), Tortilla Starlink 10% (4), Blanco de reactivos (5). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

Usando las mismas condiciones antes empleadas se obtuvo el mismo resultado anterior, no hubo amplificación por lo que se descartó la posibilidad de que el T – NOS estuviera presente en las muestras de Oaxaca (Figura No. 16).

Aún así, utilizando los amplicones que se purificaron para la reacción de restricción del T – NOS con muestras transgénicas (Starlink al 10%) se realizaron las reacciones de restricción con la enzima *HinfI* (6 horas / 37 °C) para el fragmento de 159 pb del T – NOS y confirmar la especificidad de los cebadores diseñados.

La enzima *Hinf I* que escinde en la secuencia 5'...G/ANTC...3' 3'...CTNA/G...5' permite obtener dos fragmentos uno de 108 pb y otro de 51 pb.

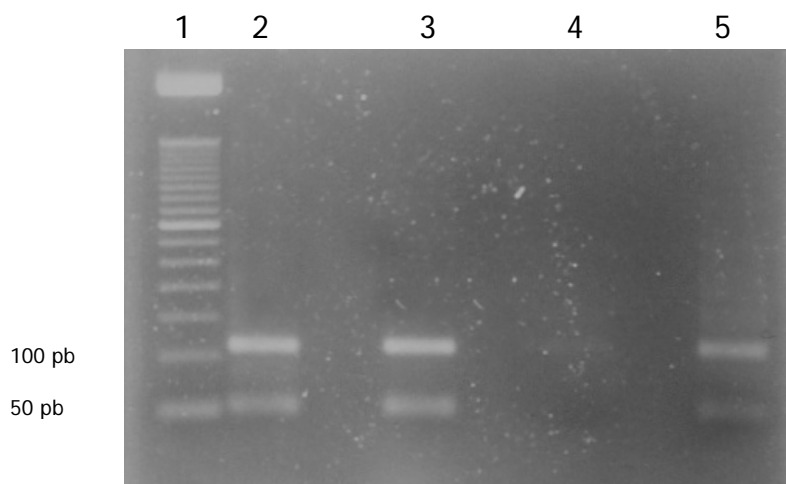


Figura No. 17 Análisis de restricción de los productos de la amplificación del Terminador NOS en un gel de agarosa (2.5%): Marcador de peso molecular 50pb (1), Maíz Starlink al 10% (2), Tortilla Starlink al 10% (3), Tortilla frita Starlink al 10% (4), Masa frita Starlink al 10% (5). Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

La Figura No. 17 muestra los fragmentos de 108 pb y 51 pb esperados para esta reacción, corroborando así el buen diseño de los cebadores para el T – NOS.

8.5 Amplificación para identificar el evento CBH351

Debido a que ninguna de las muestras analizadas presentó el P – 35S y el T – NOS conjuntamente, se puede inferir que ninguna de ellas correspondería al evento CBH351. Sin embargo, era de interés verificar que es posible identificar el gen *cry9C* del evento CBH-351 (Starlink™) en las mezclas de granos y productos de maíz (al 10%, 1% y 0.1%) hechas en el laboratorio, con esa variedad de grano transgénico, por lo que se utilizaron tortillas, tortilla frita y masa frita para ensayar la especificidad de los cebadores reportados por Windels (2002).

Se eligió este evento como sistema de análisis debido a que posee un transgen que codifica para una proteína que por sus propiedades bioquímicas se ha considerado potencialmente alergénica, por lo que el evento comercial sólo ha sido aprobado para consumo animal (AgBios, 2005).

Utilizando los cebadores reportados por Windels en el 2002, la búsqueda de condiciones óptimas de reacción se llevó a cabo variando la temperatura de hibridación en el intervalo (57-58 °C), empleando el termociclador Techgene (FTGENE 2D ENGLAND). Se encontró como condiciones óptimas T_h 57°C / 1 mM [MgSO₄] con el protocolo de amplificación descrito en el apartado 7.6.5 para amplificar el fragmento de 100pb.

El análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR del gen *cry9C* se presenta a continuación:

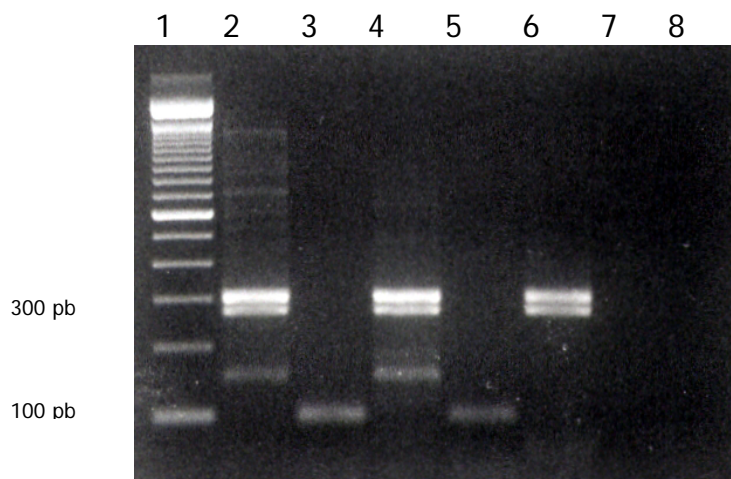


Figura No. 18 Análisis de los productos de la amplificación del gen endógeno RPA – 1 y el gen *cry9C* en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 100pb (1), Grano Starlink al 1% (2 y 3), Tortilla Starlink al 1% (4 y 5), Maíz Blanco (6 y 7), Blanco de reactivos de amplificación RPA – 1 (8). Carriles pares: gen RPA – 1, carriles nones: gen *cry9C*. Se cargaron 8 µL de cada muestra.

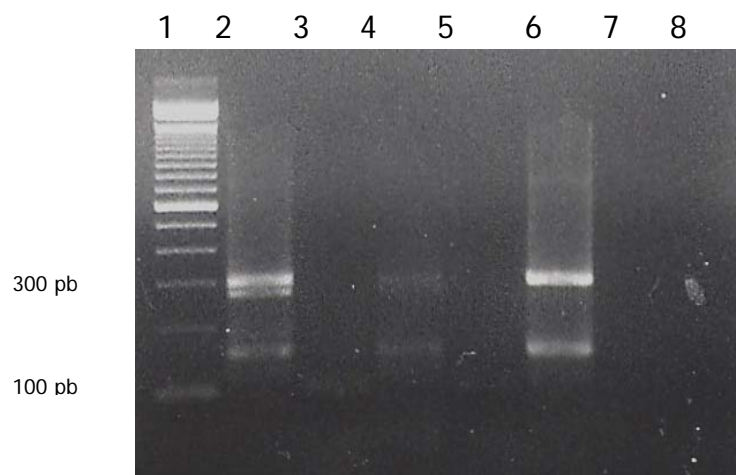


Figura No. 19 Análisis de los productos de la amplificación del gen endógeno RPA – 1 y el gen *cry9C* en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 100pb (1), Masa frita Starlink al 1% (2 y 3), Tortilla frita Starlink al 1% (4 y 5), Harina certificada Bt176 5% (6 y 7), Blanco de reactivos de amplificación *cry9C* (8). Carriles pares: gen RPA – 1, carriles nones: gen *cry9C*. Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

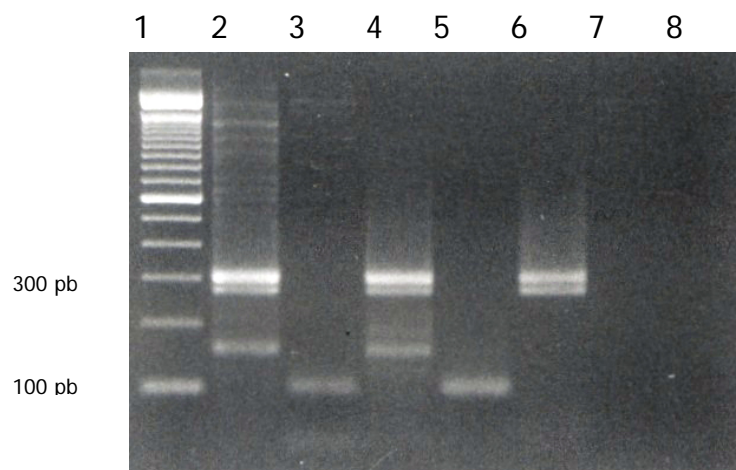


Figura No. 20 Análisis de los productos de la amplificación del gen endógeno RPA – 1 y el gen *cry9C* en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 100pb (1), Grano Starlink al 10% (2 y 3), Tortilla Starlink al 10% (4 y 5), Maíz Blanco (6 y 7), Blanco de reactivos de amplificación RPA – 1 (8). Carriles pares: gen RPA – 1, carriles nones: gen *cry9C*. Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

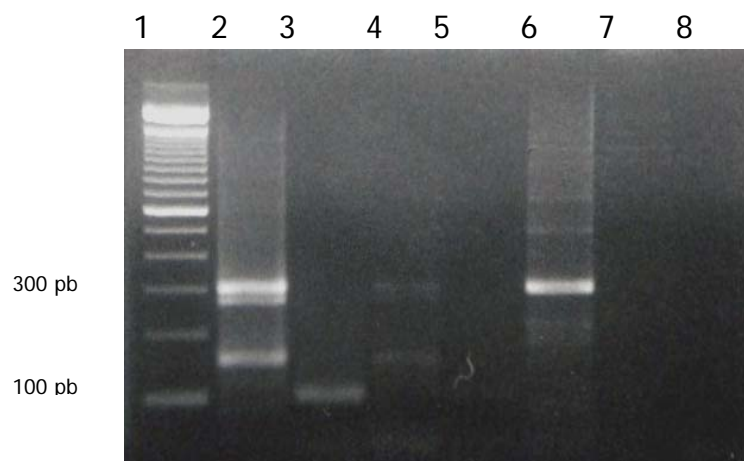


Figura No. 21 Análisis de los productos de la amplificación del gen endógeno RPA – 1 y el gen *cry9C* en un gel de agarosa (2%): Marcador de peso molecular 100pb (1), Masa frita Starlink al 10% (2 y 3), Tortilla frita Starlink al 10% (4 y 5), Harina certificada MON810 2% (6 y 7), Blanco de reactivos de amplificación *cry9C* (8). Carriles pares: gen RPA – 1, carriles noes: gen *cry9C*. Se cargaron 8 μ L de cada muestra.

En las Figuras No. 18, 19, 20 y 21 se muestran los productos de la amplificación del gen *cry9C* con las muestras de Starlink™ y los controles negativos. Es claro que los cebadores y las condiciones óptimas encontradas para este caso son las adecuadas para identificar el gen *cry9C* ya que el fragmento esperado de 100 pb se obtiene en todos los casos, sin bandeos inespecíficos.

Lo que también se observa en las fotos es le doble bandeo para la amplificación del gen RPA – 1 sólo para las muestras con maíz blanco, afirmando una vez más lo discutido anteriormente en la sección de RPA – 1.

Cabe señalar que la amplificación del gen *cry9C* se ve afectada por el grado de procesamiento de las muestras. Las figuras antes mencionadas lo demuestran, ya que el grado de procesamiento es directamente proporcional a la cantidad de

producto de amplificación obtenido. En todos los casos se partió de 200 ng de ADN molde para la amplificación, por lo que la diferencia en la concentración de amplicón obtenida se debe a que no todo el ADN tiene el tamaño necesario para ser amplificado. Sólo hay que comparar y ver las diferencias entre los productos de amplificación del grano de maíz Starlink™ contra las bandas obtenidas para la Tortilla frita de Starlink™. Esto se observa para todas las concentraciones (10%, 1% y 0.1%).

Sin duda, la concentración del transgen presente en la muestra también influye en la cantidad de producto de amplificación obtenido. La diferencia se percibe al observar las fotos y cabe resaltar que a la más baja concentración (0.1%) no es perceptible la amplificación para todos los productos, incluyendo el maíz en grano. En la literatura se reporta que el límite de detección de la técnica de PCR para muestras de maíz no procesado varía dependiendo de las condiciones de reacción, Vollenhofer (1999) reporta un límite de 0.1% mientras que Hurst (1999) reporta un límite de detección de 0.01%. Otros reportan que cuentan con un límite de detección de 0.001% (Silliker, 2003). Bajo las condiciones de trabajo en el laboratorio, donde se realizó este estudio, se ha reportado un límite de detección del 0.0002% (Fong, 2004) para la amplificación del P – 35S de harinas certificadas.

Con todo lo expuesto en este capítulo y analizando los resultados anteriores, se descarta la presencia de cualquier evento transgénico de maíz que tenga dentro de su construcción el T – NOS, dejando como posibles eventos presentes en las

muestras analizadas de Oaxaca a el Bt176, 676, 678, 680, DLL25 (B16), DBT 418, MON810, T14, T25, TC 1507, DAS-59112-7 y DAS-06275-8. Pensando un poco en la escena nacional e internacional, la probabilidad de que el evento presente en las muestras de alimentos procesados sea el MON810 es alta. Esto porque durante las cuatro décadas pasadas, la producción global de cultivos producidos para el uso y consumo humano y animal ha crecido rápidamente en respuesta a la demanda en alimentación a nivel mundial. Cultivos para consumo humano y animal, como el maíz, constituyen una porción muy grande en la agricultura mundial y representan una gran porción de tierra cultivable alrededor del mundo. Ciertamente cultivos, entre ellos el maíz, representan aproximadamente el 50% de superficie cultivada en el mundo (Kalaitzandonakes, 2004). Por ello, no es de sorprenderse que estos cultivos que dominan la producción mundial también representen el grueso del comercio a nivel internacional. 300 millones de toneladas métricas de trigo, maíz, soya y arroz son comercializadas mundialmente cada año entre un gran número de países. México ocupa el 4° lugar a nivel mundial en importar maíz de Brasil (868 toneladas métricas entre el 2000 y el 2002) y EE.UU.A. (5 336 977 toneladas métricas entre el 2000 y el 2002). A su vez, EE.UU.A. es el mayor país productor y exportador de maíz. Además de ser el país que mas consume y produce maíz genéticamente modificado. Desde la liberación comercial del primer maíz transgénico a mediados de 1990, el uso de la biotecnología en EE.UU.A. ha crecido enormemente, alcanzando el 45% de superficie en acres en 2004. Los eventos de maíz transgénico que más se cultivan

en EE.UU.A. a la fecha son el Bt11, GA21, MON810, MON863, NK603 y TC 1507; además, este tipo de maíces están considerados por la FDA como *equivalentes sustanciales*¹ al maíz convencional. Por consiguiente, generalmente nadie de los agricultores se esfuerza por separar ambos cultivos durante la cosecha. El 20% de la producción total de maíz en EE.UU.A. es destinada a la exportación a mercados internacionales, entre ellos, claro está, México (Kalaitzandonakes, 2004).

Hablando un poco del evento MON810, éste es de los más comerciales y más antiguos en EE.UU.A. En 1996 fue aprobado en ese país para uso y consumo humano y animal por lo que lleva ya varios años en el mercado. Retomando un poco lo explicado anteriormente, es muy probable que este evento haya sido introducido de manera adventicia a nuestro país y éste sea el evento presente en las muestras de Oaxaca que resultaron positivas para el P – 35S ya que no existía ningún organismo que regulara el tránsito de importación/exportación de este tipo de productos en las fechas en las que este tipo de eventos comenzaron a comercializarse. Ahora existen varias instancias que respaldan este procedimiento entre ellas el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad y la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

Ahora bien, para poder identificar al evento MON810 propondría en un principio utilizar en granos una tira reactiva específica para este evento y/o un análisis

¹ El concepto de *equivalencia sustancial* es uno de los principales componentes que rigen la evaluación de la inocuidad de alimentos derivados de OGMs. Este concepto incorpora un criterio de base científica por el que se compara un alimento derivado de un organismo genéticamente modificado (OGM) con el homólogo apropiado existente y consumido (FAO/WHO, 2005).

ELISA específica para la proteína Cry1Ab presente en la construcción de este evento transgénico. Se mencionan estos dos métodos porque son rápidos y baratos para hacer una evaluación rápida de las muestras para después pasar a un análisis más sofisticado y a fondo, si es que resultan positivas para éste evento.

Por otra parte, resulta especialmente interesante que los granos de maíz azul de Oaxaca (elegidos manualmente del lote para su análisis) hayan dado un resultado positivo para P – 35S por lo que se sugiere, como ya se había mencionado anteriormente, hacer una secuenciación del fragmento amplificado del P – 35S o un Southern Blot para corroborar este resultado.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

El método de extracción de ADN es el adecuado para alimentos de maíz nixtamalizado ya que se obtiene ADN en cantidad y calidad suficiente para lograr la amplificación del fragmento deseado para cada caso.

La integridad del ADN es determinante para obtener amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa.

A partir del 77% de las muestras se obtiene un amplicon para P – 35S, y de ahí, la presencia del P – 35S se corrobora indirectamente en el 93% de las muestras, a través del análisis de restricción de los amplicones derivados de la reacción de PCR con la enzima *BssSI*, obteniéndose dos fragmentos de 89 pb y 62 pb a partir del amplicón de 151 pb.

Los cebadores diseñados para la detección del terminador NOS por PCR, amplifican el fragmento de 159 pb en todos los controles positivos, en mezclas de maíz Starlink™ en diferentes proporciones (0.1 1 y 10% p/p) y en alimentos procesados no industrializados elaborados a partir de éstas.

La reacción de restricción para los productos de amplificación de T – NOS corrobora indirectamente la identidad de la banda (159 pb) ya que con la enzima *HinfI* se obtienen los dos fragmentos esperados de 108 pb y 51 pb para

las muestras de maíz Starlink™ y en alimentos procesados no industrializados elaborados con mezclas de Starlink™ del laboratorio.

Las muestras provenientes del estado de Oaxaca no presentan amplificación para el T – NOS, descartando entonces la presencia de algún evento transgénico con el T – NOS dentro de su construcción.

Los cebadores empleados para la identificación del gen *cry9C* por PCR, amplifican el fragmento esperado de 100 pb sólo en maíz Starlink™ y en alimentos procesados no industrializados elaborados con mezclas de Starlink™, confirmando así su especificidad para este gen.

El uso de controles positivos y negativos para cada reacción resulta de gran importancia al momento de comparar los resultados obtenidos para cada reacción de PCR. La correcta elección de los mismos permite tener mejores parámetros de comparación.

10. CONCLUSIONES

Se puede concluir, a partir del trabajo realizado en esta Tesis que, para implantar métodos modernos de análisis para la detección de OGMs en México, se debe emplear para este fin no sólo la técnica de PCR de punto final, sino complementar dicha técnica con el análisis de patrones de restricción y la hibridación de ácidos nucleicos. Si estos tres componentes forman parte del proceso de detección de un OGM, los resultados darán certeza científica y técnica suficiente sobre la identidad del OGM a los tomadores de decisiones involucrados en este tema. La técnica de PCR de punto final, por sí sola, no puede dar este tipo de certeza por todas las variables involucradas en ésta; ahora bien, si se emplea la técnica de PCR tiempo real, ésta resulta suficiente para identificar a un OGM dada la sensibilidad y especificidad que se ha logrado obtener a través de los nuevos desarrollos tecnológicos, aunque desafortunadamente resulta cara.

La aportación de esta Tesis, por lo tanto, va hacia recomendar al gobierno de México el invertir en herramientas y en capacitación de personas para la detección de materias primas y productos que contengan transgénicos para cumplir con lo que manda la Ley de Bioseguridad de OGMs. Si bien el análisis de riesgos de los organismos genéticamente modificados es caso por caso y paso por paso, el invertir en el desarrollo de capacidades analíticas de cada parte del sector público cubriría algún vacío que se llegara a tener dentro de este análisis y, tal vez, poder llevar a cabo la vigilancia y monitoreo que todo análisis de riesgos involucra.

Este tema debe seguir discutiéndose, tanto en foros nacionales como internacionales, para responder a todos los cuestionamientos que se vayan dando. Con respecto a las metodologías que se deben seguir para este tipo de productos, el Comité del Codex Alimentarius sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras discute el documento "Criterios para los métodos para la detección y identificación de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos (CX/MAS 05/26/9)" por lo se sugiere a los interesados en el tema, tanto del sector público como privado, seguir el desarrollo de este documento.

11. PERSPECTIVAS

- Realizar secuenciación de los amplicones obtenidos para el P – 35S en la reacción de PCR.
- Realizar Southern Blot sobre ADN total de las muestras
- Realizar PCR Tiempo Real para corroborar los resultados obtenidos.
- Realizar identificación de MON810 en las muestras procedentes del estado de Oaxaca a través de PCR específico para el gen *cry1Ab*

12. BIBLIOGRAFÍA

AgBios, Canadá. Consultado hasta el 2005. (<http://www.agbios.com>)

Balbás, Paulina., 2002. De la Biología Molecular a la Biotecnología. Editorial Trillas, 1ª Edición, México, D.F.

Bellon, M., Berthaud, Julien., 2002. Transgenic Maiz in Mexico: Facts, Fears, and Research Needs. CIMMYT.

(http://www.cimmyt.cgiar.org/whatisimmyt/recent_ar/D_Sustain/transgenic.htm)

Consultado el 12 de Marzo del 2003 a las 12:25p.m.

Bellon, M., Bertaud, Julien., 2002. Are Mexico's Indigenous Maize Varieties at Risk?. CIMMYT.

(http://www.cimmyt.cgiar.org/whatisimmyt/recent_ar/D_Sustain/mexico.htm)

Consultado el 12 de Marzo del 2003 a las 12:45p.m.

Bourges, R.H., 2000. Implicaciones en la salud y la alimentación del uso de organismos modificados genéticamente: la visión de un nutriólogo. *Bio Tecnología* 5, pp 22-28.

Cannon, Raymond J.C., 2000. *Bt* transgenic crops: Risks and benefits. *Integrated Pest Management Reviews*. 5: 151–173.

Convenio sobre la Diversidad Biológica (CBD), 2000. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología. CIBIOGEM, 1º Reedición, México, D.F.

COFEPRIS, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, México. Consultado hasta el 2005. (<http://www.cofepris.gob.mx>)

Chapela, Ignacio., et al., 2001. Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature*. **414**: 541-543.

Chiueh, Lih-Ching., et al., 2002. Study on the Detection Method of Six Varieties of Genetically Modified Maize and Processed Foods. *Journal of Food and Drug Analysis*. Vol. 10, No. 1, Pages 25-33.

De La Barrera, A. Berenice y Herrera, Rocío., 2003. Caracterización de maíces criollos para determinar su aplicación industrial. Tesis mancomunada de Licenciatura, UNAM, México, D.F., pp. 31-33.

Environmental Protection Agency, 2000. Assessment of Scientific Information Concerning StarLink™ Corn Cry9C Bt Corn Plant–Pesticide; *Notice*. Vol. 65, No. 211.

European Food Safety Authority, 2004. Guidance document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the Risk Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food and Feed. *The EFSA Journal*. **99**: 1-94.

FAO-OMS, 2000. Aspectos relativos a la inocuidad de los alimentos de origen vegetal genéticamente modificados. Informe de una consulta mixta FAO/OMS de Expertos sobre Alimentos Obtenidos por Medios Biotecnológicos. Ginebra, Suiza, pp 37.

FAO-OMS, 2003. Informe de la cuarta reunión del grupo de acción intergubernamental especial del Codex sobre alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. Comisión del Codex Alimentarius, pp 55.

FAO-OMS., Consultado hasta el 2004. (<http://www.fao.org>)

FAO/WHO, 2005., A Joint Technical Workshop on Nutrient Risk Assessment. A Model for Establishing Upper Levels of Intake for Nutrients and Related Substances. WHO Headquarters, Geneva, Switzerland. 2-6 May 2005

Fong, Carmen., 2004. Determinación del umbral de detección de los métodos Elisa y PCR en harinas certificadas de maíz Bt. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D.F.

Hae-Yeong Kim and Jae-Hwan Kim., 2004. Methods for the Detection of GMOs: PCR, Immunoassay and Microarray, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Hee University, Suwon, 449-701, Korea.

<http://www.fao.org/docrep/meeting/005/y0412s/y0412s08.htm#TopOfPage>

Holst–Jensen, A., 2003. Advanced DNA-based detection techniques for genetically modified food. Food Authenticity and Traceability. CRC Press. 575 – 593.

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

International Life Science Institute, 2004. Nutritional and Safety Assessments of Foods and Feeds Nutritionally Improved through Biotechnology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **3**: 38-69.

Jaimes, Fabiola., 2001. Caracterización y expresión del gen de la proteína de replicación A-1 de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

Jensen, A., 2001. A review, with notes on future needs and directions. National Veterinary Institute, Section of Food & Feed Microbiology, Oslo Norway, Version June 22nd.

Kalaitzandonakes, Nicholas., 2004. The Potencial Impacts of the Biosafety Protocol on Agricultural Commodity Trade. Internacional Food & Agricultural Trade Policy Council. Second Printing. Washington, DC.

Kessler, Charles., Economidis, Ioannis. (Eds), 2001. EC-sponsored Research on Safety of Genetically Modified Organisms. A Review of Results. European Commission.

Lara, A., 2003. Piden regular maíz transgénico. Periódico Reforma. Sección Buena Mesa. 1 de Marzo.

Luis, Claudia., 2002. La técnica de PCR aplicada a la detección del promotor 35S en granos y alimentos derivados de maíz. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D.F.

Lees, Michele., 2003. Food Authenticity and Traceability. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U.A. Woodhead Publishing. 3 – 31, 415 – 425, 575 – 593.

Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados., 2005. Diario Oficial de la Federación, 18 de marzo.

Marmioli, N., et al., 2003. Advanced PCR techniques in identifying food components. Food Authenticity and Traceability. CRC Press. 3-31.

NCBI Home Page. 2003. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Consultado el 23 de Abril del 2003 a las 12:00 p.m.

Pew Initiative on Food and Biotechnology, 2003. Have Transgenes Will Travel? Issues Raised By Gene Flow From Genetically Engineered Crops.

Popping, B., 2003. Identifying genetically modified organisms (GMOs). Food Authenticity and Traceability. CRC Press. 415 – 425

Quirasco, Maricarmen., Gálvez, Amanda., 2002. Biotecnología moderna, OVMs, Evaluación de Riesgos y Aspectos Regulatorios en México. En: Memorias del Primer Encuentro Internacional de Derecho Ambiental. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F.

Quirasco, M., Schoel, B., Plasencia, J., Fagan, J. & Gálvez, A., 2004. Suitability of RTQ-PCR and ELISA for Cry9C detection in Mexican corn tortillas: fate of DNA and protein after alkaline cooking. *Journal of AOAC International*. **87**: 639-646.

Serna, S., 1996. Química, almacenamiento e industrialización de los cereales, A.G.T. Editor, 1ª Edición, México, D.F. pp. 14, 217-222, 299-303, 414-421.

Serratos, J.A., 1996. Biotechnology Seminar Paper. Evaluation of Novel Crop Varieties in their Center of Origin and Diversity: the Case of Maize in Mexico. ISNAR Biotechnology Service. pp. 68-73.

Silliker, UE. Consultado hasta el 2003. (<http://www.silliker.com>)

Signorini, Marcelo., 2005. Comunicación personal. Secretaria de Salud, Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).

The Royal Society of Canada. 2001. Elements of precaution: recommendation for the regulation of food biotechnology in Canada. Health Canada, pp. 265.

Tønne Andersen, Jens., *et al.*, 2001. Using inactivated microbial biomass as fertilizer: the fate of antibiotic resistance genes in the environment. *Res. Microbiol.* **152**: 823–833.

United State General Accounting Office., 2002. Genetically modified foods. Experts view regimen of safety tests as adequate, but FDA's evaluation process could be enhanced. Report to Congressional Requesters, pp 52.

Vollenhofer, Sabine., *et al.*, 1999. Genetically Modified Organisms in Food-Screening and Specific Detection by Polymerase Chain Reaction. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 5038-5043, Austria.

Watson, James D., *et al.*, 1992. Recombinant DNA, 2nd ed. Scientific American Books, New York. págs. 145-146

Windels, P., Bertrand, S., Depicker, A., Moens, W., Bockstaele, E., Loose, M., 2002. Qualitative and event-specific PCR real-time detection methods for Starlink maize. *Eur Food Res Technol.* **216**: 259-263.

Zimmermann, A., Luthy, J. and Pauli, U., 2000. Event Specific Transgene Detection in Bt11 Corn by Quantitative PCR at the Integration Site. *Lebensm-Wissu-Technol.* **33**: 210-216.

ZWAHLEN, C., HILBECK, A, *et al.*, 2003. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology.* **12**: 765 – 775.

APÉNDICE

1. Extracción de ADN genómico de las muestras y controles con DNAzol® (Invitrogen Life Technologies)

El protocolo recomendado por el fabricante se modificó para la extracción de ADN de las muestras y controles antes descritos. Se realizaron las extracciones por duplicado de todas las muestras y algunos controles. Específicamente los granos control, por requerir mayor cantidad de ADN para hacer la optimización de condiciones, se extrajeron 12 veces.

DNAzol® Reagent, Invitrogen Life Technologies Cat. No. 10503-027

PROCEDIMIENTO:

1. Pesar entre 40 y 60 mg de muestra seca y en polvo.
2. Agregar al polvo 1 mL de DNAzol™, homogeneizar agitando el tubo por inversión unas 10 veces. No es recomendable hacerlo muy fuerte ya que se puede romper el ADN. Procurar de que el polvo se moje totalmente.
3. Centrifugar 10 min a 10 000 r.p.m. a temperatura ambiente para eliminar los restos de tejido.
4. Pasar el SOBRENADANTE (aproximadamente 0.9 mL) a un tubo limpio usando una punta de pipeta de 1 mL ensanchada de la boca con una navaja.
5. Agregar 0.5 mL de isopropanol (-20°C) y mezclar por inversión.
6. Incubar con hielo por 10 minutos.

7. Centrifugar 10 min a 10 000 r.p.m. a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante con una punta, empezando por la parte superior.
8. Lavar el pellet con 1 mL de etanol al 70% frío (-20°C) y centrifugar (2 min/10 000 r.p.m./temperatura ambiente). Eliminar el sobrenadante por decantación.
9. Dejar secar el precipitado dejando el tubo abierto por unos 15 minutos.
10. Disolver el ADN en 50 µl de NaOH 10mM e incubar 15 minutos a 37°C para ayudar a disolver el ADN. Se va a observar un material blanco insoluble que son principalmente carbohidratos.
11. Centrifugar 5 minutos a 10 000 r.p.m. a temperatura ambiente. Pasar el SOBRENADANTE con una punta de pipeta ensanchada a un tubo limpio (aproximadamente 40 µl).
12. Neutralizar con 1/20 volumen de Tris 1M, pH 8. (aproximadamente 2 µl por los 40 µl).

Tabla 1. Reactivos empleados en la extracción

REACTIVO	COND. DE USO	GRADO	MARCA
DNAzol [®]	1 mL/muestra	B. M.	Invitrogen
Isopropanol	- 20°C	R. A.	J. T. Baker
Etanol Absoluto	70%, - 20°C	R. A.	J. T. Baker
NaOH	10 mM	R. A.	J. T. Baker
Trizma [®] Base	1 M, pH 8	R. A.	Sigma

2. Cuantificación de ADN

PROCEDIMIENTO:

1. Hacer una dilución 1:1 del ADN purificado, mezclando en un tubo de 1.5 mL, 30 μ L de muestra con 30 μ L de agua estéril o buffer TE.
2. Ajustar a cero el espectrofotómetro con agua estéril o buffer TE, según sea el caso.
3. Medir la absorbancia a 260 y 280 nm.
4. Calcular la pureza del ADN calculando el cociente A_{260}/A_{280} . Una muestra con una pureza aceptable debe tener un cociente de ~ 1.8 .
5. Calcular la concentración de ADN con la siguiente fórmula:

$$A_{260} * F * 50 = \text{ng}/\mu\text{L}$$

Donde: F es el factor de dilución (en este caso 2)

a A_{260} 1 doble cadena de ADN = 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

3. Electroforesis de ADN en geles de Agarosa

1. Pesar la cantidad necesaria de agarosa para obtener la concentración deseada (1.5, 2, 2.5 ó 3%).
2. Fundir la agarosa, utilizando TAE 1X (400 mM Tris-Acetato y 10 mM EDTA, pH 8.3 ± 0.1) como disolvente y amortiguador de corrida.
3. A la agarosa fundida (45-55 $^{\circ}\text{C}$ / 25 mL aproximadamente por cada gel) adicionar bromuro de etidio (10 mg/mL) suficiente para concentración final de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4. Ajustar el voltaje de la fuente de poder a 80-100 volts y tiempo de corrida aproximadamente 0.45-1 h.
5. Paso opcional: teñir el gel con bromuro de etidio si se piensa sacar una foto instantánea y la cámara contiene un cartucho de fotos de baja sensibilidad.
6. Visualización utilizando un transiluminador de luz UV.
7. Documentación del gel.

4. Extracción de amplicones a partir de geles de agarosa

La extracción de los productos de la amplificación de geles de agarosa se realizó con el propósito de obtener la mayor cantidad de amplicón, eliminar los restos de reactivos presentes en la reacción (agarosa, sales, enzima, etc.) y evitar interferencias al realizar la identificación mediante la digestión enzimática. El kit GenElute™ Agarose Spin Columns está diseñado para hacer una rápida purificación de fragmentos de ADN lineales de 100pb a 10kb en geles de agarosa. La banda de ADN se corta del gel para ser introducida a una columna especial para microcentrifuga. Esta columna tiene una serie de membranas y filtros que retienen la agarosa e impurezas, permitiendo el libre paso del ADN a un tubo colector durante la centrifugación. El uso de este kit elimina la necesidad de utilizar resinas, DEAE, o solventes orgánicos tóxicos como el fenol y el cloroformo. No se requiere de calentamiento o digestión enzimática para eliminar la agarosa. Aproximadamente se recupera del 40 al 45% de los fragmentos de 100pb a 10kb. Este porcentaje disminuye con el aumento del tamaño de los fragmentos. Para optimizar la extracción de ADN se pueden usar trozos de gel de agarosa de

100mg. De un trozo que pese 40mg de gel de agarosa al 1.0% de concentración se recupera un volumen de aproximadamente 40µL, de un trozo que pese 90mg a la misma concentración se recuperan 65µL. El peso máximo del trozo de gel es de 200mg para poder obtener ADN puro que sirva para ligaciones, PCR, digestiones enzimáticas, hibridaciones, etc.

Product Code 5-6500 SIGMA

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar las columnas en los colectores proporcionados por el kit.
2. Lavar las columnas con 100 µL de buffer TE 1X (10 mM Tris, pH 8.0, con EDTA 1 mM) o con 100 µL de agua desionizada estéril.
3. Cerrar y centrifugar a máxima velocidad (12 000 – 16 000 x g) por 5 – 10 segundos.
4. No permita que se sequen las columnas y evite centrifugar más de 10 segundos.
5. Elimine el agua del tubo colector o use uno nuevo.
6. Corte la banda de interés del gel de agarosa y colóquela en las columna. Para mejores resultados, corte el gel lo más cercano a la banda de interés. Esto permite que exista menos agarosa en la columna y mayor cantidad de ADN disponible para coleccionar. Además si corta en trocitos muy pequeños el gel con una navaja o escalpelo antes de colocarlo dentro de la columna, la recuperación de ADN se verá favorecida.

7. Centrifugue las columnas con los tubos colectores a máxima velocidad por 10 minutos. El ADN purificado se encontrará en los tubos colectores listo para ser usado. Sino se usa inmediatamente el ADN recuperado, puede almacenarse a 2 – 8 °C o a – 20 °C para su uso posterior.

Tabla 2. Reactivos empleados en la purificación

REACTIVO	COND. DE USO	GRADO	MARCA
Agua desionizada esteril	1 µL/muestra	B. M.	

5. Purificación de los amplicones empleando el kit High Pure PCR Product Purification (Roche)

El kit High Pure PCR Product Purification (Roche) está diseñado para aislar eficiente y convenientemente los productos de PCR de las reacciones de amplificación. Los primers, el magnesio, dNTP's y la polimerasa pueden inhibir las reacciones que se deseen hacer con los amplicones por lo que se necesitan retirar del medio. Además, este kit puede emplearse para concentrar las muestras que se encuentren muy diluidas y porque las muestras son eluidas en buffer o agua, el tiempo de extracción se ve reducido comparado con los métodos que emplean extracciones con solventes orgánicos y precipitación de ácidos nucleicos.

El ADN se une específicamente a la superficie de la fibra de vidrio o a la sílica en presencia de sales de guanidina, permitiendo así la separación del ADN de impurezas como por ejemplo sales, dNTPs, proteínas, a través de un lavado. Este

proceso requiere un tamaño mínimo de ADN (100pb) ya que oligonucleótidos pequeños o dímeros de cebadores también son removidos con el lavado. El ADN se eluye de la fibra de vidrio utilizando agua o un buffer bajo en sales. El kit cuenta con unas columnas que contienen fibra de vidrio reduciendo así el número de pasos y el tiempo necesario para la reacción de purificación, permitiendo el tratamiento de varias muestras al mismo tiempo.

Cat. No. 1732668 ROCHE

PROCEDIMIENTO:

El protocolo recomendado por el fabricante se modificó para la purificación de los productos de amplificación, por lo que el procedimiento es el siguiente:

1. Colocar columnas de purificación en los tubos colectores.
2. Añadir 500 μ L de Binding Buffer a los 100 μ L de la reacción de PCR.
Mezclar bien y pipetear esto en las columnas de purificación.
3. Centrifugar por 30 segundos a velocidad máxima (13 000 x *g* aproximadamente).
4. Descartar el sobrenadante y añadir 500 μ L de Wash Buffer.
5. Centrifugar por 1 minuto a velocidad máxima (13 000 x *g* aproximadamente).
6. Descartar el sobrenadante y añadir 200 μ L de Wash Buffer.
7. Centrifugar por 1 minuto a velocidad máxima (13 000 x *g* aproximadamente).

8. Descartar el tubo colector con todo y sobrenadante. Colocar la columna en un tubo colector nuevo o en un eppendorf estéril.
9. Añadir de 50 – 100 μL de agua estéril pH 8 – 8.5 o Elution Buffer. Incubar a 60 °C/10 min.
10. Centrifugar por 1 minuto a velocidad máxima (13 000 x *g* aproximadamente).
11. Descartar la columna de purificación y guardar el tubo colector con el purificado a - 20 °C hasta ser utilizado.

Tabla 3. Reactivos empleados en la purificación

REACTIVO	COND. DE USO	GRADO	MARCA
Agua desionizada esteril	1 μL /muestra	B. M.	
Binding Buffer	500 μL /muestra	B. M.	ROCHE
Wash Buffer	700 μL /muestra	B. M.	ROCHE

6. Reacciones de restricción

Con el propósito de corroborar indirectamente la identidad del fragmento de 151 pb y 159 pb obtenido con la PCR P – 35S y T – NOS respectivamente, se realizó la digestión enzimática de los amplicones y para lograrlo se procedió de la forma siguiente:

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Partir de muestras purificadas.

- 2.- Determinar el volumen total de la reacción (25 µL) tomando en cuenta el volumen de ADN a cortar, el volumen de la enzima, que no debe exceder el 10% del volumen total y el volumen del amortiguador, si es necesario se adiciona agua desionizada estéril.
- 3.- Descongelar las muestras y el amortiguador en hielo, la enzima debe permanecer en todo momento a -20°C.
- 4.- Depositar en un tubo Ependorff limpio el agua necesaria para ajustar la reacción.
- 5.- Adicionar el volumen necesario de amortiguador para concentración final 1X
- 6.- Adicionar ADN
- 7.- La enzima se adiciona al final 1 U por reacción.
- 8.- Incubar por 1 – 6 h a 37°C.

Tabla 4. Reactivos empleados en las reacciones de restricción

REACTIVO	COND. USO	GRADO	MARCA
Enzima BssSI	-20°C	B.M.	New England BioLabs
1X NEBuffer 3	T. A.	B.M.	New England BioLabs
Enzima Hinf I	-20°C	B.M.	Invitrogen
REact2	T. A.	B.M.	Invitrogen
Agua	Desionizada	Estéril	

Tabla 5. Equipo empleado en las diferentes metodologías

EQUIPO	MARCA	MODELO
Autoclave	YAMAMOTO	SM300
Balanza Analítica	OHAUS Voyager	V10640
Balanza Granataria	SARTORIUS	1209MP
Bomba de Vacío	HETO	No. Serie CT60E
Cámara de Electroforesis	HOEFER	HE33
Cámara Fotográfica	POLAROID	DS34
Campana para PCR	LABCONCO	Cat.No.3740002
Concentrador DNA Plus	HETO	DNA Plus VR-Mini
Espectrofotómetro	SHIMADZU	UV160U
Fuente de Poder	BIO-RAD	1000/500
Horno	YAMAMOTO	DX300
Microcentrifuga	EPPENDORF	5415C
Termoblock	EPPENDORF	No. Serie 535021177
Termociclador	TECHGENE	FTGENE2D
Transiluminador	COLE-PARMER	9814