



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETECCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DEL EVENTO KM-ØØØH71-4 EN BETABEL (*Beta
vulgaris*) GENÉTICAMENTE MODIFICADO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

DIANA LAURA LABASTIDA JAIMES



DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. MARÍA GUADALUPE BARRERA ANDRADE

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO
2018



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.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero que nada a mis padres que durante toda mi vida me han apoyado en conseguir mis metas y luchar por mis sueños.

Un especial agradecimiento a las instituciones que me abrieron sus puertas, a la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha brindado grandes oportunidades y sobre todo gran calidad educativa.

Al SENASICA por la oportunidad que otorga a estudiantes como yo, por brindarme las herramientas necesarias y el apoyo financiero para la realización de esta tesis, específicamente quiero agradecer al Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados por haberme recibido y a todos sus integrantes por el apoyo ofrecido durante mi estancia, por todas las dudas resueltas, siempre dispuestos a ayudar, siempre amables y sobre todo por los agradables momentos y la experiencia adquirida.

Gracias a la directora esta tesis, la M. en C. María Guadalupe Barrera Andrade, por la confianza depositada en mí para formar parte de este proyecto y por su ayuda no solo para la realización de esta tesis sino también por su comprensión y apoyo en todos los tramites.

Gracias al Q.F.B. José Luis Juárez Vargas por su infinito apoyo y supervisión durante toda mi estancia tanto en la realización de esta tesis como en el proyecto de servicio social, por compartir conmigo sus conocimientos y por tenerme tanta paciencia y sobre todo por su amabilidad y comprensión.

A mis sinodales por estar involucrados en la guía durante el desarrollo de este proceso de tesis, por sus observaciones y comentarios sin duda muy valiosos.

Agradezco también al Dr. Maximiliano Ibarra Barajas por abrirme las puertas de su laboratorio cuando no tenía experiencia alguna y por darme la oportunidad de realizar investigación por primera vez, asimismo quiero agradecer a la Dra. Patricia Castro Moreno por su paciencia, ayuda y colaboración incluso después de terminada mi estancia en el laboratorio.

A mis familiares y amigos por todo su apoyo y colaboración incluso en la distancia durante toda la carrera que sin duda fue una grandiosa experiencia gracias a ellos.

DEDICATORIAS

A mi familia...

A mis padres, porque son el pilar fundamental de todo lo que soy, por todo el esfuerzo que hicieron para darme la mejor educación tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo siempre constante.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

A mis maestros...

Por su gran apoyo y motivación para la culminación de nuestros estudios profesionales y sus grandes consejos aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario, y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas.

A mis amigos...

Por su compañía, por estar a mi lado en cada momento haciendo este proceso más ameno y que de alguna forma han contribuido al desarrollo de mis objetivos.

La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro. El esfuerzo total es una victoria completa... Mahatma Gandhi

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Lista de figuras.....	8
2. Índice de tablas	9
3. Abreviaturas y definiciones.....	10
4. RESUMEN	12
5. INTRODUCCIÓN.....	13
6. OBJETIVOS.....	15
6.1 Objetivo General	15
6.2 Objetivos particulares	15
7. MARCO TEÓRICO.....	16
7.1 Generalidades del betabel.....	16
7.1.1 Hoja.....	17
7.1.2 Flor.....	17
7.1.3 Fruto y semilla.....	17
7.1.4 Clasificación taxonómica.....	18
7.2 Distribución	18
7.3 Importancia y producción de betabel.....	19
7.4 Betabel genéticamente modificado.....	21
7.5 Evento KM-ØØØH71-4.....	22
7.6 Técnicas de transformación de plantas mediante ingeniería genética	24
7.6.1 Tecnología del ADN recombinante.....	24
7.6.2 Biobalística	25
7.6.3 Vectores virales	25
7.6.4 Microinyección	26
7.6.5 Electroporación	26
7.6.6 Transformación mediada por <i>Agrobacteriumtumefaciens</i>	27
7.6.7 Promotor CaMV y terminador T-NOS	28
7.7 Detección de organismos genéticamente modificados	28
7.7.1 Técnica de Inmunoensayo.....	28
7.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	29
7.7.3 PCR en tiempo real.....	31
7.7.4 Sondas para PCR.....	31
7.7.5 Sondas de hidrólisis Taqman	32

7.7.6 Balizas moleculares	33
7.7.7 Sonda Scorpion	34
7.7.8 SYBR Green.....	34
7.7.9 Limitaciones de PCR y RT-PCR	34
7.7.10 Limite de detección (LoD)	35
7.7.11 Límite de cuantificación (LoQ).....	36
7.8 Métodos de extracción de ADN.....	36
7.9 Regulación de organismos genéticamente modificados	37
7.9.1 Internacional	38
7.9.2 Nacional	40
8. Materiales y Método.....	43
8.1 Materiales.....	43
8.2 Método.....	44
8.2.1 Acondicionamiento de muestras	45
8.2.2 Generación de mezclas	45
8.2.3 Extracción de ADN	46
8.2.4 Cuantificación y estandarización del ADN.....	46
8.2.5 Eficiencia de amplificación y evaluación de la presencia de inhibidores.....	47
8.2.6 Límite de detección	49
8.2.7 Determinación del límite de cuantificación	50
8.2.8 Pruebas de repetibilidad.....	50
8.2.9 Pruebas de reproducibilidad	51
8.2.10 Prueba de robustez.....	51
8.2.11 Intervalo dinámico	51
8.2.12 Precisión	51
8.2.13 Incertidumbre	52
9. Resultados y discusión.....	53
9.1 Prueba de especificidad de los iniciadores del gen endógeno de betabel GS....	53
9.2 Extracción de DNA	54
9.3 Eficiencia de amplificación y evaluación de la presencia de inhibidores	56
9.4 Límite de detección	59
9.5 Limite de cuantificación.....	64
9.6 Intervalo dinámico.....	76

9.7	Precisión.....	77
9.8	Incertidumbre.....	78
10.	Conclusiones.....	81
11.	Literatura citada	83
12.	Anexo I. Protocolo de extracción de ADN.....	91
13.	Anexo II. Certificado de Material de Referencia MR941	93
14.	Anexo III.....	94
15.	Anexo IV. Análisis de Varianza	97

1. Lista de figuras

Figura 1. Morfología de beta vulgaris.	16
Figura 2. Estructura de la semilla de betabel.	18
Figura 3. Distribución de Beta vulgaris en México.	19
Figura 4. Principales exportadores de betabel en el mundo.	20
Figura 5. Constructo del evento H7-1.	23
Figura 6. Mecanismo de acción del glifosato.	23
Figura 7. Mecanismo de infección de A. tumefaciens.	28
Figura 8 Principio de la técnica ELISA.	29
Figura 9. Esquema general de las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	31
Figura 10. Fundamento de sondas de hidrólisis.	33
Figura 11. Relación entre Límite de blanco, límite de detección y límite de cuantificación.	36
Figura 12. Importaciones y exportaciones mundiales de frutas y hortalizas.	38
Figura 13. Semillas de betabel.	45
Figura 14. Amplificación de DNA de otras especies con los iniciadores específicos para el gen de referencia GS.	53
Figura 15. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad para el porcentaje de 100.	70
Figura 16. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad para el porcentaje de 10.	71
Figura 17. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad para el porcentaje de 1.	72
Figura 18. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad para el porcentaje de 0.1.	73
Figura 19. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y robustez para el porcentaje de 100.	74
Figura 20. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y robustez para el porcentaje de 10.	74
Figura 21. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y robustez para el porcentaje de 1.	75
Figura 22. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y robustez para el porcentaje de 0.1.	76
Figura 23. Curva de calibración para el evento específico KM-ØØØH71.	77
Figura 24. Curva de calibración para el gen endógeno GS.	77
Figura 25. Curva para verificar la presencia de inhibidores.	94
Figura 26. Curva para verificar la presencia de inhibidores.	94
Figura 27. Curva para verificar la presencia de inhibidores.	94
Figura 28. Curva para verificar la presencia de inhibidores.	95
Figura 29. Curva para verificar la presencia de inhibidores.	95
Figura 30. Curva para verificar la presencia de inhibidores.	95
Figura 31. Curva para verificar la presencia de inhibidores.	96
Figura 32. Curva para verificar la presencia de inhibidores.	96
Figura 33. Análisis de varianza para la mezcla de 100% repetibilidad vs reproducibilidad.	97

98 Figura 34. Análisis de varianza para la mezcla de 10% repetibilidad vs reproducibilidad.....96

Figura 35. Análisis de varianza para la mezcla de 1% repetibilidad vs reproducibilidad.....98

Figura 36. Análisis de varianza para la mezcla de 0.1% repetibilidad vs reproducibilidad.....98

Figura 37. Análisis de varianza para la mezcla de 100% repetibilidad vs robustez..... 99

Figura 38. Análisis de varianza para la mezcla de 10% repetibilidad vs robustez..... 99

Figura 40. Análisis de varianza para la mezcla de 1% repetibilidad vs robustez..... 100

Figura 41. Análisis de varianza para la mezcla de 0.1% repetibilidad vs robustez..... 100

2. Índice de tablas

Tabla 1. Eventos transgénicos existentes de betabel 20

Tabla 2. Características de los materiales utilizados en la generación de mezclas 42

Tabla 3. Secuencias específicas de iniciadores y sondas para KM-ØØØH71-4 y gs 42

Tabla 4. Volumen y concentración de los componentes de la mezcla de reacción de qPCR 43

Tabla 5. Cantidades de materiales de referencia empleados para la generación de mezclas de harinas..... 45

Tabla 6. Protocolo PCR utilizado para el equipo ViiA7® 49

Tabla 7. Programa de amplificación utilizado para el termociclador LightCycler480® 49

Tabla 8. Concentración de ADN obtenido en cada mezcla 54

Tabla 9. Eficiencia de amplificación de las mezclas seleccionadas 57

Tabla 10. Presencia de inhibidores en las mezclas seleccionadas.. 58

Tabla 11. Límite de detección para el evento KM-ØØØH71-4 bajo condiciones de repetibilidad.. 59

Tabla 12. Límite de detección para el evento KM-ØØØH71-4 bajo condiciones de reproducibilidad..... 61

Tabla 13. Límite de detección para el evento KM-ØØØH71-4 bajo condiciones de robustez... 62

Tabla 14. Límite de cuantificación establecido bajo condiciones de repetibilidad..... 66

Tabla 15. Límite de cuantificación establecido bajo condiciones de reproducibilidad..... 66

Tabla 16. Límite de cuantificación establecido bajo condiciones de Robustez.....67

Tabla 17. Resultados de desviación estándar bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.....77

Tabla 18. Estimación de la incertidumbre bajo repetibilidad y reproducibilidad.....78

Tabla 19. Estimación de la incertidumbre bajo repetibilidad y robustez.....78

3. Abreviaturas y definiciones

ADN: Ácido desoxirribonucleico

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

gs: *Glutamina sintetasa*. Gen endógeno de *Beta vulgaris*.

CNRDOGM: Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados.

Cp: Punto de cruce (producto del algoritmo de amplificación del termociclador Light Cycler 480®)

Ct: (thresholdCycle) (línea base de amplificación del termociclador ViiA7®)

CV: Coeficiente de Variación

Evento: Construcción genética única, introducida en un organismo, de la cual deriva un OGM; éste tiene un nombre comercial por parte de la empresa desarrolladora y debe registrarse ante la OCDE para obtener su identificador único.

LBOGM: Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

ng: Nanogramos

mg: Miligramos

MR: Material de Referencia

MRC: Material de Referencia Certificado

OGM: Organismo genéticamente modificado o transgénico

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en cadena de la Polimerasa cuantitativa

S: Desviación estándar

SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación.

SENASICA: Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria

Terminador: Elemento genético que delimita el final de la transcripción de un gen.

U (RSDIP): Incertidumbre del componente de medición en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad

ΔC_p : Incremento del punto de cruce

μL : Microlitro

4. RESUMEN

Hoy en día el cultivo de plantas genéticamente modificadas se ha convertido en algo común, tan sólo en el 2016 se registró un total de 185. 1 millones de ha de cultivo de organismos genéticamente modificados en 26 países, lo que representa un 60% de la producción mundial. En México se tiene un total de 143 eventos de modificación genética autorizados para su consumo entre los que destacan 5 eventos de alfalfa, 13 de canola, 30 de algodón, 68 de maíz, 13 de papa, 1 de arroz, 22 de soya, 5 de tomate y 1 de betabel.

Tomando como base las relaciones comerciales de México con los diferentes países es importante mantener a la vanguardia los métodos analíticos para la detección, identificación y cuantificación de OGM que permitan evidenciar el cumplimiento de la regulación nacional e internacional en la materia, favoreciendo el intercambio comercial de los productos nacionales.,

El Centro Nacional De Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM), tiene la misión de realizar la validación de nuevos métodos para la detección de OGM's de especies vegetales relacionadas con la utilización confinada, experimental, piloto y comercial. Por ello el presente trabajo tuvo como objetivo la validación del método para la detección, identificación y cuantificación del evento KM-ØØØH71-4 en la matriz de betabel para su implementación como servicio analítico.

Para el desarrollo de la validación se generaron mezclas con diferentes porcentajes de harina transgénica/harina convencional, posteriormente se realizó la extracción de ADN con la suficiente pureza y calidad. Se evaluó la presencia de inhibidores para asegurarla detección del analito de interés. La técnica utilizada fue PCR en tiempo real (qPCR).

Con base en los resultados obtenidos, se determinó el porcentaje 0.05 como el límite de detección y el porcentaje 0.10 como el límite de cuantificación bajo las condiciones de repetibilidad, reproducibilidad y robustez.

5. INTRODUCCIÓN

La demanda mundial de alimentos aumenta a un nivel acelerado, este patrón está estrechamente relacionado con el crecimiento de la población, sin embargo la disposición de recursos, tierra cultivable al igual que el agua son limitados, debido a ello la implementación de nuevas tecnologías juega un papel clave en el mejoramiento de cultivos y por ende en el aumento de la calidad y eficiencia de producción de los mismos. Desde que se originó la agricultura, el hombre ha seleccionado plantas con características específicas de manera artificial a través de técnicas tradicionales, iniciando así procesos de domesticación de cultivos que se adapten mejor a las características de los diferentes ecosistemas. Hoy en día se cuenta con técnicas más avanzadas de biotecnología y mejoramiento genético que representan una alternativa para adaptar los cultivos a factores climáticos como resistencia a frío o a altas temperaturas, disminución de la disponibilidad de agua y amenazas por plagas, insectos y patógenos o bien favoreciendo características nutricionales (Fedoroff *et al.* 2010; Mellon, 2010).

Ante las estrategias que se han adoptado para hacer frente a estas problemáticas los cultivos genéticamente modificados (GM), se han introducido como una de las posibles formas de avanzar con el objetivo de combinar mayores rendimientos y mejor calidad de alimentos, si bien, existe mucha controversia ante la introducción de estos cultivos así como de los productos derivados de ellos (Phipps & Park, 2002).

Los organismos genéticamente modificados (OGMs) de acuerdo con la ley de bioseguridad pueden definirse como cualquier organismo vivo, con excepción de los seres humanos, que ha adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna; ofreciendo ventajas sobre los cultivos convencionales, los cultivos genéticamente modificados se encuentran en desarrollo y su uso comercial ha incrementado desde su aprobación en 1996, sólo en el año 2016 se registró un aumento de 6 millones de hectáreas cultivadas con respecto al 2013 lo que lleva a una cifra récord de 185.1 millones de hectáreas, en total 26 países

cultivan organismos transgénicos, representando un 60% de la producción mundial (James, 2017).

México cuenta con un total de 143 eventos de modificación genética autorizados para su consumo, entre los que destacan 5 eventos de alfalfa, 13 de canola, 30 de algodón, 68 de maíz, 13 de papa, 1 de arroz, 22 de soya, 5 de tomate y 1 de betabel (ISAAA, 2016). La mayoría de los eventos sólo están aprobados para su consumo, mientras que sólo se tienen permisos para cultivo de algodón y soya. El evento autorizado en México en 2006 para comercialización e Importación de betabel es el KM-ØØØH71-4, desarrollado por Monsanto Comercial, S.A. de C.V. (COFEPRIS, 2010), el cual posee resistencia a herbicidas, específicamente al glifosato, la línea de betabel H7-1 se produjo mediante la técnica *Agrobacterium*, transformando el cultivar original 3S0057 con el plásmido vector binario PV-BVGT08 (BIOSAFETY SCANNER, 2017).

La ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados que entró en vigor en México en el año 2005 y el reglamento que lo hizo en 2008 y fue modificado en 2009, tienen entre sus objetivos la regulación de las actividades de utilización confinada, liberación experimental, piloto y comercial, importación y exportación de OGM's, por esta razón la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) a través del Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), realiza las actividades de inspección, vigilancia y monitoreo de los cultivos GM en todo el país.

Actualmente la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la PCR cuantitativa constituyen las técnicas mayormente aplicadas debido a su alta sensibilidad y especificidad en el análisis de organismos genéticamente modificados.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Validar la metodología para la detección y cuantificación del evento específico KM-ØØØH71-4 en la matriz de betabel mediante la técnica de PCR tiempo real (qPCR), para su implementación como servicio analítico del Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM).

6.2 Objetivos particulares

Implementar y estandarizar la metodología adecuada para la extracción de ADN de betabel (*beta vulgaris*).

Realizar la caracterización del material de betabel, mediante la detección de diferentes elementos regulatorios y especies, para utilizar este material como convencional en la validación.

Verificar la especificidad de los oligonucleótidos seleccionados para el gen de referencia *gs*.

Determinar el límite de detección, mediante ensayos de repetibilidad, reproducibilidad y robustez para establecer la cantidad mínima del evento específico KM-ØØØH71-4 que se puede detectar con precisión y certeza.

Determinar el límite de cuantificación, mediante ensayos de repetibilidad, reproducibilidad y robustez para establecer la cantidad mínima del evento específico KM-ØØØH71-4 que se puede cuantificar con precisión.

7. MARCO TEÓRICO

7.1 Generalidades del betabel

El betabel es una planta bianual diploide con $2n = 18$ cromosomas cuyo genoma tiene un tamaño estimado de 714-758 megabases, requiere de dos años para alcanzar la madurez, durante el primer año de crecimiento se desarrollan las hojas, así como un sistema radicular profundo y ramificado con una raíz principal que puede alcanzar hasta 2 metros de longitud, que al secarse tiene un contenido de 15 a 20% de azúcar, en el segundo año la planta utiliza los azúcares almacenados para desarrollar el tallo floral y las semillas, sin embargo para florecer requiere vernalización; por lo tanto las remolachas cultivadas con fines de producción de azúcar no producen flores, polen ni semillas (Bodnar, 2010; Gregorio, 2010, Dohm et al., 2014)

Raíz. El betabel posee una raíz profunda, esférica, bulbosa y carnosa, que en algunas variedades puede presentarse en forma alargada o plana. Generalmente, posee un diámetro de entre 5-10 cm, oscilando su peso entre los 80-200 g. Las tonalidades que se pueden apreciar en la remolacha van desde el rosáceo al violeta, anaranjado, marrón o rojizo (Gregorio, 2010).

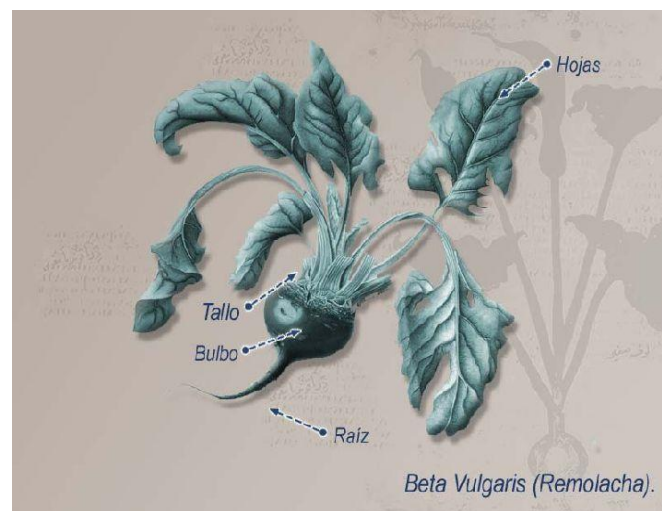


Figura 1. Morfología de beta vulgaris. Extraído de: <http://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=c,543,m,2714&ar=ReP-23591>

A pesar de ser considerada como una hortaliza de raíz, la parte comestible se trata en realidad de un tallo engrosado bulboso (hipocótilo ensanchado), que

presenta una coloración roja o morada ya que al igual que otros miembros de la familia Chenopodiaceae, puede acumular niveles altos de betaína en brotes y raíces, dicha acumulación de betaína, ya sea constitutiva o sal-inducida, puede ser una adaptación específica para la tolerancia a la sal en miembros silvestres y cultivados de las Chenopodiaceae, incluidos los miembros del género *Beta* spp. (Gregorio, 2010; Hanson & Wyse, 1982).

7.1.1 Hoja

Las hojas son basales grandes, ovales, con la base cordada y borde ondulado, las superiores menores, además son alternas, algo carnosas, las basales dispuestas en roseta, grandes (de hasta 20 cm de largo), pecioladas, a veces con el margen sinuado, las hojas superiores más chicas y casi sésiles, son de un color verde intenso, y los pecíolos, es decir los tallos de las hojas, son de color rojo o púrpura (Canals *et al.*, 2009).

7.1.2 Flor

Posee 2 o 3 flores glomeruladas en las que no se distingue el cáliz de la corola, la estructura que protege al ovario y/o a los estambres se llama perianto. El perianto se encuentra unido basalmente al ovario, hacia el ápice está dividido en 5 segmentos oblongos, de alrededor de 2 mm de largo, algo doblados longitudinalmente (carinados); estambres 5; estilos y estigmas de 2 a 4, aunque generalmente 3 (Zhu *et al.*, 2003).

7.1.3 Fruto y semilla

Debido a que las flores se pegan en su base y crecen juntas durante la maduración, los frutos formados son aglomerados que generalmente comprenden tantas semillas como flores había en el glómérulo, en realidad comercialmente las “semillas” corresponden a los frutos secos y duros y con frecuencia suelen ser denominados glomérculos, lotes de semilla o semilla multigérmén. Cada fruto contiene de 2 a 6 semillas de tamaño pequeño que asemejan a un frijol pequeño o munición, siendo por lo general de color café (Méndez, 2010).

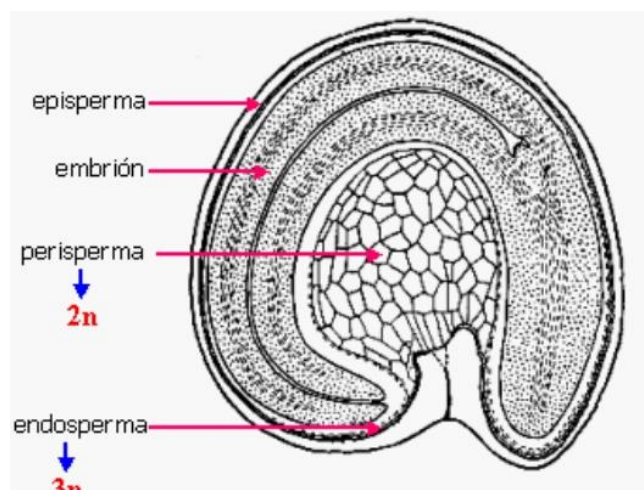


Figura 2. Estructura de la semilla de betabel. Extraído de:
<http://remolachafisio.blogspot.mx/2016/08/caracteristicas-fisiologicas.html>

7.1.4 Clasificación taxonómica

Reino.....Plantae

División.....Magnoliophyta

Clase.....Magnoliopsida

Familia.....Chenopodiaceae

Género.....*Beta*

Especie.....*vulgaris* L.

Autor.....Linneo

7.2 Distribución

El betabel, también conocido como remolacha o acelga es una planta que se cree tiene su origen en el Medio Oriente y de ahí se extendió desde la península de Escandinavia, Islas Canarias hasta la India y actualmente se distribuye en la mayor parte de las zonas templadas del mundo; en México tiene un estatus de planta exótica y se reporta su distribución en Baja California Norte, Baja California Sur, Chiapas, Coahuila, CDMX, Michoacán y Veracruz (Conabio, 2009), (Fig. 3).

Distribución Puntual de *Beta vulgaris* L. en México

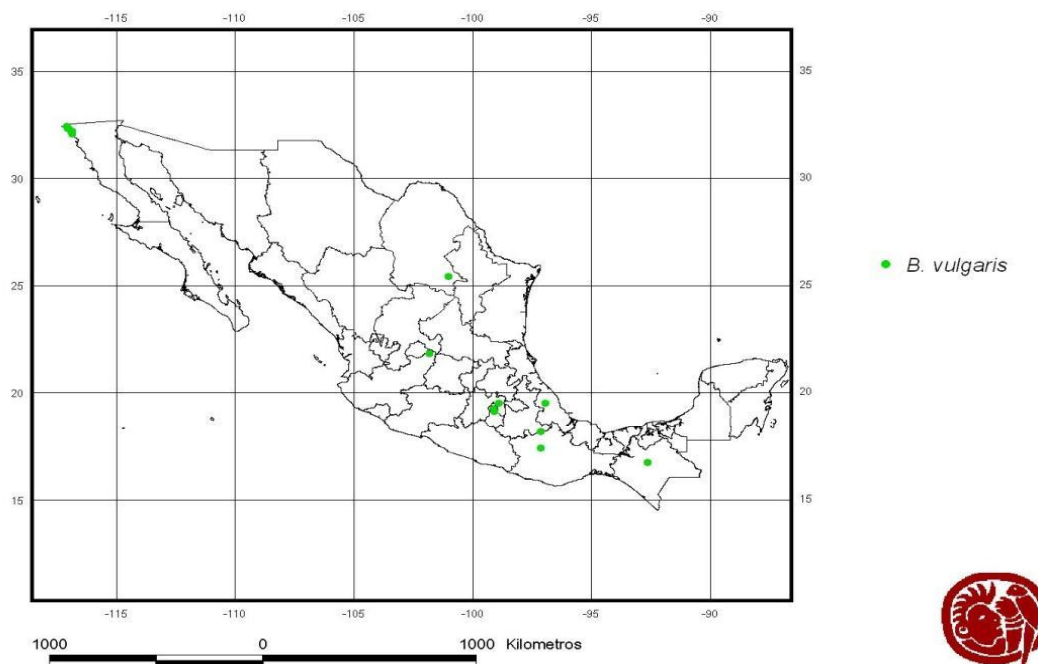


Figura 3. Distribución de *Beta vulgaris* en México. Extraído de: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/SIOVM_Base/Informacion_Externa/Beta/bvul_md pun.jpg

7.3 Importancia y producción de betabel

La remolacha azucarera o betabel (*Beta vulgaris*) constituye uno de los cultivos para la producción de azúcar más importantes en el mundo, puesto que proporciona aproximadamente el 30% del azúcar producida anualmente a nivel mundial, además es consumida como hortaliza y es utilizada como fuente de bioetanol y alimento para animales; el cultivo de betabel se ha realizado continuamente desde el siglo XVIII para promover el aumento de los rendimientos y superar los problemas que surgen en el cultivo del betabel (Kagami et al., 2015; Dohmet al., 2014). La producción mundial actual es de aproximadamente 234 millones de toneladas en alrededor de 5,9 millones de hectáreas, en México el cultivo de betabel alcanzó las 16 mil toneladas en el año 2016, siendo Puebla el estado con mayor producción con un promedio de 9 500 toneladas al año, Jalisco y el Estado de México también son productores de betabel (SAGARPA, 2017).

Las raíces de betabel se procesan para obtención de azúcar blanca, pulpa y melaza para alimentos, piensos o aplicaciones industriales aunque su uso como materia prima es escaso. Típicamente un bulbo de betabel está compuesto por un 75.9% de agua, 2.6% de no azúcares, 18.0% de azúcar y 5.5% de pulpa. En la fracción de azúcar, el 83.1% se recupera como sacarosa cristalina mientras que el 12.5% se recupera como melaza. Además del procesamiento de azúcar puro, también puede obtenerse un subproducto conocido como pulpa de remolacha azucarera seca. Esta pulpa se utiliza como alimento para bovinos y ovinos, se produce y se envía en formas planas, secadas con melaza y granuladas. Otro subproducto importante es la melaza de remolacha azucarera, un líquido viscoso que contiene aproximadamente un 48% de sacarosa, que no puede ser económicamente cristalizado. La melaza de remolacha azucarera se utiliza para la producción de levadura, productos químicos, productos farmacéuticos, así como en la producción de alimentos mixtos para el ganado (Canadian Food Inspection Agency, 2012).

Los principales productores a nivel mundial de betabel son Francia, Rusia, Alemania, Estados Unidos y Turquía con un volumen de producción de más de 15,73 millones de toneladas cuyo volumen fue destinado principalmente a la producción de azúcar (Statista, 2014), estos países también representan los mayores exportadores de betabel siendo Rusia el país con mayor volumen de exportación en el mundo (Fig. 4) (Actualitix, 2016).

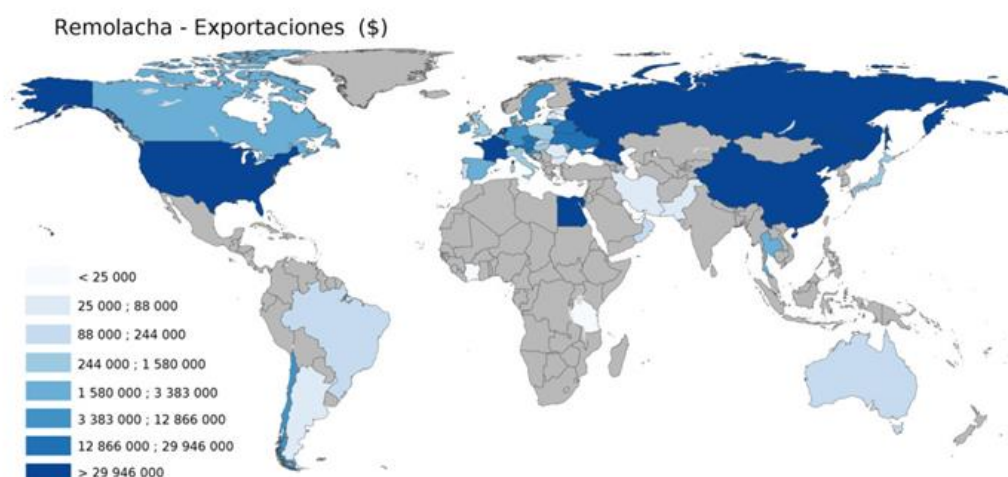


Figura 4. Principales exportadores de betabel en el mundo. Modificado de: <https://es.actualitix.com/pais/wld/remolacha-paises-exportadores.php>.

7.4 Betabel genéticamente modificado

Existen diversos eventos de betabel genéticamente modificado, si bien en México no se cuenta con permisos para su siembra, se tiene autorización por parte de la Secretaría de Salud para el consumo de betabel modificado con el evento transgénico H7-1 (COFEPRIS, 2010; BIOSAFETY SCANNER, 2017).

Los eventos transgénicos de betabel le confieren características específicas dirigidas a la resistencia a herbicidas y antibióticos, así como enfermedades causadas por virus y hongos. Se encuentran reportados 9 eventos.

Tabla 1. Eventos transgénicos existentes de betabel. Información extraída de BiosafetyClearing-House. Disponible en: <https://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=109070>.

EVENTO	CARACTERÍSTICAS	ELEMENTOS DEL CONSTRUCTO
ACS-BV001-3 - Liberty Link™ sugarbeet	Confiere tolerancia al herbicida glufosinato y al antibiótico kanamicina.	<ul style="list-style-type: none"> ● Promotor CaMV 35S ● Gen fosfatotricina N-acetiltransferasa ● Terminador CaMV 35S ● Promotor del gen sintasa de nopalina ● Neomicinafosfotransferasa II ● Terminador del gen OctopSintasa
KM-000H71-4 - Roundup Ready™ sugar beet	Resistencia al herbicida glifosato	<ul style="list-style-type: none"> ● Promotor FMV 35S ● Péptido de tránsito de cloroplastos 2 ● Gen 5-enolpyruvylshikimate-3-fosfato sintasa ● Terminador del gen rbcS-E9
SY-GTSB77-7 - InVigor™ SugarBeet	Resistencia al herbicida glifosato	<ul style="list-style-type: none"> ● Promotor FMV 35S ● Péptido de tránsito de cloroplastos 2 ● Gen 5-enolpyruvylshikimate-3-fosfato sintasa ● Terminador del gen rbcS-E9 ● Promotor mejorado de CaMV 35S ● Secuencia de codificación beta-glucuronidasa ● Terminador del gen rbcS-E9 ● Promotor FMV 35S ● Péptido de tránsito rbcS ● Gen de oxidoreductasa de glifosato ● Gen terminador de la NopalinaSintasa
SBVR111 rhizomania resistant sugar	Resistencia al virus de la necrosis de la	<ul style="list-style-type: none"> ● Promotor del gen 3 de ubiquitina ● Elemento genético RZM ● Elemento genético RZM ● Gen Terminator de Nopaliniasintasa

beet	remolacha	<ul style="list-style-type: none"> • Promotor del gen Heatshock proteína 80 • Gen fosfomanosaisomerasa • Terminador CaMV 35S 	
T227-1 Sugar beet modified for herbicide tolerance	Resistencia al herbicida glifosato, normalmente usado con fines de investigación.	<ul style="list-style-type: none"> • Promotor FMV 35S • Péptido de tránsito de cloroplastos 2 • Gen 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintasa • Terminador del gen rbcS-E9 	
T 210-3 Sugar beet modified for resistance to the Beet Necrotic Yellow Vein Virus	Resistencia al virus de la necrosis de la remolacha y al antibiótico kanamicina	<ul style="list-style-type: none"> • Promotor CaMV 35S • Proteína de la cubierta BNYVV • Terminador CaMV 35S • Promotor del gen sintasa de nopalina • Neomicinafosfotransferasa II • Gen TerminatorNopalinasantasa 	
T252 Sugarbeet modified for herbicide tolerance	Resistencia a glufosinato	<ul style="list-style-type: none"> • Promotor CaMV 35S • Phosphinothricin acetyltransferase gene • Terminador CaMV 35S 	N-
T120-7 Sugar beet modified for herbicide tolerance	Resistencia a los antibióticos kanamicina y neomicina. Resistencia al glufosinato	<ul style="list-style-type: none"> • Promotor CaMV 35S • Phosphinothricin acetyltransferase gene • Terminador CaMV 35S • Promotor del gen sintasa de nopalina • Neomicinafosfotransferasa II • Terminator del gen de OctopSynthase 	N-
TAD13, TAD 18, TAD28, TAD33 and TAD44. Sugar beet modified for herbicide and fungus resistance	Resistencia a enfermedades y plagas producidas por hongos. Resistencia a glufosinato.	<ul style="list-style-type: none"> • Promotor mejorado 35S de CaMV • Phosphinothricin acetyltransferase gene • Terminador CaMV 35S • Promotor mejorado 35S de CaMV • Líder no traducido de Omega 5 • Gen de proteína 1 tipo Defensina • Gen TerminatorNopalinasantasa 	N-

7.5 Evento KM-ØØØH71-4

En el año 2006 la empresa Monsanto desarrollo el evento de transformación H7-1 de betabel mediante la técnica de transferencia de ADN mediada por *Agrobacterium*, modificando el cultivar original 3S0057 a través de la inserción de la 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintasa (EPSPS) de *Agrobacterium tumefaciens* con el vector plásmido binario *PV-BVGT08* (figura 5). Dicha modificación le confiere tolerancia ante herbicidas a base de glifosato, gracias a

la actividad de la enzima CP4 EPSPS expresada por el transgen (BIOSAFETY SCANNER, 2017; BCH, 2012).



Figura 5. Constructo del evento H7-1. Extraído de: biosafetyscanner.org/mostraevento.php?dascheda_evento=38&id=28&dascheda=26.

Los herbicidas a base de glifosato mejor conocidos como Roundup ready son utilizados para el control de malezas ya que presentan toxicidad para las plantas a través de la inhibición competitiva a la enzima Enolpiruvilshikimato-fosfato-sintetasa, que forma parte de la vía metabólica del ácido shikímico impidiendo así la formación del ácido clorísmico y por lo tanto inhibiendo la síntesis de aminoácidos aromáticos (figura 6). Además también se inhibe la síntesis de carotenoides y clorofila, por lo que la planta muere cuando esté en crecimiento. Cabe destacar que la ruta del proceso bioquímico del shikimato no se encuentra en animales por lo que el glifosato no es considerado tóxico para animales como lo es para las plantas (de la Torre, 2011).

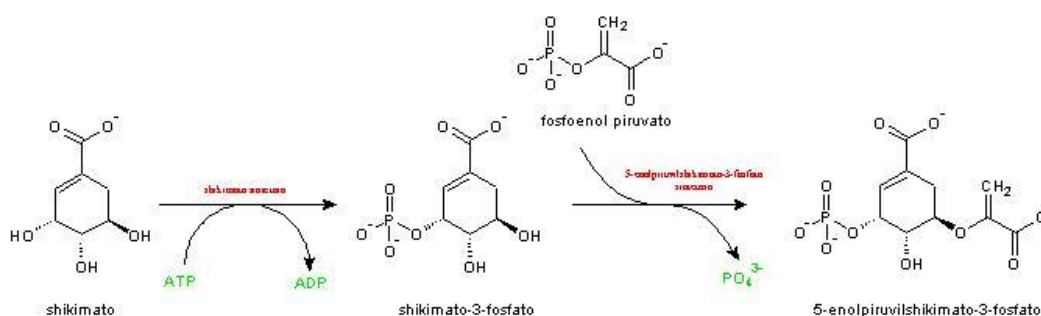


Figura 6. Mecanismo de acción del glifosato. Extraído de: <http://didacforner.net/glifosato-un-nuevo-cancerigenos-para-humanos-ampliamente-comercializado/>.

7.6 Técnicas de transformación de plantas mediante ingeniería genética

La transformación genética de un organismo es un proceso complejo que se desarrolla en diversas etapas que comprenden la inserción, integración, expresión y herencia del DNA nuevo. Los métodos de transformación a menudo requieren el uso de vectores bacterianos o virales, así como la transferencia directa de genes en ambos casos el método elegido dependerá de la especie en cuestión (Paredes, 2013).

7.6.1 Tecnología del ADN recombinante

Se conoce como tecnología del ADN recombinante a un conjunto de técnicas moleculares utilizadas para localizar, aislar, alterar y estudiar segmentos de ADN, el término recombinante se utiliza precisamente porque el objetivo de estas técnicas es combinar ADN de diferentes fuentes (López, 2017).

Los procedimientos básicos incluyen los siguientes pasos (Cultek, 2006):

1. Se generan los fragmentos de DNA con la ayuda de enzimas denominadas endonucleasas de restricción, las cuales reconocen y cortan secuencias nucleotídicas específicas de moléculas de DNA.
2. A través de la digestión con enzimas de restricción se producen fragmentos que se unen a otras moléculas de ADN plasmídico que sirven de vectores. Dichos vectores pueden replicarse de manera autónoma en una célula hospedera lo que facilita la manipulación de la molécula de ADN recombinante recién creada.
3. El vector lleva el segmento de ADN que se le ha insertado, formando así una molécula de ADN recombinante que se trasfiere a la célula hospedera; una vez dentro la molécula de ADN recombinante se replica, produciendo docenas de copias idénticas conocidas como "clones".
4. Las células descendientes heredarán el ADN recombinante cuando las células hospederas se repliquen, obteniéndose una población de células iguales que contendrán la secuencia clonada.

5. Posteriormente los segmentos de ADN clonados pueden recuperarse de las células huésped, purificarse y analizarse.

6. Potencialmente, el ADN clonado puede transcribirse, su ARNm puede traducirse, y el producto génico puede aislarse y examinarse

7.6.2 Biobalística

Se trata de una técnica basada en la utilización de microproyectiles recubiertos del DNA que se desea transferir, estos son disparados sobre los tejidos vegetales a altas velocidades, de esta forma atraviesan la pared y la membrana celular y llevan al interior de la célula los genes de interés para su posterior integración en el genoma vegetal. Para lograr la transformación se requiere de un dispositivo mecánico que realice el bombardeo de los tejidos vegetales a velocidades muy altas, es decir, velocidades supersónicas y de esta manera atravesar las membranas celulares y llegar al núcleo de las células blanco. Para lograr esto, existen tres sistemas: por explosión de pólvora seca, por variación de fuerza de aceleración, a través de descarga eléctrica o por liberación de gas comprimido a alta presión (aire, helio, CO₂ o N₂). Los microproyectiles empleados son partículas aproximadamente esféricas (microesferas), elaboradas de materiales densos, como el oro o tungsteno, de diámetros variados, que pueden ir desde los 0,4 µm hasta 4 µm. El casete de expresión con los genes de interés puede ir o no en un vector, ya que no es requerido para el proceso de transformación. El casete de expresión debe ser adherido a los microproyectiles y para esto, se han diseñado varias metodologías, entre las más utilizada es la que emplea cloruro de calcio y espermidina, para la precipitación del DNA sobre los micorproyectiles (Díaz & Chaparro-Giraldo, 2012).

7.6.3 Vectores virales

Existen diversos virus capaces de infectar especies vegetales, esta característica ha sido aprovechada para la transformación de plantas al usarlos como vectores con el objetivo de producir proteínas de interés; para lograr esto los virus deben ser modificados para que sean capaces de transportar el gen de interés al interior de la célula vegetal. La estrategia más empleada, es

donde el gen foráneo, es introducido dentro del virus por completo, generalmente, precedido por el promotor duplicado de la proteína de la cápside del virus (promotor fuerte) o fusionado a ésta, para que el gen de interés sea expresado como un RNA subgenómico separado. En la segunda y reciente estrategia desarrollada, el virus se reconstruye completamente eliminando o sustituyendo regiones virales, además de la inserción del gen de interés. Finalmente, estos vectores virales pueden ser empleados en la transfección de la planta, como una partícula viral madura o como copias del vector viral (Díaz & Chaparro-Giraldo, 2012).

7.6.4 Microinyección

La microinyección es una técnica que consiste en introducir ADN foráneo a una célula viva por medio de una micropipeta de vidrio. La técnica consiste en que un extremo de la micropipeta de vidrio se calienta hasta poder estirarla y así formar una punta muy fina en el extremo calentado. La punta de la pipeta alcanza aproximadamente 0,5 mm de diámetro dando un parecido a una aguja de inyección. El proceso se lleva a cabo bajo un poderoso microscopio. Las células a microinyectar se colocan en un recipiente. Una pipeta de sujeción se coloca en el campo de visión del microscopio. La pipeta de retención contiene una célula objetivo en la punta cuando se succiona suavemente. La punta de la micropipeta se inyecta a través de la membrana de la célula. El contenido de la aguja se administra en el citoplasma y se saca la aguja vacía (Biocyclopedia, 2018).

7.6.5 Electroporación

Como su nombre lo dice la electroporación consiste en la aplicación de pulsaciones eléctricas que ocasionan la permeabilidad temporal en una célula huésped y de su núcleo, permitiendo así la entrada de una suspensión en la que están contenidas miles de copias de la construcción que se quiere introducir. A partir de este método se obtienen células transformadas, de las cuales por medio de técnicas in vitro se obtiene una plántula completa, posteriormente éstas plántulas son caracterizadas molecularmente para determinar el número de copias del transgen (Bazán, 2015).

7.6.6 Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens es una bacteria gram negativa considerada un patógeno vegetal, puesto que causa tumores en las plantas, esta enfermedad es conocida como agalla de corona. *A. tumefaciens* induce este crecimiento tumoral transfiriendo al huésped una parte de su ADN (ADN-T) que se encuentra en su plásmido (Ti) inductor de tumores de 200 kbp. Después de la integración en el huésped, se expresan los genes que se localizan naturalmente en este T-ADN y codifican enzimas para la producción de reguladores del crecimiento de las plantas; y su expresión da como resultado un crecimiento incontrolado de las células vegetales. El plásmido Ti también contiene otro segmento llamado región de virulencia, que se compone de una gran cantidad de genes que son necesarios para la tumorigenicidad. Las proteínas codificadas por la región de virulencia están implicadas en la formación, transporte y posiblemente también la integración del ADN-T. La región T del plásmido Ti está rodeada por una repetición de borde de 24 pb, que es la señal que actúa en cis para el sistema de suministro de ADN a células de planta. De esta manera todas las secuencias del ADN-T natural pueden eliminarse y reemplazarse por otras secuencias de ADN sin un efecto negativo en la transferencia de ADN foráneo. Para la transformación de plantas y hongos en la actualidad, se usa el sistema denominado de vectores binarios. En este sistema binario, el ADN T y la región de virulencia se colocan en dos plásmidos separados, lo que permite la manipulación genética del ADN-T pequeño que contiene el vector binario (Michielse *et al.*, 2005).

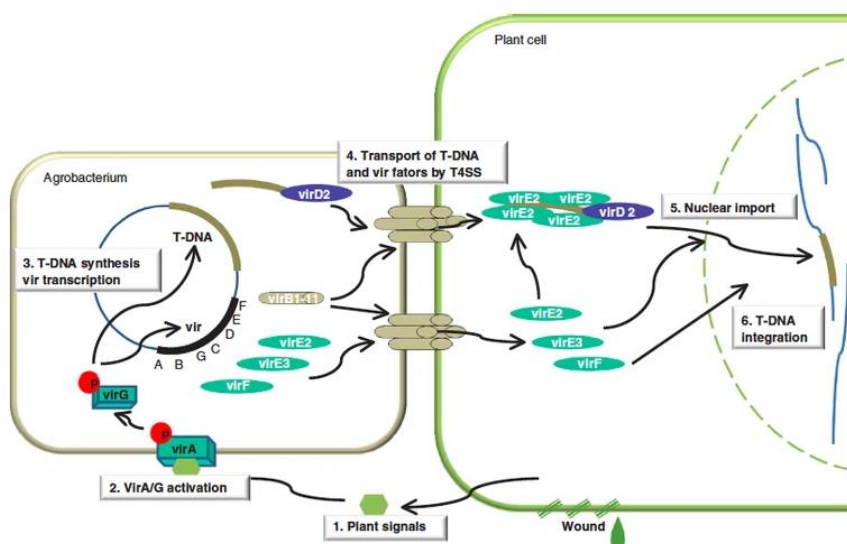


Figura 7. Mecanismo de infección de *A. tumefaciens*. (Pitzschke and Hirt, 2010)

7.6.7 Promotor CaMV y terminador T-NOS

A menudo cuando se requiere expresar el transgen en una planta debe haber un elemento que permita su transcripción, es decir, un promotor. El más utilizado es CaMV, promotor del virus del mosaico de la coliflor; es común también el uso de la secuencia de terminación de la transcripción T-NOS y el gen de terminación de la nopalina sintetasa, el cual procede de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Todas estas secuencias son utilizadas ampliamente en los constructos de plantas transgénicas, de este modo la amplificación de estas secuencias nos puede indicar si se trata de una planta a la que se le ha introducido un transgen, sin necesidad de conocer la secuencia específica de dicho gen (López, 2017).

7.7 Detección de organismos genéticamente modificados

7.7.1 Técnica de Inmunoensayo

Mejor conocida como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), por sus siglas en inglés, esta técnica tiene como fundamento la detección de antígenos o anticuerpos en una muestra. La identificación de los complejos Ag-Ac, se hace mediante el empleo de enzimas, bien unidas al antígeno, o bien unidas al anticuerpo. El ensayo de ELISA puede ser directo o indirecto, y consta de los siguientes pasos: Primeramente se realiza la fijación al soporte insoluble de

anticuerpos específicos del agente a detectar. Posteriormente se añade la muestra con el antígeno y por último se adiciona el anticuerpo secundario marcado con la enzima que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble, este producto es cuantificado mediante un lector de ELISA, la diferencia entre directo e indirecto consiste en que en el método directo, si el antígeno está presente en la muestra, este se une al anticuerpo ligado a enzimas; cuando un sustrato incoloro se añade, un color se desarrolla, lo que indica la presencia de antígeno. En el ELISA indirecto, el antígeno se lleva a cabo en las paredes de la placa. Cuando una muestra sospechosa de contener anticuerpos se añade, una reacción antígeno-anticuerpo se produce. A continuación, un anticuerpo secundario ligado a enzimas capaces de reaccionar con la región no unida del anticuerpo, se añade. Cuando el sustrato incoloro se añade, conduce al desarrollo de color si la muestra utilizada contiene anticuerpos. Como enzimas se suelen utilizar la peroxidasa, la galactosidasa o la glucosa oxidasa (Calderón, 2007).

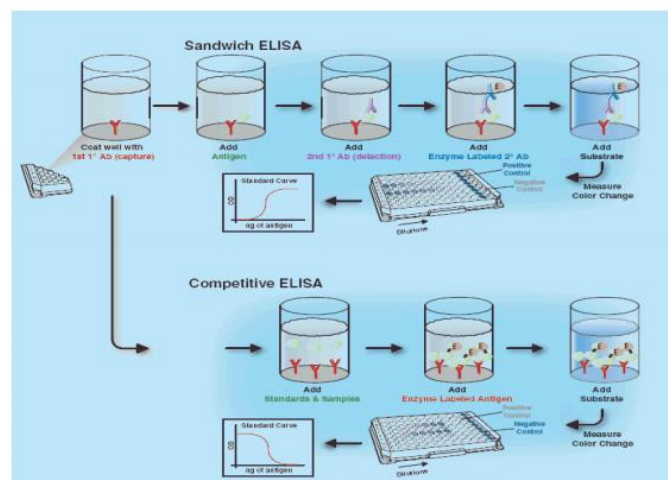


Figura 8 Principio de la técnica ELISA. (Calderon, 2007).

7.7.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa, también conocida como PCR (Por sus siglas en inglés) es una reacción enzimática realizada de manera in vitro que permite la amplificación de una secuencia específica de ADN millones de veces durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Dicha técnica se basa la reacción en la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las

células. En la reacción, si se usa ADN genómico como sustrato, entonces se habla de una PCR punto final, pero si usamos ADN complementario (ADNc) proveniente del ARNm (ácido ribonucleico mensajero), se le conoce como RT-PCR (Reverse Transcription-PCR, por sus siglas en inglés); esta técnica cumple con los requisitos de especificidad y sensibilidad que exigen la caracterización de los ácidos nucleicos, permitiendo detectar a través de ella la presencia de estas biomoléculas en una muestra de manera sencilla, incluso cuando las cantidades se enmarcan en el orden de los picogramos (Tamay *et al.*, 2013). Para que la reacción se lleve a cabo son necesarios diversos elementos, el templado o molde (ADN o ADNc), una enzima adecuada, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), iones de magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión (Costa, 2004).

➤ Etapas de la PCR

Desnaturalización: Durante esta etapa las cadenas complementarias del material genético Diana se desnaturalizan o separan mediante el aumento de la temperatura de reacción, la cual se eleva típicamente entre 92°C-95°C durante un tiempo que va de 30 a 90 s.

Alineamiento: En el alineamiento los cebadores o primers se aparean de manera específica con las cadenas simples del ADN desnaturalizado, para lo cual se disminuye la temperatura de la reacción hasta 50 ó 60°C. Este paso tiene una duración de 30 a 60 segundos.

Extensión: Una vez apareados los cebadores a la secuencia específica de DNA la ADN polimerasa extiende la longitud de los fragmentos iniciadores, originando nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas del ADN desnaturalizado presente al inicio de la reacción, para esto la temperatura debe aumentarse hasta 70 ó 74°C. Esta etapa tiene una duración promedio de 30 a 90 s.

El próximo ciclo se inicia en el mismo tubo, con los mismos componentes de la mezcla de reacción que se han puesto en cantidad suficiente desde el primer ciclo, solo que ahora existe el doble de cadenas sencillas de ADN blanco a copiar (Pedrosa 1999).

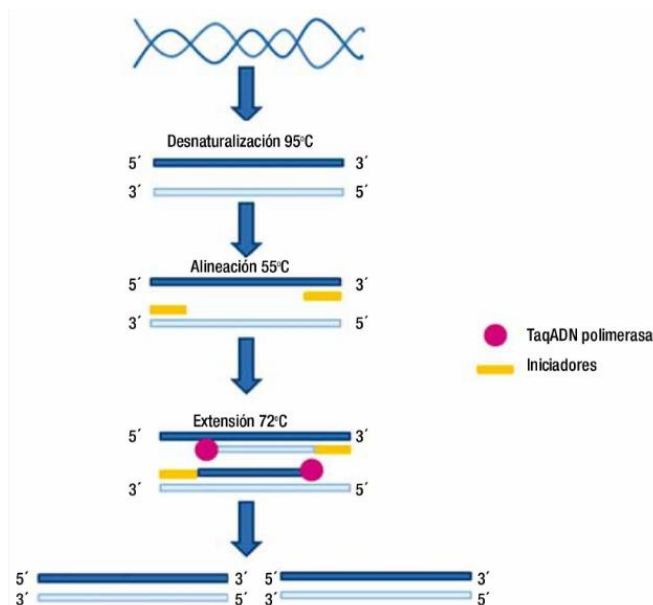


Figura 9. Esquema general de las etapas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Extraído de: <http://www.elsevier.es/pt-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-herramientas-moleculares-su-utilidad-el-X1665920113270127>.

7.7.3 PCR en tiempo real

En 1992 Higuchi y colaboradores sentaron las bases de la técnica de PCR en tiempo real mediante el uso de reporteros fluorescentes; esta técnica tiene su fundamento en la PCR punto final, sin embargo el término tiempo real hace referencia a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción, por lo que es posible cuantificar la cantidad de ADN en la muestra. Estas dos características representan una ventaja sobre otros métodos de detección, esto se logra gracias a los fluoróforos utilizados para el monitoreo de la amplificación del ADN durante la PCR (Martínez, 2017).

7.7.4 Sondas para PCR

Actualmente existen cuatro tipos de químicas diferentes, para la llevar a cabo PCR en tiempo real. Todas estas químicas permiten la detección de productos de PCR mediante la generación de una señal fluorescente. Las sondas TaqMan, las balizas moleculares y los escorpiones dependen de un fenómeno

llamado FRET que se basa en la transferencia de energía de resonancia de Förster para generar la señal de fluorescencia a través del acoplamiento de una molécula de colorante fluorogénico y un silenciador a los mismos o diferentes sustratos de oligonucleótidos. Por su parte SYBR Green es un colorante fluorogénico que exhibe poca fluorescencia cuando está en solución, pero emite una fuerte señal fluorescente al unirse al ADN bicatenario (Dharmaraj, 2017).

7.7.5 Sondas de hidrólisis Taqman

Estas sondas consisten en oligonucleótidos de unión específica al ADN blanco, contienen un fluorocromo donador (reportero) en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor (quencher) ubicado en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Las sondas de hidrólisis dependen de la actividad 5'-exonucleasa de la ADN polimerasa que al desplazarse a lo largo de la cadena en su acción de síntesis hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador, para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor, Sin embargo, durante la amplificación de ADN blanco, la Taq polimerasa, que tiene actividad 5' exonucleasa, Como donador y aceptor están ahora espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (Sergio et al., 2006).

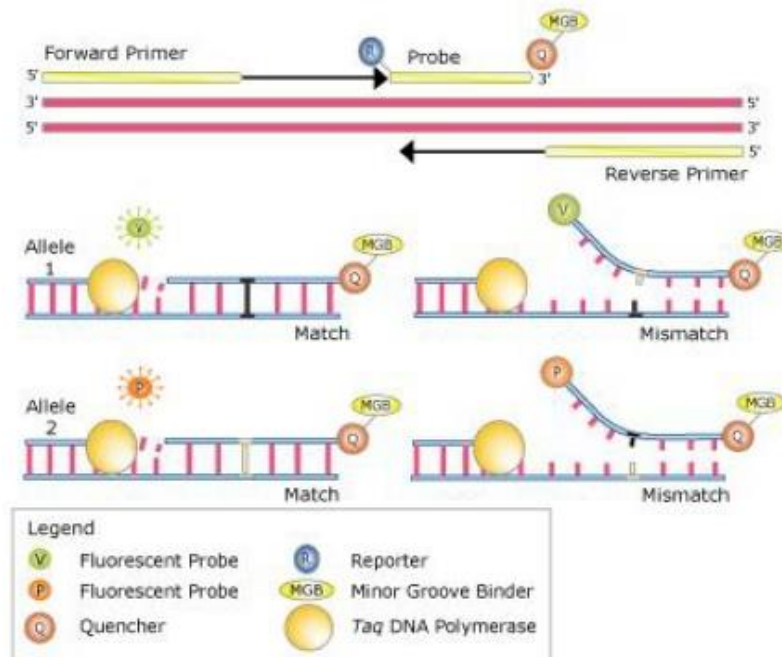


Figura 10. Fundamento de sondas de hidrólisis. Extraído de: <http://labforum.foroactivo.com/t13-experimentos-de-genotipado-con-sondas-taqman>

7.7.6 Balizas moleculares

Las balizas moleculares al igual que las sondas Taqman tienen su fundamento en el FRET para detectar y cuantificar el producto de PCR sintetizado a través de un flúor acoplado al extremo 5'y un enfriamiento unido al extremo 3' de un sustrato de oligonucleótido. Sin embargo se caracterizan, están diseñadas de modo que permanezcan intactas durante la reacción de amplificación, y deben volver a unirse al objetivo en cada ciclo para la medición de la señal. Las balizas moleculares forman una estructura de tallo y bucle cuando están libres en solución. Por lo tanto, la proximidad de las moléculas de flúor y enfriamiento impide que la sonda florezca. Cuando una baliza molecular se hibrida con un objetivo, el colorante fluorescente y el quencher se separan, FRET no se produce y el colorante fluorescente emite luz tras la irradiación (Dharmaraj, 2017).

7.7.7 Sonda Scorpion

Con las sondas Scorpion, el cebado específico de la secuencia y la detección del producto de la PCR se logra usando un solo oligonucleótido. La sonda Scorpion mantiene una configuración de bucle-tallo en el estado no hibridado. El fluoróforo se une al extremo 5' y es inactivado mediante un resto acoplado al extremo 3'. La porción 3' del vástago también contiene una secuencia que es complementaria al producto de extensión del primero. Esta secuencia está unida al extremo 5' de un primer específico a través de un monómero no amplificable. Después de la extensión del Scorpion, la secuencia de la sonda específica es capaz de unirse a su complemento dentro del amplicón extendido abriendo así el circuito de la horquilla. Esto evita que la fluorescencia se apague y se observe una señal (Dharmaraj, 2017).

7.7.8 SYBR Green

Es un colorante fluorescente de uso común que se une a moléculas de ADN bicatenario intercalándose entre las bases de ADN y emite luz con la excitación, de este modo permite la cuantificación de ADN de una secuencia blanco, ya que a medida que se acumula el producto aumenta la fluorescencia. Se utiliza en PCR cuantitativa porque la fluorescencia se puede medir al final de cada ciclo de amplificación para determinar, relativa o absolutamente, cuánto ADN se ha amplificado. Tiene la ventaja de ser económico, sensible y fácil de usar, sin embargo tiene la capacidad de unirse a ADN bicatenario en la reacción, incluidos los dímeros de cebadores y otros productos de reacción no específicos, lo que da como resultado una sobreestimación de la concentración objetivo (Dharmaraj, 2017).

7.7.9 Limitaciones de PCR y RT-PCR

La reacción de PCR comienza a generar copias de la secuencia diana de manera exponencial. Para cuantificar la cantidad de ADN de la secuencia objetivo contenido en la muestra que se tenía inicialmente, debe hacerse una extrapolación del ADN obtenido en la reacción, sin embargo, esto sólo puede realizarse durante la fase exponencial. Debido a los inhibidores de la reacción de polimerasa encontrados en la muestra, la limitación del reactivo, la acumulación de moléculas de pirofosfato y el autoanclaje del producto

acumulado, la reacción de PCR finalmente deja de amplificar la secuencia diana a una velocidad exponencial y se produce un "efecto meseta" lo que provoca que hacer que la cuantificación del punto final de los productos de PCR no sea confiable (NCBH, 2017).

El Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria a través del Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados, (CNRDOGM), realiza el análisis para la detección, identificación y cuantificación de OGM's. Para ello se utilizan técnicas moleculares que permitan detectar los eventos de modificación genética que se llevan a cabo en especies de interés agroalimentario (SENASICA,2016). Hoy en día la técnica más utilizada para la detección de OGM's es la Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real puesto que es un método simple, además de tener alta especificidad y sensibilidad, conjuntamente con confiabilidad en la instrumentación y en los protocolos desarrollados. Esta tecnología es altamente competitiva y permite detectar incluso la presencia de una sola secuencia de ADN en una muestra.

7.7.10 Limite de detección (LoD)

El límite de detección o LoD se refiere a la concentración de analito más baja que es probable que se distinga de forma confiable y por lo tanto en la que la detección es factible. Bajo un enfoque tradicional y típico, estimar LoD consiste en medir repeticiones, usualmente $n = 20$, de un calibrador cero o muestra en blanco, determinando el valor medio y desviación estándar (SD), y calculando LoD como la media $+2$ SD. Las variaciones de este enfoque utilizan la media más 3, 4 o incluso 10 SD para proporcionar un LoD más conservador. La suposición es que si el analito está presente, producirá una señal mayor que el ruido analítico en ausencia de analito. Este es un método simple y rápido. La debilidad es que no hay evidencia objetiva para demostrar que una baja concentración de analito producirá una señal distinguible de una muestra en blanco (concentración cero) (Armbruster&Pry, 2008).

7.7.11 Límite de cuantificación (LoQ)

LoQ es la concentración más baja a la que el analito no solo puede detectarse con fiabilidad, sino que se cumplen algunos objetivos predefinidos de sesgo e imprecisión. Originalmente fue desarrollado como una herramienta de diagnóstico clínico para caracterizar el rendimiento del ensayo de la hormona estimulante del tiroides (TSH), en la distinción de eutiroidismo de pacientes hipertiroides a bajas concentraciones de TSH. Se puede esperar que el LoD esté por debajo de la sensibilidad funcional de un ensayo. Sin embargo el LoQ puede ser equivalente al LoD o podría estar a una concentración mucho más alta; no puede ser más bajo que el LoD (Armbruster&Pry, 2008).

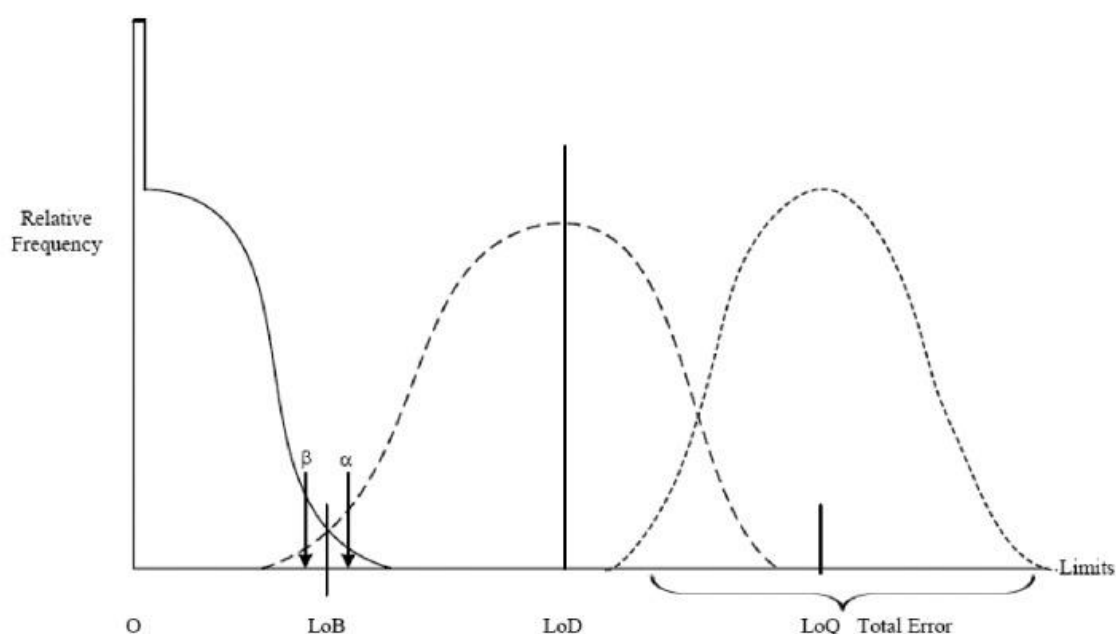


Figura 11. Relación entre Límite de blanco, límite de detección y límite de cuantificación (Armbruster&Pry, 2008).

7.8 Métodos de extracción de ADN

En la extracción de los ácidos nucleicos del material biológico es necesario como primer paso provocar una lisis celular, además de inactivar las nucleasas celulares y separar los ácidos nucleicos de los restos de células. Un procedimiento de lisis idóneo suele consistir en un equilibrio de técnicas y ha de ser suficientemente fuerte para romper el material inicial complejo, pero suficientemente suave para preservar el ácido nucleico diana. Entre los procedimientos usuales de lisis están la rotura mecánica (trituration, lisis

hipotónica, etc.); tratamiento químico (detergentes, agentes caotrópicos, reducción con tioles, etc.); digestión enzimática (Proteínasa K, etc.). Después de la lisis celular y la inactivación de las nucleasas, los restos de células se eliminan fácilmente por filtración o precipitación. (Commission, 2010) Existen diferentes métodos para la extracción de ADN, uno de ellos es el método del bromuro de cetil- trimetil amonio (CTAB) el método es adecuado para extraer y purificar ADN de vegetales, sin embargo, presenta el inconveniente de utilizar disolventes que pueden ser inhibidores de la PCR. De forma comercial se han desarrollado kits de extracción de ADN, la extracción realizada por medio de kits comerciales tienen la ventaja de no utilizar componentes orgánicos y minimizar los pasos en el protocolo, lo que conlleva a una extracción más rápida, sin embargo suelen ser más caros y estar limitados en cuanto a las reacciones, la mayoría de estos kits basan su función en el mecanismo básico es el intercambio reversible de los iones en solución con los grupos funcionales unidos covalentemente a una fase estacionaria insoluble llamada resina y en el uso de perlas magnéticas. De esta manera, un ácido nucleico con carga negativa a pH 7,0 se unirá a un intercambiador iónico con grupos cargados positivamente, pero eluirá de la columna al cambiar el pH del tampón (tampón de elución) ya que los iones del tampón de elución interaccionan con los grupos cargados del ácido nucleico o del intercambiador iónico, respectivamente; primero eluirán de la columna las moléculas cargadas positivamente que no se unen a la fase estacionaria y posteriormente, al añadir el tampón de elución, eluirán las moléculas con poca carga negativa neta y luego las de mayor carga negativa neta. (Velázquez *et al.*, 2008).

7.9 Regulación de organismos genéticamente modificados

Ante el creciente número de OGMs que se cultivan en el mundo, se requieren los instrumentos jurídicos que permitan la regulación de las actividades que involucren a los mismos, en México la legislación en materia de OGM atienden a las necesidades nacionales e internacionales, ya que como nación ha firmado una serie de instrumentos internacionales de aplicación obligatoria.

7.9.1 Internacional

Es innegable la controversia que ha generado en las últimas décadas el tema de los OGM's, de aquí la importancia de profundizarlo y sobretodo de contar con los elementos que permitan tener una idea más acertada para poder emitir juicios y sobretodo asegurar la bioseguridad alimentaria

México es un país con un gran potencial en producción y exportación de hortalizas, puesto que en 2012 el volumen de producción de las hortalizas creció 8.6 por ciento, en comparación con el promedio del lapso 2000-2005, con un valor promedio anual de 38 mil millones de pesos (SAGARPA, 2012). En el período comprendido entre el año 2000 y 2001, México llegó a ocupar el tercer lugar en el comercio mundial de frutas y hortalizas, exportando aproximadamente un 7% del total mundial, entre las cuales se encuentra el betabel. Todas las exportaciones de productos a son reguladas por el régimen aplicable a las frutas y hortalizas frescas (Comisión Europea, 2003), sin embargo, existen normas y protocolos aplicables de manera internacional para la exportación, importación, uso y consumo de alimentos y específicamente para los que se relacionan con OGM's.

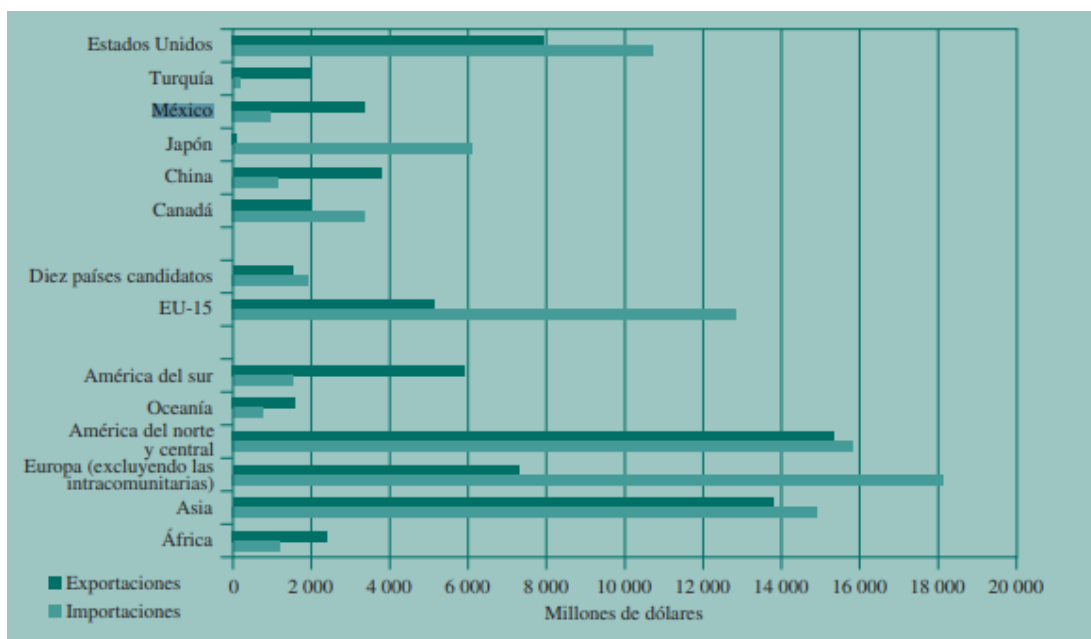


Figura 12. Importaciones y exportaciones mundiales de frutas y hortalizas (media de 2001/01). Fuente: Fao, 2013.

Esto es especialmente importante ya que dependiendo de la región a la que se desee exportar es necesario revisar la legislación aplicable, en la Unión

Europea por ejemplo, el Reglamento (CE) nº 1830/2003 relativo a la trazabilidad y al etiquetado de OGM's y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de estos, se establece que un producto debe ser etiquetado cuando el porcentaje de OGMs presentes sea superior al 0.9%, además de comunicar los identificadores únicos asignados a cada OGM y en el caso de los piensos identificar cada ingrediente producido a partir de OGM (Parlamento Europeo, 2003).

a) Protocolo de Cartagena

El documento principal para la regulación de los OGM's en materia internacional es el protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica (CDB) el cual entró en vigor el 11 de Septiembre de 2003, este documento sirve de herramienta para conservar el medio ambiente y garantizar la seguridad en el ámbito de la biotecnología. Dicho protocolo establece los parámetros de regulación para los movimientos transfronterizos de exportación e importación, así como la manipulación y utilización de organismos vivos modificados entre países firmantes. México se encuentra entre los países que participan activamente en las negociaciones del protocolo de Cartagena y forma parte de este tratado junto con otros 146 países (Acevedo, 2009). En el año 2000 México firmó el Protocolo de Cartagena y lo ratificó en el 2002 por acuerdo del Senado de la República, lo que se traduce en que sus autoridades apliquen las disposiciones de este tratado internacional para asegurar un uso responsable de biotecnología aplicada a los OGM's (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000).

b) Protocolo de Nagoya

El convenio sobre la diversidad biológica aborda ampliamente los temas relacionados con el manejo de la biodiversidad, por lo que se plantea entre sus objetivos más importantes la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de recursos genéticos y es precisamente este último objetivo del cual deriva el protocolo de Nagoya sobre acceso a los recursos genéticos y participación justa y equitativa en los

beneficios que se deriven de su utilización, que tras varias negociaciones fue adoptado en el 2010. Dicho protocolo da mayor impulso al e proporciona una base sólida para una mayor certeza y transparencia jurídicas tanto para los proveedores como para los usuarios de recursos genéticos.

c) Protocolo de Nagoya-Kuala Lumpur

Se trata de un protocolo suplementario al protocolo de Cartagena con el que se hace hincapié en temas de responsabilidad y compensación dado que adopta un perspectiva administrativa para proporcionar medidas de respuesta en aquellos casos en que haya daños o probabilidad suficiente de daños a la conservación y utilización sostenible de la diversidad biológica como resultado de organismos vivos modificados cuyo origen provenga de movimientos transfronterizos. Este protocolo tiene como objetivo impedir daños a la diversidad biológica así como ofrecer medidas de creación de confianza en el desarrollo y aplicación de la biotecnología moderna (Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2011). México ratificó su adición en el 2012, sin embargo el número requerido de ratificaciones para su entrada se alcanzó recientemente por lo que se anunció su entrada en vigor el pasado 5 de marzo de 2018; hasta el día de hoy se cuenta con 41 países adheridos a este protocolo.

7.9.2 Nacional

Ley de Bioseguridad de OGM (LGOGM)

Esta ley publicada en 2005 tiene como objetivos regular las actividades que conlleven el uso de OGMs desde su utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, así como importación y exportación, con el fin de prevenir, evitar o reducir los riesgos que puedan derivar de estas actividades y que pudieran ocasionar problemas a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola.

De acuerdo con la LBOGM debe impedirse la entrada al territorio nacional de OGMs y productos que los contengan, siempre que en que dichos organismos y productos no cuenten con permiso y/o autorización, según corresponda, para su importación tal como se establece en su artículo 18 de dicha ley, a su vez se menciona en el artículo sexto que los OGMs o productos que los contengan, autorizados por la Secretaría de Salud (SSA) por su inocuidad y que sean para consumo humano directo, deberán garantizar la referencia explícita de organismos genéticamente modificados y señalar en la etiqueta la información de su composición alimenticia o sus propiedades nutrimentales, cuando dichos productos posean características que los hagan significativamente diferentes respecto de los productos convencionales, y además cumplir con los requisitos generales adicionales de etiquetado conforme a las normas oficiales mexicanas que expida la SSA, de acuerdo con lo dispuesto en la Ley General de Salud y sus disposiciones reglamentarias, con la participación de la Secretaría de Economía.

Adicionalmente en el año 2009 fue emitido el reglamento de la LBOGM en el que se demarcan los lineamientos correspondientes a los permisos, autorizaciones y revisiones de OGMs, así como establecer las zonas restringidas de dichos organismos.

Por otra parte la Norma Oficial Mexicana NOM-164 establece los criterios a incluir en los reportes de resultados de las liberaciones realizadas OGMs, ya sea en etapa experimental o en programa piloto, en relación con los posibles riesgos para el medio ambiente y la diversidad biológica, así como la sanidad animal, vegetal y acuícola. Dicha Norma tiene aplicación en todo el territorio nacional donde se lleven a cabo liberaciones de OGM por parte de los titulares de los permisos en el ámbito de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados y su Reglamento.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGARPA) tiene las atribuciones de analizar y evaluar los posibles riesgos que las actividades con OGMs pudieran ocasionar a la sanidad animal, vegetal y acuícola, así como resolver y expedir permisos para la realización de actividades con OGM en etapas experimental, piloto y comercial. Realizar el monitoreo de los efectos que pudiera causar la liberación de OGM, inspeccionar y vigilar el cumplimiento de la LBOGM, sus reglamentos y las normas oficiales mexicanas que deriven de la misma; ordenar y aplicar las medidas de seguridad o de urgente aplicación, con bases técnicas y científicas.

Por esa razón SAGARPA través del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) realiza el monitoreo y vigilancia de los organismos genéticamente modificados para lo cual se creó el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados de SENASICA (CNRDOGM), primer laboratorio en México acreditado para detectar OGM's, El CNRDOGM se encarga de la detección, identificación y cuantificación de organismos genéticamente modificados de interés agroalimentario relacionados con la utilización confinada, experimental, planta piloto y comercial, conllevando a un monitoreo e inspección a nivel nacional.

8. MATERIALES Y MÉTODO

Los materiales utilizados en este proyecto se describen a continuación:

8.1 Materiales

- Mezclas de harina de betabel con diferentes porcentajes del evento específico KM-ØØØH71-4 (Ver tabla 5). Las harinas utilizadas corresponden a los materiales de referencia MR941 que corresponde al material con el evento transgénico y el MR 1459 que no contiene ningún evento transgénico, estos materiales fueron certificados por la Sociedad Americana de Químicos de Aceite AOCS por sus siglas en inglés (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los materiales utilizados en la generación de las mezclas

Material de referencia	Evento	Cantidad	Concentración	Incertidumbre
MRC 941	KM-ØØØH71-4	1 g	100 %	No reportada
MR 1459	Convencional	Aprox. 100 g	Convencional	No reportada

- Iniciadores y sondas específicas del evento KM-ØØØH71-4 y gs

Tabla 3. Secuencias específicas de iniciadores y sondas para KM-ØØØH71-4 y gs

Nombre	Secuencia	Elemento blanco
Iniciador Directo	GAC CTC CAT ATT ACT GAA AGG AAG	gs
Iniciador Reverso	GAG TAA TTG CTC CAT CCT GTT CA	
Sonda	FAM- CTA CGA AGT TTA AAG TAT GTG CCG CTC - TAMRA	
Iniciador Directo	TGG GAT CTG GGT GGC TCT AAC T	KM-ØØØH71-4
Iniciador Reverso	AAT GCT GCT AAA TCC TGA G	
Sonda	FAM- AAG GCG GGA AAC GAC AAT CT -TAMRA	

Sistema de extracción

- Se utilizó el Kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN).

Equipo de qPCR

- Se utilizaron dos plataformas de termociclado de PCR, el Light Cycler 480II™ marca Roche y el termociclador ViiA7™ marca Applied Biosystems.

Mezcla de reacción

El volumen de reacción y la concentración para cada una de los componentes de la reacción para cada elemento ensayado KM-ØØØH71-4/*gs*, se muestran en la Tabla a continuación, siendo el volumen final de reacción 20 µL.

Tabla 4. Volumen y concentración de los componentes de la mezcla de reacción de qPCR

Secuencia de interés	Componente	Volumen por reacción (µL)	Concentración inicial (nM)
KM-ØØØH71-4	Master Mix*	10	1X
	Iniciador F	0.6	300
	Iniciador R	0.6	300
	Sonda	0.7	180
<i>gs</i>	Master Mix*	10	1X
	Iniciador F	0.6	300
	Iniciador R	0.6	300
	Sonda	0.7	180

*La enzimas se sustituye de acuerdo a la marca del termociclador utilizado: Light Cycler 480II® (Light Cycler 480 Probes Master 2X) y ViiA7® (Taqman Universal PCR Master Mix 2X).

8.2 Método

Prueba de especificidad del gen endógeno de betabel *gs*.

Se entiende por especificidad a la capacidad del método de responder exclusivamente a la secuencia de interés (ENGL, 2008). La prueba de especificidad se realizó probando la respuesta de los iniciadores del gen de referencia *gs*, gen endógeno del betabel a diferentes especies para verificar que no existe amplificación cruzada con las mismas.

Se preparó la mezcla de reacción y se le agregó ADN de maíz, trigo, soya, canola, alfalfa y algodón previamente extraídos como reacciones independientes (18 µL de reacción y 2 µL ADN en una placa de 96 pozos), la detección se realizó por duplicado por cada especie a analizar para asegurar la confiabilidad de los resultados. El ensayo se llevó a cabo en el termociclador Light Cycler 480II™ de Roche.

8.2.1 Acondicionamiento de muestras

Cuando se trabaja con matrices sólidas, es necesario realizar su molienda para reducir el tamaño de la partícula y con esto facilitar la extracción de ADN. Por otro lado, debe considerarse también el número de partículas dentro de la porción de muestra. Tampoco es recomendable reducir demasiado el tamaño de partícula ya que estas muestras son difíciles de manejar por la estática que presentan.

Se realizó la molienda de las semillas con ayuda de una licuadora hasta obtener un homogeneizado del material. Dicho homogeneizado se tamizó para obtener un tamaño de partícula ≤ 1.8 mm debe obtenerse un mínimo de 300 mg del mismo.



Figura 13. Semillas de betabel

8.2.2 Generación de mezclas

Se realizará la generación de mezclas de harinas según lo indicado en la Tabla 5 para cada porcentaje (Van den Bulcke Marc.et. al. 2012). Las mezclas generadas se homogeneizarán en el mezclador de polvos Quantachrome® con las condiciones de nivel máximo de rpm durante 10 minutos. Una vez homogeneizadas las mezclas se colocarán a una temperatura de -20°C para su preservación hasta su uso.

Tabla 5. Cantidades de materiales de referencia empleados para la generación de mezclas de harinas.

% de la mezcla	Harina no GM (mg)	Harina GM (mg)
100	0.00	Se toma directo del vial
10	4,500	500
1	4,750	250
0.1	4,950	50
0.05	4,975	25
0.025	4, 987.5	12.5
0.010	4, 995	5

8.2.3 Extracción de ADN

La extracción de ADN del material se llevó a cabo con el método de kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania), bajo el protocolo estandarizado (Ver Anexo I).

8.2.4 Cuantificación y estandarización del ADN

La extracción de ADN corresponde a una parte de suma importancia puesto que la obtención de ADN de calidad permite incurrir en análisis posterior de la muestra como en el caso de la PCR. La calidad y cantidad del ADN obtenido afecta directamente la fiabilidad de los experimentos posteriores.

La cantidad y calidad de las soluciones de ADN extraídas se estimó a partir del espectro de absorción ultravioleta (UV) medido por un espectrofotómetro UV, ND-1000 (NanoDrop™ Technologies, Wilmington, DE, EE. UU.). 2 µl de ADN diluido y se sometió directamente a medición UV, se observaron absorciones de UV a 230 nm, 260 nm y 280 nm. Es importante medir estas relaciones de absorbancia ya que a A260/A280 se obtiene un indicador de la presencia de contaminación por proteínas en la muestra, debido a que las proteínas tienen un pico de absorción a 280 nm. Por otra parte, los ácido nucleicos, incluyendo ADN, ARN así como nucleótidos libres, presentan una fuerte absorbancia a 260 nm, debido a esto un valor de 1.8 indica un ADN puro, si se obtiene un valor menor puede indicar contaminación por proteínas, mientras que un valor mayor significa que la contaminación puede deberse a ARN. La absorbancia a 230 nm

también es útil ya que da información de la posible presencia de polisacáridos u otros contaminantes como compuestos fenólicos (Bazán, 2015).

En todos los casos fue necesario estandarizar las muestras a 50 ng/ μ L, esto debido a que, en el CNRDOGM, se ha estandarizado la metodología para hacer más fácil los análisis y evitar que exista una diferencia en los ciclos de amplificación debido a una diferencia de concentración inicial de la muestra.

8.2.5 Eficiencia de amplificación y evaluación de la presencia de inhibidores

La PCR es una técnica enzimática, por lo tanto es susceptible de elementos que puedan inhibir la reacción, hay una gran variedad de sustancias que pueden ser inhibidores, algunas son propias del material con el que se trabaja o se pueden acarrear durante el procesamiento de la muestra, como en el caso de la extracción de ADN, donde las soluciones que permiten el aislamiento del mismo también representan un inconveniente en análisis posteriores, así como se corre el riesgo de extraer elementos no deseados conjuntamente con el ADN, entre las sustancias que pueden presentarse como inhibidores se encuentran compuestos tanto orgánicos como inorgánicos, los iones de calcio, por ejemplo tienen efecto inhibitorio, aunque la mayoría son los compuestos orgánicos, polisacáridos, fenol, etanol, detergentes como el duodecil sulfato de sodio (SDS) así como proteínas. En el caso del material vegetal, elementos propios de las plantas como gran contenido de polifenoles, polisacáridos y colorantes pueden presentarse como inhibidores en etapas posteriores si no son procesados de la manera adecuada. En el caso de polifenoles y polisacáridos, estos pueden co-precipitar con el material genético dificultando la resuspensión del mismo (Schrader *et al.*, 2012).

Se realizó la prueba de inhibidores de la PCR con el fin de determinar la calidad del ADN obtenido, así como verificar que no hay presencia de elementos que puedan resultar en una amplificación deficiente. Dicha prueba se aplicó en ocho de las extracciones obtenidas, se eligieron las ocho muestras por medio de números aleatorios en el programa Excel. Se realizó una curva estándar dilución 1:2 para cada una de las extracciones de ADN con ayuda de iniciadores específicos del gen de glutamina sintetasa (*gs*), gen endógeno del

betabel , dichas curvas constaron de tres réplicas con cuatro puntos, para obtener diferentes concentraciones (100, 50 ,25 y 12.5 ng/μl), las curvas deben cumplir con los criterios de aceptación de los parámetros de eficiencia, pendiente y error, esto tomando en cuenta los criterios de aceptación de la Red Europea de laboratorios de OGM (ENGL working group on “Method Verification,” 2011). Para evaluar la presencia de inhibidores el valor del punto de cruce (Cp)de las cuatro muestras diluidas se graficó contra el logaritmo del factor de dilución. El valor Cp de las muestras es extrapolado a partir de la regresión lineal y ese valor se compara con el Cp medido que reporta el equipo. Para una dilución 1:2 el ciclo de amplificación entre cada dilución se calcula en base a la siguiente fórmula.

$$F. D=2^n$$

Dónde:

F.D: Factor de dilución n: número de ciclos de amplificación

Despejando n se obtiene:

$$n = \ln FD / \ln 2 = \ln 2 / \ln 2 = 1$$

Se verificó la amplificación de cada punto de las curvas estándar y se observó si mantenían repetibilidad en cada punto por triplicado, posteriormente se revisó la regresión lineal para corroborar los siguientes parámetros de calidad:

- | | |
|--|--|
| • Para equipo ViiA7® | • Para equipo Light Cycler480 II® |
| ✓ Pendiente: -3.1 a - 3.6 | ✓ Pendiente: -3.1 a -3.6 |
| ✓ Coeficiente de correlación: ≥ 0.98 | ✓ Error: < 0.02 |
| ✓ Eficiencia de amplificación: 90-110% | ✓ Eficiencia de amplificación ≥ 1.85 |

Para calcular el ΔCp, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\Delta Cp = [(Cp \text{ extrapolado} - Cp \text{ medido})]$$

Donde Cp medido y valores de intercepto son proporcionados por el software del termociclador utilizado. Cp extrapolado resulta de la ecuación de regresión lineal:

$$C_p \text{ extrapolado} = mx + b$$

En la cual:

$$x = \log C_p \text{ punto curva}$$

El ΔC_p es una medida indirecta de la presencia de inhibidores y la presencia de estos provoca un alto valor de C_p medido.

En el caso de las extracciones para las cuales se evaluó la presencia de inhibidores en el termociclador Light Cycler 480®, el parámetro de eficiencia fue calculado con la siguiente fórmula $((10^{(-1/\text{pendiente})}) - 1) * 100$ (Mazzara, M. et. al. 2007).

8.2.6 Límite de detección

Para determinar el límite de detección del evento KM-000H7-1 en la matriz de betabel bajo condiciones de repetibilidad, se realizó la detección en cada una de las mezclas, de la manera que se describe a continuación:

Se realizaron 4 detecciones por cuadruplicado a cada extracción (A, B, C, D) para tener un total de 16 detecciones por extracción y 64 detecciones por mezcla.

Se utilizaron dos reacciones de PCR para el control positivo MRC 941 (ADN de la secuencia blanco de la especie que se analizó), dos reacciones de PCR para el control negativo (MRC, que no contiene el evento KM-000H7-1).

Dos reacciones de PCR para el control de reactivos (NTC Not Template Control, con adición de agua grado biología molecular).

Las mezclas de reacción se realizaron, añadiendo los iniciadores, sondas y la enzima correspondiente.

Las mezclas de reacción se realizaron añadiendo 9 μ l de la reacción de master mix en cada uno de los pozos correspondientes de una placa, posteriormente se añadió 1 μ l de ADN o agua según corresponda. La placa fue la cubierta óptica y se centrifugo a 3400 rpm durante 3 min. Al término de este tiempo, la

placa se colocó en el termociclador bajo el protocolo de ciclado específico de cada equipo (Ver tabla 1 y 2). El método se diseñó específicamente para el termociclador ViiA7® bajo las condiciones de CRLVL07/07VR y con el objetivo de realizar los ensayos de robustez se diseñó el método para el termociclador LightCycler480.

Tabla 6. Protocolo PCR utilizado para el equipo ViiA7®

Paso	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Detección de fluorescencia	No. de ciclos
1	Desnaturalización	95	600	No	1
2	Desnaturalización	95	15	No	45
	Alineamiento y Extensión	60	60	Si	

Tabla 7. Programa de amplificación utilizado para el termociclador LightCycler480®.

Paso	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Detección de fluorescencia	No. de ciclos
1	Desnaturalización	95	600	No	1
2	Desnaturalización	95	15	No	45
	Alineamiento y Extensión	60	60	Si	

8.2.7 Determinación del límite de cuantificación

Para la determinación del límite de cuantificación se se cuantificó por tetraplicado cada extracción obteniendo así 16 réplicas de cada porcentaje. Se realizarán diluciones 1:10 para generar una curva estándar con 4 puntos por triplicado para alcanzar concentraciones finales equivalentes a 100, 10, 1 y 0.1 ng/μL para el evento KM-000H7-1 y para el elemento de referencia GS, debido a que el MRC contiene ambas secuencias. La cuantificación corresponde a la interpolación de los porcentajes generados dentro de los puntos de la curva estándar.

8.2.8 Pruebas de repetibilidad

Los ensayos considerados para este trabajo bajo condiciones de repetibilidad son:

- Límite de detección
- Límite de cuantificación

Estos ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones por el mismo analista en días diferentes, empleando el termociclador ViiA7®.

8.2.9 Pruebas de reproducibilidad

Los ensayos considerados para esta validación bajo condiciones de repetibilidad son:

- Límite de detección
- Límite de cuantificación

Estos ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones por un analista diferente en días diferentes, empleando el termociclador ViiA7®.

8.2.10 Prueba de robustez

Para evaluar la robustez se determinó el límite de detección y el límite de cuantificación por un mismo analista (el que realizó los ensayos de repetibilidad), pero utilizando una plataforma diferente de qPCR, para este caso se utilizó el termociclador Light Cycler 480®.

8.2.11 Intervalo dinámico

Para la determinación de este parámetro se evaluó el comportamiento de amplificación de las diferentes mezclas dentro del intervalo de concentraciones de 100 – 0.01% del material de referencia certificado.

8.2.12 Precisión

Se necesita determinar la desviación estándar de los análisis cuantitativos asociados a repetibilidad y reproducibilidad; es decir se requiere conocer cuál es el valor de desviación con respecto al porcentaje original generado.

8.2.13 Incertidumbre

Para estimar la incertidumbre se requiere conocer cada uno de los elementos que afectan directamente la determinación, para este caso se estimó la incertidumbre asociada al elemento de interés para posteriormente integrarla y determinar la incertidumbre combinada asociada directamente a la incertidumbre del material de referencia certificado.

Por último, se analizó si había diferencias significativas entre los resultados obtenidos para las pruebas de repetibilidad, reproducibilidad y robustez, esto se realizó con la ayuda del estadístico de ANOVA.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Prueba de especificidad de los iniciadores del gen endógeno de betabel GS.

Como primer paso se llevó a cabo el ensayo para verificar que los iniciadores elegidos para el gen de referencia gs, fueran específicos solo para esta secuencia, dicha especificidad se evidenció usando los iniciadores de gs en la amplificación de ADN de las especies disponibles en el centro, que fueron maíz, trigo, soya, alfalfa, canola y algodón como se muestra en la figura 14:

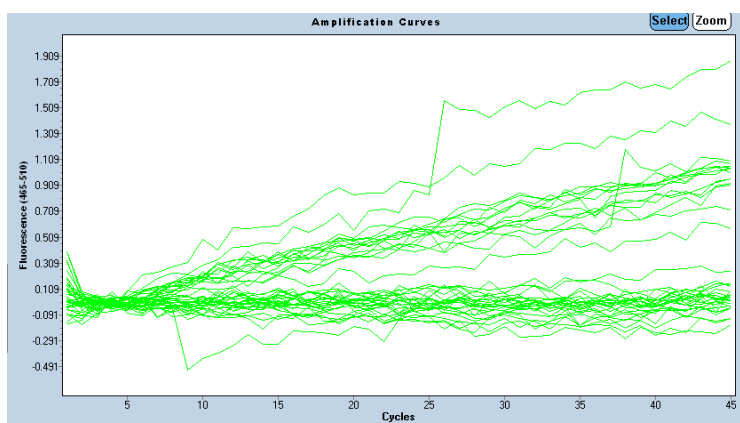


Figura 14. Amplificación de DNA de otras especies con los iniciadores específicos para el gen de referencia GS

Se puede observar que no existió amplificación para alguno de los genes de referencia de las especies ensayadas, las cuales fueron maíz, trigo, soya, canola, alfalfa y algodón. Por lo que se determinó que los oligonucleótidos usados son específicos solo para el gen de referencia gs. El uso de sondas específicas fluorescentes, como las sondas de hidrólisis TaqMan-MGB (Applied Biosystems), ofrecen la ventaja de permitir la cuantificación específica del ADN de interés incluso en la presencia de amplificación inespecífica (dímeros de primer, DNAg), aunque su uso implica un mayor costo nos ayuda a evitar problemas de especificidad en comparación con otros métodos muy utilizados por su menor costo, como emplear fluoróforos que se unen a ADN de doble cadena, como es el caso de SYBR Green o Eva Green. El SYBR Green o el Eva Green se unen inespecíficamente al ADN de doble cadena y producen fluorescencia. Estos fluoróforos no son específicos ya que se unen a toda molécula de ADN de doble cadena, incluyendo los dímeros de primer. El uso de SYBR Green o Eva Green implica un diseño muy cuidadoso de los primers

con el fin de evitar dímeros de primer, y evitar la amplificación de DNA genómico contaminante en la muestra de DNA (UPV, 2012).

9.2 Extracción de DNA

Se llevó a cabo la extracción de ADN de las diferentes mezclas empleando el Kit comercial DNeasy MiniPlant, el cual fue modificado para este proyecto (Ver anexo I). Posteriormente se cuantificó el ADN obtenido y se obtuvieron los índices de absorbancia 260/280 y 260/230 a través del Nanodrop, las concentraciones y los índices se muestran en la tabla 8.

Las concentraciones obtenidas de la extracción de ADN de cada mezcla superaron en todos los casos los 50 ng/μl requeridos que es la concentración que se utiliza en los análisis de rutina; se obtuvo un promedio de concentración de 156.04 ng/μl. Dado que el criterio de aceptación de ADN indica que el método de extracción debe permitir obtener una cantidad suficiente de ADN para los análisis requeridos, puede determinarse que el método empleado para la extracción de ADN permite obtener la concentración suficiente para la realización de los análisis (ENGL, 2008). Sin embargo, al cuantificar ADN por medio de espectrofotometría existen dos condiciones importantes a cumplir, estos son los criterios de relación 260/280 y 260/230, las cuales son medida de la pureza del DNA extraído. Una relación 260/280 aceptable tiene un valor entre 1.8-2.0 e indica que el ADN tiene una pureza óptima y está libre de compuestos que absorben a esa longitud de onda. Un valor $A_{260/280} < 1.6$ indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas (Salamanca, 2008.). En la tabla 8 se observa que la relación 260/280 de las muestras tienen un valor promedio de 1,77 por lo que se encuentra un poco por debajo de la relación óptima, sin embargo, al realizar más adelante la prueba de inhibidores se comprobó que el DNA obtenido estaba libre de compuestos que afecten los análisis de PCR posteriores.

Tabla 8. Concentración de ADN obtenido en cada mezcla

Mezcla Porcentaje	Extracción	[ng/ μ l]	Relación 260/280	Relación 260/230
100	A	646,10	2,09	2,25
	B	239,30	2,05	2,43
	C	332,80	2,08	2,30
	D	89,80	1,82	2,20
10	A	128,60	1,75	1,41
	B	143,30	1,72	1,58
	C	155,90	1,73	1,33
	D	80,20	1,77	1,76
1	A	150,30	1,73	1,54
	B	144,10	1,74	1,46
	C	133,30	1,72	1,34
	D	114,70	1,73	1,72
0,5	A	117,40	1,71	1,74
	B	68,00	1,72	1,61
	C	102,70	1,70	1,35
	D	118,90	1,70	1,60
0,1	A	138,20	1,72	1,37
	B	109,10	1,70	1,46
	C	137,40	1,71	1,32
	D	150,20	1,71	1,32
0,025	A	120,40	1,71	1,41
	B	163,70	1,74	1,41
	C	148,50	1,71	1,31
	D	148,10	1,72	1,48
0,01	A	106,00	1,78	1,56
	B	141,10	1,77	1,68
	C	107,20	1,76	1,66
	D	133,70	1,78	1,52
	Promedio	156,04	1,77	1,61
	S	108,05	0,11	0,32
	c.v	0,69	0,06	0,20

Por otro lado, para determinar que el ADN se encuentra puro la relación 260/230 debe encontrarse en un rango de 1.5-2.2, valores menores indican presencia de contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos, se puede observar en la tabla 8 que los valores de la relación 260/230 se encuentran en el rango aceptable, pues se obtuvo un promedio de A260/A280 de 1,61. Aunque los índices de pureza son indicadores importantes de la

calidad de la muestra, el mejor indicador de la calidad del ADN o del ARN es la funcionalidad en la aplicación de interés posterior. Es importante tener en cuenta que hay ocasiones en que las proporciones de pureza están dentro de los límites esperados, sin embargo, hay un problema con la muestra (Desjardins & Conklin, 2010), por esta razón se realizó adicionalmente la prueba de inhibidores.

9.3 Eficiencia de amplificación y evaluación de la presencia de inhibidores

Existe una gran variedad de sustancias con diferentes propiedades o mecanismos inhibidores de PCR que no pueden identificarse tan fácilmente. Por ejemplo, los efectos inhibidores de las moléculas termolábiles pueden disminuir en función del ciclo térmico repetido. Durante las primeras fases de la reacción, los compuestos termolábiles pueden ser inhibidores potentes, pero su efecto decrecerá a medida que la reacción progresa a través de su régimen de ciclos térmicos, dando como resultado un ciclo umbral retrasado. Sin embargo, la degradación del inhibidor finalmente permitirá que las eficiencias de amplificación se recuperen y las reacciones crucen el umbral de detección. En tales casos, los simples cálculos de eficiencia no serán una estrategia de detección efectiva. Comúnmente el modo de acción de los contaminantes que inhiben la amplificación de ácidos nucleicos durante la PCR, se debe principalmente a la precipitación o a la desnaturalización del DNA así como a la interacción con iones Mg^{2+} , impidiendo por tanto su unión con cualquier DNA polimerasa. Asimismo, estos compuestos inhibitorios pueden interferir a distintos niveles de la reacción, dando lugar a diferentes grados de atenuación, siendo el grado de inhibición final dependiente de su concentración (Sepúlveda, 2012).

Una estrategia para la detección de inhibidores es crear una dilución en serie de la muestra y construir una curva de calibración intrínseca a partir de la cual pueda estimarse la eficiencia. Dada la naturaleza exponencial de la amplificación por PCR, solo se requiere un pequeño número de moléculas patrón para generar un producto de PCR. Por consiguiente, las muestras a menudo pueden diluirse hasta un punto en el que los inhibidores son ineficaces para evitar la amplificación del ADN molde restante. Como resultado, los

ensayos de dilución cruzarán el umbral de detección más temprano, disminuyendo la pendiente de la curva de regresión lineal (Kontanis & Reed, 2006).

Se conoce como eficiencia de la amplificación de la PCR a la fracción de moléculas diana que genera y expresa un amplicón de PCR, cuando este se duplica de manera exponencial durante la fase logarítmica de su amplificación, entonces el ensayo tiene 100% eficiencia (Peirson, Butler, & Foster, 2003). Al graficar el valor de C_p de las muestras diluidas contra el logaritmo del factor de dilución se obtienen datos que permiten calcular la eficiencia de la amplificación. Dado que la pendiente está directamente relacionada con la eficiencia, una pendiente de la curva estándar de -3.32 indica una reacción de PCR con 100% eficiencia, por otro lado pendientes más negativas que -3.32 (ej. -3.8) indican reacciones con menos del 100% de eficiencia. Pendientes más positivas que -3.32 puede indicar problemas de calidad de la muestra o problemas de pipeteo. (Pinilla, Cubillos, & Rodríguez, 2008). Existen diversos factores pueden afectar la eficiencia de la amplificación de la PCR, como el termociclador empleado, no todos los equipos son eficientes para la amplificación de ADN, las ADN polimerasas pueden ser inhibidas por diversas sustancias presentes en el material a amplificar, la degradación de los reactivos, la especificidad de primers y sondas, y las concentraciones altas de dNTPs (Dorado, 2005).

En la tabla 9 se muestra la eficiencia de la amplificación, puede observarse que todas las curvas cumplen con los criterios de aceptación de calidad establecidos (Ver anexo II). Esto es una eficiencia del 90-110, los valores de la pendiente se encuentran en el rango de $-3.648 \leq \text{pendiente} \leq -3.1$ y el error es menor a 0.02, tal como se establece en el SDOGM-PR-VS-01 "Verificación del sistema de extracción de ADN" (CNRDOGM, 2016).

Tabla 9. Eficiencia de amplificación de las mezclas seleccionadas

Muestra		Extracción	Valor de Ct en diluciones				Pendiente	Eficiencia	Error/R ²
			100	50	25	12.5		%	
100%	1	A	21,35	22,29	23,53	24,61	-3,59	90.009	0,009
10 %	2	C	22,24	23,48	24,37	25,59	-3,58	90.025	0,011
1%	3	B	21,55	22,33	23,62	24,76	-3,512	92.636	0,016
	4	D	22,04	23,25	24,25	25,49	-3,57	90.595	0,005
0.1	5	C	22,30	23,21	24,48	25,52	-3,6	90	0,010
0.05	6	A	22,41	23,51	24,63	25,73	-3,6	90	0,011
0.025	7	B	22,12	23,37	24,29	25,37	-3,59	90.009	0,009
0.010	8	D	22,12	23,35	24,32	25,37	-3,6	90	0,008

Cuando un ensayo es diseñado de manera apropiada, sin sustancias presentes en la muestra que interfieran en el proceso de amplificación, el ADN a evaluar deberá amplificar con al menos el 90% de eficiencia, se asume entonces que la presencia de inhibidores disminuye la eficiencia de amplificación. Por esta razón es importante evaluar la presencia de inhibidores de la PCR, para esto se extrapolaron el valor Cp de las muestras a partir de la regresión lineal y ese valor se comparó con el Cp medido que reportó el equipo.

La tabla 10 muestra los resultados del ΔCp para cada mezcla, el promedio de ΔCp fue de 0.095, dado que el criterio de aceptación de ADN establecido indica que la diferencia (Cp) entre el valor medido y el valor Cp extrapolada de la dilución debe ser menor a 0,5 [(Cp medido - extrapolado Cp) <0,5] (ENGL, 2008), se puede concluir que el ADN de las muestras analizadas se encuentra libre de compuestos inhibidores que puedan afectar el resultado de los análisis.

Tabla 10. Presencia de inhibidores en las mezclas seleccionadas.

Muestra		Extracción	Intercepto	Cq medido	Cq teórico	Δ Cq
100%	1	A	28.65	22.29	22.38	0.09
10 %	2	C	29.48	23.48	23.38	0.10
1%	3	B	28.46	22.33	22.49	0.16
	4	D	29.41	23.25	23.17	0.08
0.1	5	C	29.53	23.21	23.33	0.12
0.05	6	A	29.72	23.51	23.54	0.03
0.025	7	B	29.45	23.37	23.25	0.12
0.010	8	D	29.53	23.35	23.41	0.06

La eficacia de la PCR depende de muchos factores que incluyen: el rendimiento del ensayo, el cual a su vez depende de las secuencias y las estructuras de los cebadores y las plantillas. La estructura secundaria y la oportunidad para interacciones intramoleculares no deseadas reducen la eficiencia de PCR; la matriz de muestra, que puede contener inhibidores y otras sustancias interferentes de la muestra o agentes de transferencia de etapas de procesamiento aguas arriba; reactivos usados y sus concentraciones. Esencialmente, cualquiera de los reactivos de PCR puede ser limitante de velocidad y rendimiento, incluido el protocolo de PCR utilizado y reacciones competitivas (Svec *et al.*, 2015).

9.4 Límite de detección

Una vez comprobada la ausencia de compuestos inhibidores que pudieran afectar los resultados de la PCR, se determinó el límite de detección del evento bajo condiciones de repetibilidad, reproducibilidad y robustez mediante la existencia de amplificación del evento específico KM-ØØØH71-4, en cada una de las mezclas generadas.

Uno de los parámetros más críticos de rendimiento para un procedimiento de diagnóstico, son aquellos relacionados con la cantidad mínima de objetivo que se puede detectar y cuantificar. El límite de detección o LoD puede definirse como la cantidad más baja del analito (mensurando), puede detectarse en una

muestra con una probabilidad establecida, aunque quizás no se cuantifique como un valor exacto, de manera general se expresa como la concentración a la que el método usado puede detectar al analito en un 95% de los casos (Forootan, *et al.*, 2017). En la tabla 11 se muestran los resultados del límite de detección bajo condiciones de repetibilidad obtenidos en el termociclador ViiA7®.

Tabla 11. Límite de detección para el evento KM-ØØØH71-4 bajo condiciones de repetibilidad.

Mezcla de harina (%)	Réplicas de extracción	Repeticiones				Frecuencia detectada	Ciclo promedio	Detección (%)
		1	2	3	4			
100	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	26.8	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
10	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	30.7	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
1	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	34.3	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
0.10	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	37.8	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
0.05	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	38.5	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
0.025	A	1/4	3/4	4/4	1/4	9/16	39.2	64.06
	B	1/4	2/4	4/4	4/4	11/16		
	C	4/4	0/4	4/4	2/4	10/16		
	D	3/4	2/4	3/4	2/4	10/16		
0.010	A	1/4	2/4	1/4	0/4	4/16	39.6	37.5
	B	1/4	1/4	2/4	0/4	4/16		
	C	2/4	1/4	2/4	1/4	6/16		
	D	2/4	3/4	2/4	3/4	10/16		

Para obtener el límite de detección bajo condiciones de repetibilidad se realizaron 64 repeticiones, cuatro repeticiones por cada extracción para cada porcentaje de mezclas. Se puede observar en la tabla 11 que para los porcentajes de 100%, 10%, 1%, 0.10% y 0.05% es posible detectar el evento KM-ØØØH71-4 con una confiabilidad del 100%, mientras que para los porcentajes de 0.025% y 0.010% sólo se puede detectar en un 64% y 37.50% respectivamente, por lo que se considera que a dichas concentraciones ya no es posible realizar una detección confiable del analito, por lo tanto el límite de

detección para el evento KM-ØØØH71-4 es de 0.05%, es decir, a esta concentración es posible para el laboratorio determinar que el analito se encuentra presente en la muestra

Para las mezclas de 0.025% y 0.010% el porcentaje de detección fue menor al 95% por lo que no se puede determinar de manera confiable que el analito se encuentre o no presente en la muestra y existe el riesgo de un falso negativo.

El término repetibilidad hace referencia a la variación en las mediciones repetidas realizadas sobre el mismo analito en condiciones idénticas. Esto significa que las mediciones deben realizarse con el mismo instrumento o método, el mismo observador (o evaluador) cuando requiere la intervención humana, y que las mediciones se realizan en un período de tiempo corto, sobre el cual el valor subyacente puede considerarse constante (Bartlett & Frost, 2008). La variabilidad en las mediciones realizadas sobre el mismo sujeto en un estudio de repetibilidad se puede atribuir solo a los errores debidos al proceso de medición en sí. La repetibilidad entre réplicas durante la realización de un ensayo proporciona información que le da confianza a los resultados de dicho ensayo, y por lo tanto no debe observarse variabilidad (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2006).

Una vez que se ha determinado que la repetibilidad de un procedimiento u observador determinado es satisfactoria, es posible evaluar lo que comúnmente se denomina reproducibilidad, bajo este criterio interesa establecer si dos personas que usan el mismo método de medición obtienen el mismo resultado. En estas circunstancias, la reproducibilidad está evaluando el acuerdo entre métodos o entre observadores. Comprensiblemente, si la repetibilidad no se ha considerado aceptable, la evaluación de la reproducibilidad en estas circunstancias no será confiable (Watson & Petrie, 2010). Para determinar el límite de detección bajo condiciones de reproducibilidad, el ensayo fue realizado por un analista diferente, pero bajo las mismas condiciones que se utilizaron para el ensayo de repetibilidad, los datos obtenidos se pueden observar en la tabla 12.

Tabla 12. Límite de detección para el evento KM-ØØØH71-4 bajo condiciones de reproducibilidad

Mezcla de harina (%)	Réplicas de extracción	Repeticiones				Frecuencia detectada	Ciclo promedio	Detección (%)
		1	2	3	4			
100	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	26.6	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
10	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	30.5	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
1	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	34.1	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
0.10	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	37.5	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
0.05	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	38.3	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
0.025	A	4/4	3/4	3/4	2/4	12/16	39.0	65.62
	B	4/4	0/4	4/4	2/4	10/16		
	C	1/4	3/4	4/4	1/4	9/16		
	D	1/4	2/4	4/4	4/4	11/16		
0.010	A	2/4	3/4	2/4	2/4	9/16	39.4	37.5
	B	1/4	1/4	2/4	0/4	4/16		
	C	2/4	0/4	2/4	1/4	5/16		
	D	1/4	0/4	2/4	1/4	4/16		

Como puede observarse en la tabla anterior bajo condiciones de reproducibilidad se determinó el límite de detección del evento KM-ØØØH71-4 en la mezcla de 0.05%, al igual que en el ensayo realizado bajo condiciones de repetibilidad.

Se determinó el límite de detección del evento específico KM-ØØØH71-4 bajo condiciones de robustez, se realizó el procedimiento que el utilizado para determinar el límite de detección bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, sin embargo, se cambió el termociclador VIIA 7 por el termociclador Light Cycler 480II™. En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 13. Límite de detección para el evento KM-ØØØH71-4 bajo condiciones de robustez.

Mezcla de harina (%)	Réplicas de extracción	Repeticiones				Frecuencia detectada	Ciclo promedio	Detección (%)
		1	2	3	4			
100	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	25.3	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
10	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	28.9	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
1	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	32.1	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
0.10	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	35.2	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
0.05	A	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16	36.2	100
	B	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	C	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
	D	4/4	4/4	4/4	4/4	16/16		
0.025	A	¼	1/4	1/4	0/4	3/16	36.8	34.8
	B	¼	1/4	1/4	0/4	3/16		
	C	2/4	1/4	1/4	0/4	4/16		
	D	¼	0/4	0/4	1/4	2/16		
0.010	A	¼	1/4	0/4	0/4	2/16	37.4	15.62
	B	¼	1/4	0/4	0/4	4/16		
	C	¼	1/4	0/4	1/4	3/16		
	D	2/4	0/4	0/4	1/4	3/16		

Se puede observar que el límite de detección bajo condiciones de robustez prevalece en 0.05%, de modo que el método implementado es lo suficientemente robusto para la detección del evento KM-ØØØH71-4, la técnica de PCR en tiempo real es en general muy robusta debido, en gran medida, a la gran capacidad de los oligonucleótidos de unirse firme y específicamente a sus secuencias complementarias de ADN discriminando fácilmente entre centenares de millares de sitios (Mullis 1990).

La sensibilidad de un método es típicamente expresada como el límite de detección, el cual como se ha mencionado antes, se define como la cantidad mínima del organismo objetivo en dilución que podría detectarse en el 95% de las repeticiones; teóricamente el LoD más sensible posible corresponde a tres copias de la secuencia de ácido nucleico diana por PCR, cuando se asume una distribución de Poisson, con una probabilidad del 95% de incluir al menos 1 copia de la secuencia diana en la PCR y lograr una detección de copia única,

aunque este valor se refiere al LOD teórico de la metodología qPCR, que es capaz de detectar una sola molécula de ADN diana en la muestra (Kralik & Ricchi, 2017). Asumiendo esto, el LOD para todos los ensayos de qPCR optimizados sería similar, puesto que en teoría un ensayo tiene un rango dinámico que se extiende desde la concentración cero hasta algún límite superior, sin embargo, comúnmente un ensayo simplemente no es capaz de medir con exactitud las concentraciones de analito hasta cero. Debe haber una concentración suficiente de analito para producir una señal analítica que pueda distinguirse de manera confiable del ruido analítico, que es la señal producida en ausencia del mismo, de esta manera el LOD debe estar relacionado con todo el proceso que incluye desde la extracción del ADN y el ensayo de PCR. Solo bajo estas condiciones se puede representar un parámetro válido que describa las características del método de qPCR respectivo, para el método validado, a la concentración de 0.05% se sitúa el valor crítico, que nos permite, una vez medida la muestra, tomar la decisión de si el analito se halla presente o no, es decir, nos permite detectar el equivalente a una semilla transgénica entre dos mil semillas convencionales. Si la concentración obtenida es superior al valor crítico entonces sin duda no corresponde a un blanco y podemos decir que el analito está presente en la muestra.

Es importante mencionar que el ciclo umbral promedio para una concentración de 100% fue de ≈ 26.5 para los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad realizados en el equipo ViiA7®, mientras que para el ensayo de robustez realizado en el equipo Light Cycler 480II™ el ciclo promedio fue de 25.2, es decir aproximadamente un ciclo antes que en el equipo ViiA7®. Por lo anterior se concluye que la detección del evento específico KM-ØØØH71-4, no resulta afectada a pesar de ser realizada por diferentes analistas en diferentes plataformas de qPCR, debido a que los resultados obtenidos son concordantes entre sí bajo las condiciones de repetibilidad, reproducibilidad y robustez.

9.5 Limite de cuantificación

El límite de cuantificación o LoQ es definido como la cantidad más pequeña del analito, que puede no sólo ser medido, sino cuantificado con precisión y

exactitud definidos bajo las condiciones experimentales por el método en fase de validación, esto es, por medio de una curva estándar realizada con un material de referencia certificado (Kralik & Ricchi, 2017).

Para la determinación del límite de cuantificación bajo condiciones de repetibilidad se realizó la cuantificación por tetraplicado para cada extracción de ADN en el termociclador ViiA7[®], se obtuvieron 16 réplicas de cuantificación para cada porcentaje, en la tabla 14 se presentan los resultados de cuantificación de las mezclas generadas.

Con base en los resultados experimentales, se estableció como el límite de cuantificación el porcentaje 0.1% bajo condiciones de repetibilidad. Las diluciones utilizadas para realizar la cuantificación fue 1:10 quedando las concentraciones de los puntos de la curva estándar en 100, 10, 1 y 0.10 tanto para el elemento de interés, evento KM-ØØØH71-4, como para el elemento de referencia, *gs*. Es importante señalar que los porcentajes 0.05, 0.025 y 0.010% no se cuantificaron debido a que, de realizarse la cuantificación se estaría llevando a cabo una extrapolación y no una interpolación en los puntos de la curva estándar, puesto que el rango dinámico establecido se ubica en el intervalo de 100 a 0.1 por lo que solamente se asumiría la linealidad del método, aunado a esto la repetibilidad de amplificación de los elementos no sería la suficiente para realizar los cálculos de cuantificación,

El ensayo para la determinación del límite de cuantificación bajo condiciones de reproducibilidad fue realizado por otro analista diferente al que realizó el ensayo de repetibilidad, esto con el fin de confirmar el valor obtenido en dicho ensayo. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 15, donde se confirma el límite de cuantificación obtenido bajo las condiciones de repetibilidad; con base en los resultados experimentales se estableció como el límite de cuantificación el porcentaje 0.1% obtenido en el termociclador ViiA7[®].

La robustez es medida como la capacidad de un método de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas desviaciones a partir de las condiciones experimentales originales del método. La robustez necesita ser demostrada sobre el método base, por lo que para evaluar el límite de

cuantificación bajo condiciones de robustez se utilizó el termociclador Light Cycler 480®. En la Tabla 16 se muestran los resultados que demuestran la robustez del método de ensayo con el cual se confirma el porcentaje de 0.1% como el valor mínimo para realizar la cuantificación del evento específico KM-ØØØH71-4 mediante qPCR.

El parámetro analítico de robustez se evaluó calculando la desviación estándar relativa bajo condiciones de Reproducibilidad y Robustez a partir de datos cuantitativos provenientes de los resultados de cuantificación de las mezclas (100, 10, 1 y 0.1%).

El límite de cuantificación puede ser equivalente al límite de detección, aunque normalmente se sitúa a una concentración más alta, pues se necesita un mayor grado de confiabilidad para poder determinar no sólo la presencia del analito sino la cantidad en la que está presente; en este caso el porcentaje del evento KM-ØØØH71 mínimo que puede ser cuantificado con precisión y confiabilidad corresponde al 0.1, por lo que se encuentra por encima del nivel de detección establecido que fue de 0.05%, el LoQ nunca puede ser menor que el LoD.



Tabla 14. Límite de cuantificación establecido bajo condiciones de repetibilidad.

Rep. Ext de ADN	Mezclas de harina OGM (%)															
	100				10				1				0.1			
	REP1	REP2	REP3	REP4	REP1	REP2	REP3	REP4	REP1	REP2	REP3	REP4	REP1	REP2	REP3	REP4
A	119	122	118	108	10.7	10.2	10.2	10.0	0.83	0.92	0.84	0.89	0.11	0.07	0.08	0.09
B	96.6	110	111	113	8.35	8.61	8.81	10.2	0.99	0.95	1.00	1.11	0.10	0.10	0.08	0.11
C	87.7	97.7	114	92.9	8.07	8.24	7.63	8.37	1.11	1.02	0.99	1.04	0.13	0.15	0.14	0.12
D	97.1	107	110	106	9.02	8.92	8.64	8.01	0.77	0.67	0.73	0.82	0.09	0.08	0.08	0.09
\bar{X}	106.87				9.01				0.92				0.105			
SD	2.58				0.241				0.033				0.005			

Tabla 15. Límite de cuantificación establecido bajo condiciones de reproducibilidad.

Rep. Ext de ADN	Mezclas de harina OGM (%)															
	100				10				1				0.1			
	REP1	REP2	REP3	REP4	REP1	REP2	REP3	REP4	REP1	REP2	REP3	REP4	REP1	REP2	REP3	REP4
A	120	123	119	109	10.79	10.2	10.3	10.1	0.99	0.92	1.00	0.89	0.13	0.07	0.08	0.09
B	96.8	110	112	113	8.35	8.61	8.81	8.80	0.99	0.84	0.81	1.02	0.11	0.11	0.09	0.11
C	87.2	95.2	109	89.9	8.07	8.24	7.63	8.37	1.01	1.11	0.99	1.04	0.09	0.06	0.07	0.06
D	97.9	108	110	107	9.01	8.96	8.68	8.04	1.02	0.89	0.97	1.07	0.08	0.08	0.08	0.09
\bar{X}	106.91				8.95				0.98				0.093			
SD	2.69				0.235				0.021				0.004			



Tabla 16. Límite de cuantificación establecido bajo condiciones de Robustez.

Rep. Ext de ADN	Mezclas de harina OGM (%)															
	100				10				1				0.1			
	REP1	REP2	REP3	REP4	REP1	REP2	REP3	REP4	REP1	REP2	REP3	REP4	REP1	REP2	REP3	REP4
A	122.1	110.8	98.72	103.3	10.06	10.83	10.53	10.72	1.00	0.98	0.97	0.97	0.103	0.103	0.104	0.06
B	85.36	109.4	122.4	108.2	12.29	11.92	12.09	13.08	0.96	0.99	0.97	0.96	0.101	0.104	0.101	0.098
C	81.36	90.56	101.32	89.5	10.47	10.01	8.84	8.73	0.98	0.96	0.95	0.98	0.113	0.111	0.105	0.107
D	90.9	91.53	94.26	86.97	12.09	11.88	12.36	11.72	1.22	1.06	1.15	1.00	0.102	0.099	0.093	0.14
\bar{X}	99.13				11.09				1.04				0.103			
SD	3.16				0.31				0.018				0.004			

Un LoD proporciona una estimación del sesgo y la imprecisión a una concentración de analito muy baja. Si el sesgo y la imprecisión observados en el LoD cumplen con los requisitos de error total para el analito (es decir, el ensayo es lo suficientemente adecuado) entonces: $LoQ = LoD$. Si los objetivos analíticos no se cumplen en el LoD, se debe probar una concentración de analito ligeramente superior para determinar el LoQ (Armbruster & Pry, 2008).

La metodología para establecer el LOQ utilizada anteriormente tiene varias ventajas, aun cuando se sitúa por encima del límite de detección; permite determinar que a una concentración de 0.1% el analito será cuantificable con al menos un 95% de probabilidad. El límite de detección, en cambio, es esencialmente una garantía cualitativa de que, con una alta probabilidad, el analito está presente y no ha escapado a la detección, es decir, no es utilizable para fines de cuantificación; el LOQ está relacionado con el nivel de decisión, que depende del ruido en el blanco. El obtener el límite de cuantificación en 0.1% permite evidenciar el cumplimiento de la regulación nacional e internacional, la más estricta es la regulación Europea que en su Reglamento (CE) nº 1830/2003 relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente (OMG) y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de estos, establece que a una concentración de 0.9% de presencia de OGM en un producto, este debe ser etiquetado, por lo que el método aquí validado permite una detección 9 veces menor que esta norma, lo que es equivalente a cuantificar la presencia de una semilla con modificación genética entre 1000 semillas convencionales.

Al comparar los ensayos realizados bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad se observó que, para todas las mezclas, los valores de concentración obtenidos se encuentran dentro de los rangos establecidos, que es la cantidad esperada ± 2 SD.

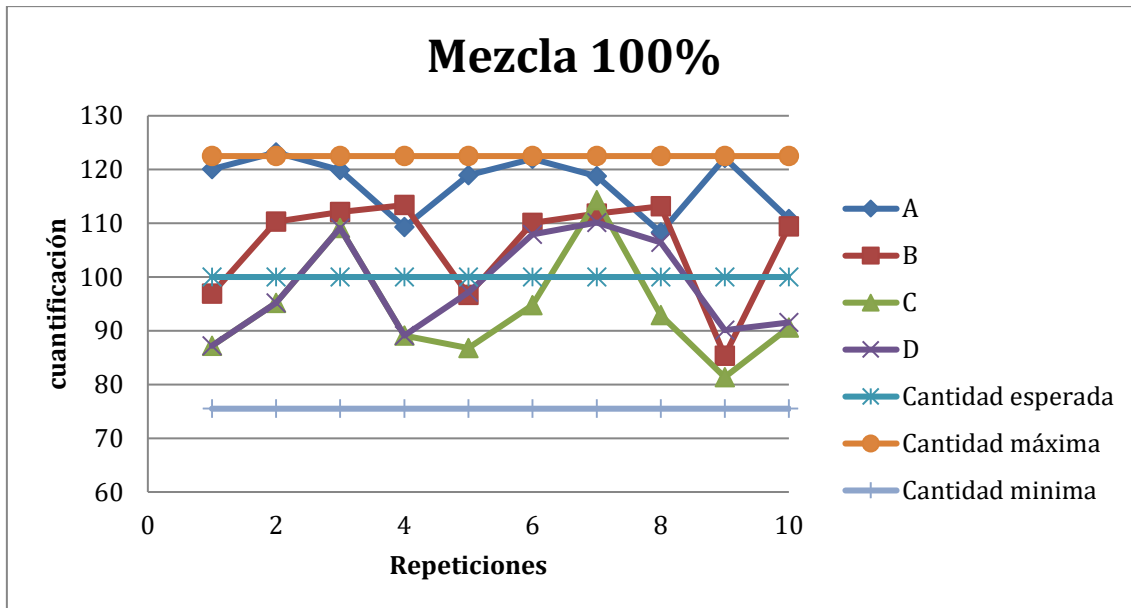


Figura 15. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad para el porcentaje de 100. Los valores máximos y mínimos corresponden a $100 \pm 2Sd$ con $n=32$.

En la figura 15 puede observarse el comportamiento de los valores correspondientes a las concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, se obtuvo una desviación estándar de 10.38; ninguno de los valores se encontró por encima de 120.77 que corresponde al valor esperado de $100+2S$, se observa también que ninguno se encontró por debajo de 79.22 que es el valor mínimo esperado correspondiente a $100-2S$.

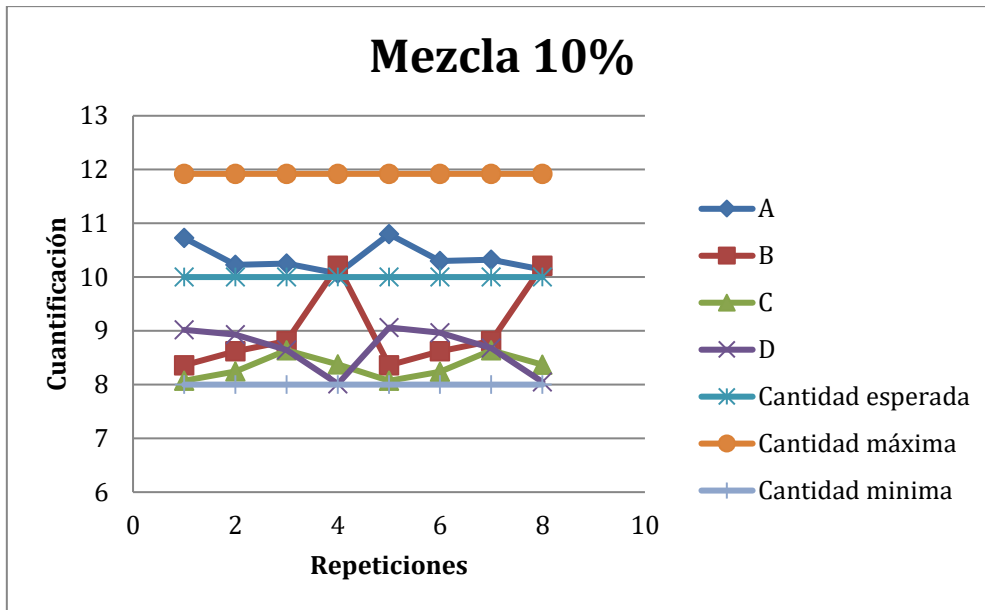


Figura 16. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad para el porcentaje de 10. Los valores máximos y mínimos corresponden a $10 \pm 2S$ con $n=32$.

Para la mezcla de 10% bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad se observa que el comportamiento de los valores correspondientes a las concentraciones obtenidas se obtuvo una desviación estándar de 0,96; ninguno de los valores se encontró por encima de 11.92 que corresponde al valor esperado de $10+2S$, se observa también que ninguno se encontró por debajo de 8.04 que es el valor mínimo esperado correspondiente a $10-2S$.

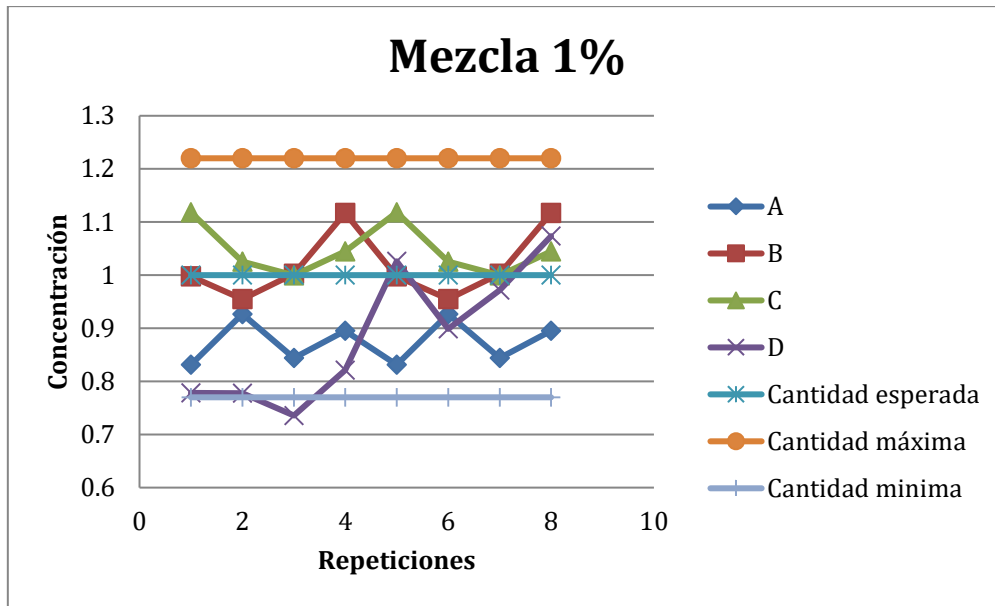


Figura 17. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad para el porcentaje de 1. Los valores máximos y mínimos corresponden a $1 \pm 2S$ con $n=32$

Al observar el comportamiento para la mezcla de 1% bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad puede notarse que los valores correspondientes a las concentraciones obtenidas obtuvieron una desviación estándar de 0,11; ninguno de los valores se encontró por encima de 1.22 que corresponde al valor esperado de $1+2S$, se observa también sólo un valor en la extracción D se encontró por debajo de 0.77 que es el valor mínimo esperado correspondiente a $1-2S$.

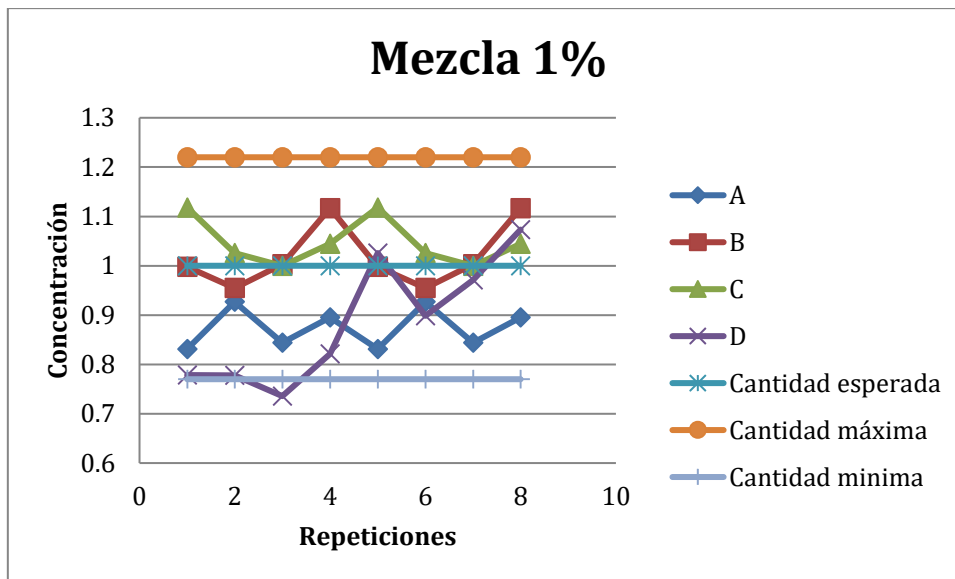


Figura 18. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad para el porcentaje de 0.1. Los valores máximos y mínimos corresponden a $0.1 \pm 2S$ con $n=32$

En cuanto a la mezcla de 0.1% bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad se observa que los valores correspondientes a las concentraciones obtenidas obtuvieron una desviación estándar de 0,02 y se encuentran muy cercanos a la concentración esperada de 0.1, sólo en uno de los casos se encontró por encima de 0.14 que corresponde al valor esperado de $0.1 + 2S$, se observa también que ningún se encontró por debajo de 0.5 que es el valor mínimo esperado correspondiente a $0.1 - 2S$.

Para todos los porcentajes de las mezclas realizadas las concentraciones obtenidas se encontraron muy cercanas a la concentración esperada. Se comparó también los datos obtenidos bajo condiciones de repetibilidad y robustez. El comportamiento de los datos se puede observar en las figuras siguientes:

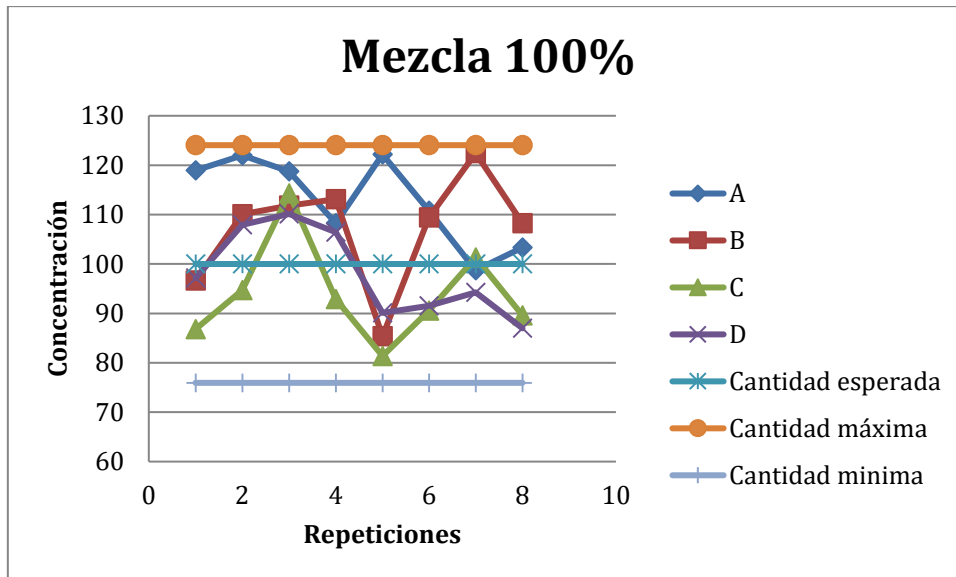


Figura 19. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y robustez para el porcentaje de 100. Los valores máximos y mínimos corresponden a $100 \pm 2S$ con $n=32$

En la figura 19 puede observarse el comportamiento de los valores correspondientes a las concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y robustez, se obtuvo una desviación estándar de 12.02; ninguno de los valores se encontró por encima de 124.05 que corresponde al valor esperado de $100+2S$, se observa también que ninguno se encontró por debajo de 75.94 que es el valor mínimo esperado correspondiente a $100-2S$.

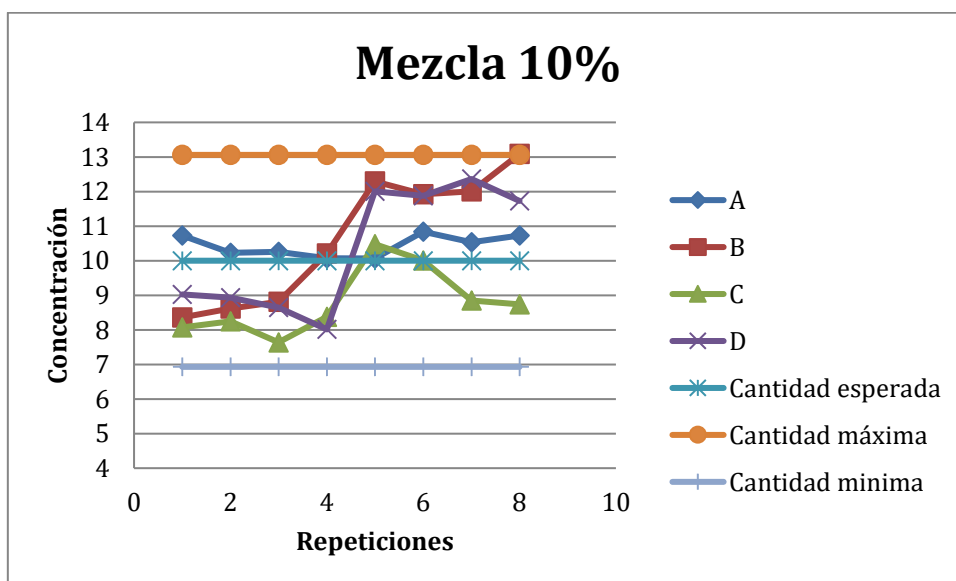


Figura 20. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y robustez para el porcentaje de 10. Los valores máximos y mínimos corresponden a $10 \pm 2S$ con $n=32$

Para la mezcla de 10% (figura 20) bajo condiciones de repetibilidad y robustez se observa que el comportamiento de los valores correspondientes a las concentraciones obtenidas se obtuvo una desviación estándar de 1.53; ninguno de los valores se encontró por encima de 13.06 que corresponde al valor esperado de $10+2S$, se observa también que ninguno se encontró por debajo de 6.93 que es el valor mínimo esperado correspondiente a $10-2S$.

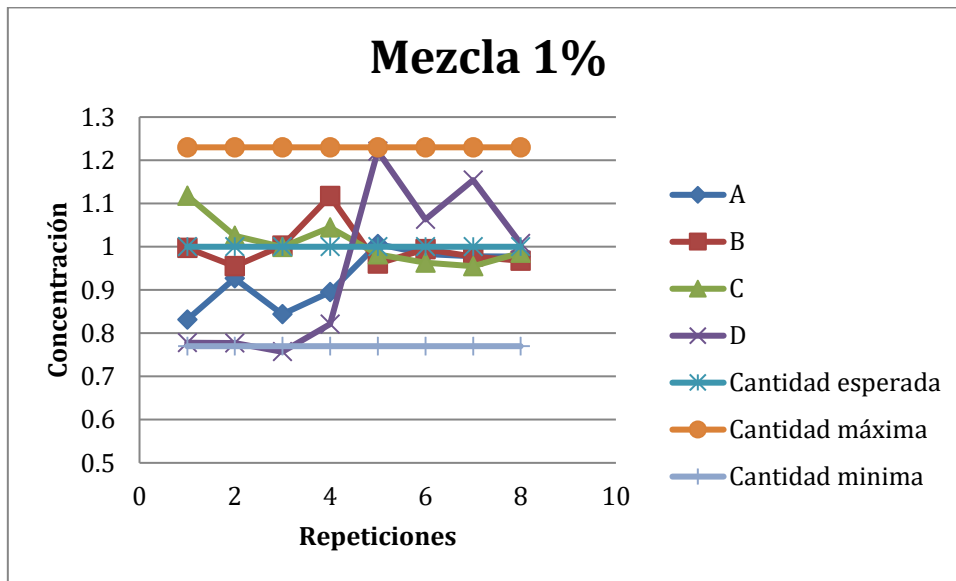


Figura 21. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y robustez para el porcentaje de 1. Los valores máximos y mínimos corresponden a $1\pm 2S$ con $n=32$

Al observar el comportamiento para la mezcla de 1% bajo condiciones de repetibilidad y robustez puede notarse que los valores correspondientes a las concentraciones obtenidas obtuvieron una desviación estándar de 0,11; se puede observar que todos los datos se encuentran en el rango de 1.23 a 0.77 que corresponde al valor esperado de $1\pm 2S$.

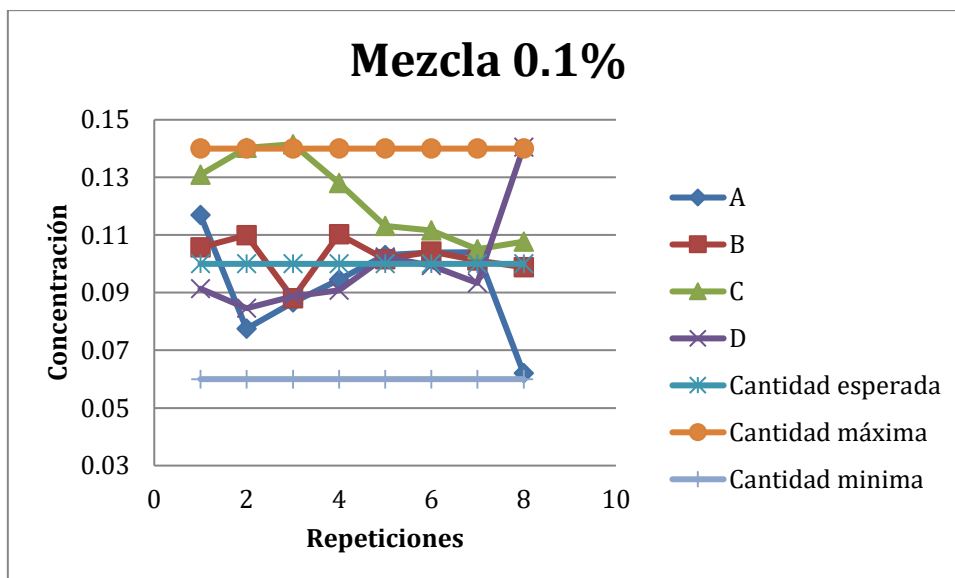


Figura 22. Concentraciones obtenidas bajo condiciones de repetibilidad y robustez para el porcentaje de 0.1. Los valores máximos y mínimos corresponden a $0.1 \pm 2S$ con $n=32$

En cuanto a la mezcla de 0.1% bajo condiciones de repetibilidad y robustez se observa que los valores correspondientes a las concentraciones obtenidas obtuvieron una desviación estándar de 0,019 y se encuentran muy cercanos a la concentración esperada de 0.1, pues en todos los casos se encuentran en el rango de 0.14 y .06 que corresponde al valor de $0.1 \pm 2S$.

9.6 Intervalo dinámico

Se conoce como intervalo dinámico al rango del método sobre la variable de la cual se obtienen valores precisos de C_p . Si se utiliza control endógeno para el método de cuantificación, el rango del objetivo y el control debe ser comparable.

Se determinó el intervalo dinámico mediante el comportamiento de amplificación de las diferentes mezclas dentro del intervalo de concentraciones de 100 – 0.01% del material de referencia certificado; al realizar las diluciones se estableció el intervalo en el rango de 100 a 0.1% ya que para cantidades de ADN inferiores la curva de calibración pierde linealidad, esto debido a que en la cuantificación absoluta, la interpolación dentro de este rango es precisa, pero

se debe evitar la extrapolación más allá del rango dinámico. Cuanto mayor sea el rango dinámico, mayor será la capacidad de detectar muestras con un número alto y bajo de copias en la misma ejecución (Dorak, 2013).

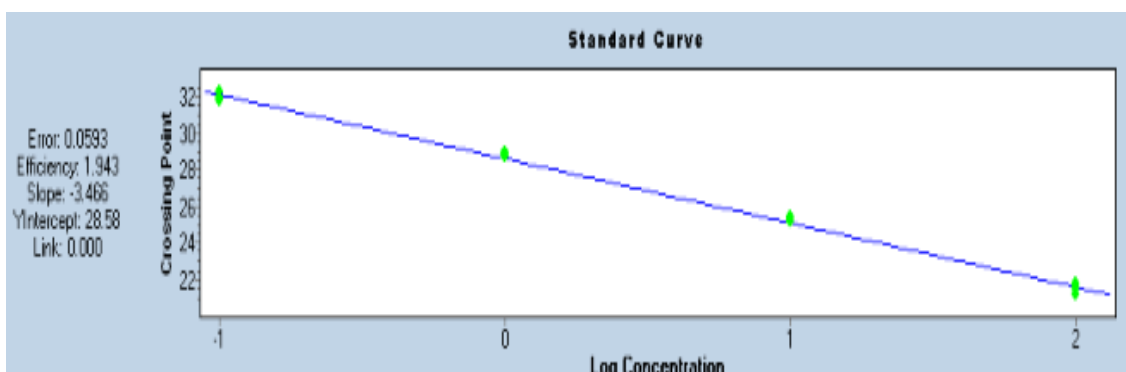


Figura 23. Curva de calibración para el evento específico KM-ØØØH71, obtenida en el termociclador Cyclyer480 II®.

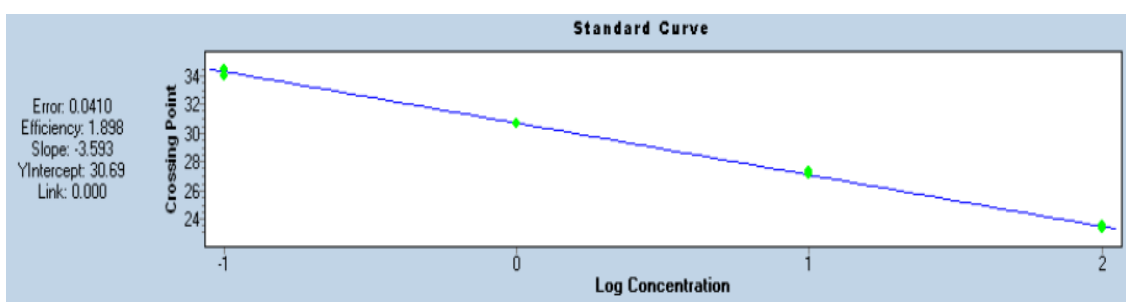


Figura 24. Curva de calibración para el gen endógeno GS, obtenida en el termociclador Cyclyer480 II®.

En la figura 23 se muestra el ejemplo de una regresión lineal para el evento específico KM-ØØØH71, en la cual se representa la amplificación de una dilución 1:10; la figura 24 corresponde a la regresión lineal del gen endógeno de betabel *gs*. Como se puede observar en las figuras, en ambos casos se cumplieron los parámetros de pendiente, eficiencia y error, por lo que se mantiene la linealidad.

9.7 Precisión

Se define como precisión al grado en que las mediciones repetidas bajo condiciones inalteradas muestran los mismos resultados. En este sentido la precisión se separa en la precisión total (reproducibilidad) y la precisión asociada con el instrumento analítico, es decir, la repetibilidad (Hospodsky *et*

al., 2010). La precisión del método se expresa en términos de la desviación estándar relativa bajo condiciones de repetibilidad y/o reproducibilidad. En la tabla 17 se muestran los valores obtenidos de desviación estándar relativa bajo condiciones de Repetibilidad (RSDr) calculados a partir de los ensayos de cuantificación bajo repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 17. Resultados de desviación estándar bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

Mezcla (%)	Repetibilidad	Reproducibilidad	RSDr (%)
	RSD	RSD	
100	10,33	10,77	10,80
10	0,966	0,940	10,45
1	0,132	0,087	11,98
0.1	0,022	0,019	21,34

Como se puede observar en la tabla anterior, el valor de desviación estándar relativa (RSDr) en los porcentajes no es mayor al 25% en ninguno de los casos, esto indica que existe concordancia entre los valores teóricos y los valores experimentales de acuerdo al promedio del contenido de OGM de cada mezcla GM. Al medir la precisión del método en términos de la repetibilidad y reproducibilidad, se puede evaluar la variación general e incorporar errores de la carga de la muestra, la preparación de la muestra y el error inherente a los instrumentos analíticos, que es la reproducibilidad; de la misma manera para la repetibilidad del instrumento, solo se mide el error en el equipo analítico, por lo anterior y con base en los resultados obtenidos se establece que la metodología utilizada para el análisis del evento específico KM-ØØØH71 mediante la técnica de qPCR es precisa y confiable.

9.8 Incertidumbre

Parámetro, asociado con el resultado de una medición, característico de la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente a lo que se mide. En la medición puede considerarse como la variabilidad en torno a los resultados comunicados, que se cuantifica como el valor "U" al considerar la incertidumbre expandida, y dentro de la cual se puede esperar que se encuentre el resultado real. Es necesario realizar el cálculo de la incertidumbre toda vez que es uno de los requisitos de la Norma ISO 17025:2005.

Tabla 18. Estimación de la incertidumbre bajo repetibilidad y reproducibilidad.

	Mezclas de harina OGM (%)			
	100	10	1	0.1
Promedio	106,89	9.02	0.95	0.099
S	10,38	0.96	0.11	0.02
U(RSD_{IP})	3.371	0.028	0.0004	0.00001

U(RSD_{IP})= Incertidumbre del componente de medición

Tabla 19. Estimación de la incertidumbre bajo repetibilidad y robustez.

	Mezclas de harina OGM (%)			
	100	10	1	0.1
Promedio	103.00	10.05	0.96	0.104
S	12.02	1.53	0.11	0.01
U(RSD_{IP})	4.52	0.07	0.0004	0.00001

La estimación de la incertidumbre sólo pudo ser calculada para el componente de medición ya que el Material de Referencia utilizado para el evento KM-ØØØH71 no tiene datos de incertidumbre asociada, por lo que el cálculo de la incertidumbre típica combinada y de la incertidumbre expandida no pudo ser realizado, sin embargo se puede observar en las tablas 18 y 19 que tanto para la incertidumbre de los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad como para repetibilidad y robustez la incertidumbre del componente de medición es muy baja, pues el mayor grado de incertidumbre lo aporta el Material de Referencia. De acuerdo a los criterios de Trapmann (2011), los resultados obtenidos cumplen con los criterios establecidos para el análisis de secuencias GM, donde se especifica que la incertidumbre debe ser $\leq 50\%$ en concentraciones de 0.1 a 0.9% de GM y $\leq 20\%$ en concentraciones de 1 a 100% de GM.

Por último, se realizó la prueba estadística de ANOVA para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos de

repetibilidad, reproducibilidad y robustez para la determinación del límite de cuantificación.

Los resultados arrojan que no existieron diferencias significativas entre las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad en ninguna de las cuantificaciones de las mezclas generadas, sin embargo al comparar los ensayos de repetibilidad y robustez, se encontró que para la cuantificación del porcentaje de 10 si existieron diferencias significativas entre las cuantificaciones, puesto que en el ensayo de repetibilidad para el porcentaje de 10, la cuantificación promedio de % de OGM fue de 9.01%, mientras que en el ensayo de robustez se calculó un porcentaje promedio de 11.09 (Ver anexo III).

10. CONCLUSIONES

Se comprobó la especificidad de los oligonucleótidos utilizados para el gen *gs*, endógeno de betabel, puesto que no existió amplificación con los diferentes genes endógenos de las especies maíz, soya, canola, alfalfa y algodón.

El sistema de extracción de ADN por el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), permitió obtener concentración de ADN con la calidad y cantidad necesaria para todas las mezclas ensayadas.

El ADN obtenido no presentó inhibidores ya que resultó con la pureza adecuada al obtener un Δ_{cp} menor a 0.5 en los ensayos de presencia de inhibidores realizados.

Para el evento específico KM-ØØØH71, se estableció el porcentaje 0.05 como el límite de detección bajo condiciones de repetibilidad, reproducibilidad y robustez para las plataformas Light Cyler 480II® y ViiA-7®.

Se estableció el porcentaje 0.10 como el límite de cuantificación para el evento específico KM-ØØØH71 en las plataformas Light Cyler 480II® y ViiA-7® bajo condiciones de repetibilidad, reproducibilidad y robustez.

La validación cumplió con los criterios establecidos en el procedimiento SDOGM-PR-VM “Validación de métodos para análisis de OGM” (MGC, CNRDOGM, 2016), de acuerdo a los parámetros aplicables al análisis de organismos genéticamente modificados.

Los resultados obtenidos para la validación del evento específico KM-ØØØH71 mediante la técnica de qPCR permiten su implementación en los ensayos de rutina del Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados.

Con esta validación el marco analítico nacional en materia de detección de Organismos Genéticamente Modificados se fortalece y apoya en la atención de las necesidades del sector, coadyuvando al intercambio comercial de los productos nacionales.

11. LITERATURA CITADA

Actualix. 2016. Remolacha países exportadores. Disponible en: <https://es.actualitix.com/pais/wld/remolacha-paises-exportadores.php>.

Armbruster, D. A., & Pry, T. 2008. Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation. *TheClinicalBiochemistReviews*, 29(Suppl 1), S49–S52.

Bartlett, J. W., & Frost, C. 2008. Reliability, repeatability and reproducibility: analysis of measurement errors in continuous variables. *Ultrasound in obstetrics & gynecology*, 31(4), 466-475.

Bazán, H. 2015. Detección de cebada maltera genéticamente modificada en cervezas por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Biocyclopedia. 2018. Genes & Genetic Engineering. Microinjection. [en línea] .Disponible en : https://biocyclopedia.com/index/biotechnology/genes_genetic_engineering/techniques_of_genetic_engineering/biotech_microinjection.php.

Biosafety scanner. 2017. *Sugarbeet H7-1 GM EVENT AND DETECTION METHODS*. [en línea] .Disponible en : <http://en.biosafetyscanner.org/schedaevento.php?evento=38>.

Biosafety Clearing-House (BCH). 2012. Rhizomania resistant, glyphosate tolerant sugarbeet. [en línea] .Disponible en : <http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=101878>.

Bodnar, A. 2010. Sugar beet biology. Inc..BiologyFortified, Inc. [en línea] .Disponible en: <https://www.biofortified.org/2010/08/sugar-beet-biology/> [Consultado 4 Mar. 2018].

Calderón, P. 2007. Inmunoquímica. Instituto de Biotecnología. UNAM. [en línea] .Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>

Canadian Food Agency. 2012. The Biology of *Beta vulgaris* L. (Sugar Beet). Disponible en: <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/beta-vulgaris-l-/eng/1330725373948/1330725437349#b3>.

Canals, R. M., Peralta, J. & Zubiri, E. 2009. Flora Pratense y Forrajera Cultivada de la Península Ibérica. Universidad Pública de Navarra. Disponible en: http://www.unavarra.es/herbario/pratenses/htm/creditos_p.htm.

Comisión Europea. 2003. El sector hortícola de la Unión Europea. Disponible en: https://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/horti/2003_es.pdf.

Comisión federal para la protección contra riesgos sanitarios. 2010. ¿Qué es un organismo genéticamente modificado? Disponible en: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/OGMS/Que-son-ogms-.aspx>.

CONABIO. 2009. Chenopodiaceae. *Beta vulgaris* L. Acelga silvestre. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/chenopodiaceae/beta-vulgaris/fichas/ficha.htm>.

Costa, J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica, 22(5), 299–305.

Cultek, S. L. 2006. Tecnología del DNA recombinante. Disponible en: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/DNA-recombinante/Tecnica%20DNA%20recombinante.pdf>.

Desjardins, P., Conklin, D. 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J. Vis. Exp.* (45), e2565, doi: 10.3791/2565.

Dharmaraj, S. 2017. The Basics: RT-PCR. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/references/ambion-tech-support/rtpcr-analysis/general-articles/rt-pcr-the-basics.html>.

De la Torre, M. 2011. Por un uso responsable de los organismos genéticamente modificados. Disponible en: <http://www.bionna.org>.

Díaz G. C., & Chaparro-Giraldo, A. 2012. Métodos de transformación genética de plantas. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(1), 49-61

Dohm, J., Minoche, A., Holtgräwe, D., Capella-Gutiérrez, S., Zakrzewski, F., Tafer, H., Rupp, O., Sörensen, T., Stracke, R., Reinhardt, R., Goesmann, A., Kraft, T., Schulz, B., Stadler, P., Schmidt, T., Gabaldón, T., Lehrach, H., Fedoroff, N. V.; Battisti, D. S.; Beachy, R. N.; Cooper, P. J. M.; Fischhoff, D. A.; Hodges, C. N.; Knauf, V. C.; Lobell, D.; Mazur, B. J.; Molden, D.; Reynolds, M. P.; Ronald, P. C.; Rosegrant, M. W.; Sanchez, P. A.; Vonshak, A.; Zhu, J.-K. 2010. Radically rethinking agriculture for the 21st century. *Science*, **327**, 833–834.

Domínguez, M. 2017. Detección y cuantificación por PCR tiempo real de genes involucrados en la vía de biosíntesis de deoxinivalenol y zearalenona de *Fusarium graminearum* en tortillas de maíz.

Dorak, M. T. 2013. Glossary of real-time PCR terms. Disponible en: <http://www.dorak.info/genetics/glosrt.html>.

ENGL. 2008. Definition of Minimum Performance Requirements for Analytical Methods of GMO Testing. European Network of GMO Laboratories (ENGL), (October 2008), 1–8. <https://doi.org/10.2788/65827>.

Fedoroff, N. V., Battisti, D. S., Beachy, R. N., Cooper, P. J., Fischhoff, D. A., Hodges, C. N., & Reynolds, M. P. 2010. Radically rethinking agriculture for the 21st century. *science*, 327(5967), 833-834.

Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. 2017. Method to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular detection and quantification*, 12, 1-6

Gutiérrez-Angoa, L., Castillo-Durán, L., Gómez-Castelo, B., & Acatzi-Silva, A. 2015. Cuantificación de maíz genéticamente modificado mediante las técnicas de qPCR y dPCR. *Agrociencia*, **49**(4), 373-394. ISAAA. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY.

Hanson, A. D., & Wyse, R. (1982). Biosynthesis, Translocation, and Accumulation of Betaine in Sugar Beet and Its Progenitors in Relation to Salinity. *Plant Physiology*, **70** (4), 1191–1198.

Hospodsky, D., Yamamoto, N., & Peccia, J. 2010. Accuracy, precision, and method detection limits of quantitative PCR for airborne bacteria and fungi. *Applied and environmental microbiology*, *76*(21), 7004-7012.

ISAAA. 2016. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016. ISAAA Brief No. 52. ISAAA: Ithaca, NY.

James, C. 2017. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2015. ISAAA Brief No. 51. ISAAA: Ithaca, NY.

Kagami, H., Kurata, M., Matsuhira, H., Taguchi, K., Mikami, T., Tamagake, H. and Kubo, T. 2015. ERRATUM TO: Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). In: Wang K. (eds) *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1223. Springer, New York, NY

Kontanis, E. J., & Reed, F. A. 2006. Evaluation of Real-Time PCR Amplification Efficiency to Detect PCR Inhibitors. *Journal of forensic sciences*, *51*(4), 795-804.

Kralik, P., & Ricchi, M. 2017. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in microbiology*, *8*, 108.

López, L. 2017. Detección de trigo (*Triticum spp*) transgénico en granos y productos comerciales, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Mazzara M., Munaro B., Larcher S., Grazioli E., Delobel C., Savini C., Van den Eede G. 2007: Events-specific for the Quantification of Soybean line 40-3-2 Using Real-time PCR; Validation Report and Protocol.

Mellon, M. 2010. Food security: rigorous regulation required. *Science*, *328*, 171–172.

Méndez, G. J. 2010. Producción orgánica de betabel (*beta vulgaris* L.) evaluación de variedades y efecto de dos compostas. Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., van den Hondel, C. A., & Ram, A. F. 2005. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Currentgenetics*, 48(1), 1-17.

Mullis K. B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de Biologie Clinique* 48: 579-82.

NCBI. 2017. PolimeraseChainReaction (PCR). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>.

Organizacion Mundial de Sanidad Animal. (2006). Validación Y Control De Calidad. Manual de Pruebas de Diagnostico Para Los Animales Acuáticos, 25–32. Disponible en: http://web.oie.int/esp/normes/fmanual/pdf_es/1.1.3_Validacion_y_control_de_calidad.pdf

Paredes, D. B., 2013. Detección de organismos genéticamente modificados en productos derivados de maíz o soya utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea. 2003. Reglamento (CE) no 1830/2003 relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos, y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE. *Diario Oficial n° L 268 de 18/10/2003 p. 0024 – 0028*.

Pedrosa Amado, Andrés. 1999. Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 3(2).

Peirson, S. N., Butler, J. N., & Foster, R. G. 2003. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Res*, 31(14), e73. <https://doi.org/10.1093/nar/gng073>

Phipps, R. and Park, J. 2002. Environmental benefits of genetically modified crops: global and European perspectives on their ability to reduce pesticide use. *J. Anim. FeedSci.*, **11**, 1–18.

SENASICA. 2016. LABORATORIO. [en línea] Disponible en: <http://publico.senasica.gob.mx/?id=6501>.

Secretaría de Agricultura, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2012. Es México potencia en producción y exportación de hortalizas; reto: diversificar oferta y mercados. [en línea] Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/jalisco/boletines/Paginas/B0322012.aspx>.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/de-la-raiz-a-la-punta-de-las-hojas-el-betabel-es-pura-salud?idiom=es>.

Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica 2000. Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica: texto y anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.

Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica 2011. Protocolo de Nagoya – Kuala Lumpur sobre la Responsabilidad y Compensación Suplementario al Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología: texto y anexos. Montreal: Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica.

Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. 2012. PCR inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*, **113**(5), 1014-1026.

Sergio, D., Maria, L., Benetti, S., Fay, F., Fay, O., Cibic, L., Rosario, C. S. a. 2006. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Anuario Fundación Dr. J.R Villavicencio, (XIV), 33–37.

Sepúlveda, A. C. 2014. Comparación de la inhibición de la reacción en cadena de la polimerasa según la extracción de DNA de *Cryptosporidium spp.* Licenciatura. Universidad de Chile.

Statista. 2014. Remolacha azucarera: productores principales del mundo por volumen en 2014. Disponible en: <https://es.statista.com/estadisticas/635376/remolacha-azucarera-productores-principales-del-mundo-por-volumen-en/>.

Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. 2015. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular detection and quantification*, 3, 9-16.

Tamay, L, C. Ibarra, C. Velasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Investigación y Atención a Quemados. Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), México, D.F., Medigraphic, 2(2), 70-78.

Trapmann S. Burns M. Broll H. Macarthur R. Wood R. Zel J. 2010. Guidance Document on Measurement Uncertainty for GMO Testing Laboratories

Universidad del País Vasco. 2012. Análisis de expresión génica mediante PCR a tiempo real o q-PCR. [en línea] Disponible en :http://www.ehu.es/SGLker/es/expresion_genica/documentos/analisis_de_expresion.pdf.

Velázquez, A., Aragón, C., & Romero, A. C. (2008). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas Moleculares Aplicadas En Ecología*, 1–26. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Watson, P. F., & Petrie, A. 2010. Method agreement analysis: a review of correct methodology. *Theriogenology*, 73(9), 1167-1179.

Weisshaar, B. and Himmelbauer, H. 2014 The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*). *Nature*. **505**, 546–549.

Zhu, G., Clemants, S., E. & Mosyakin, S. 2003. Chenopodiaceae (Flora of China). In book: Flora of China, Edition: Volume 5, Publisher: Beijing: Science Press & St. Louis: Missouri Botanical Garden Press, Editors: Wu Zhengyi, Peter H. Raven, pp.351-414.

12. ANEXO I Protocolo de extracción del Kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

- Pesar 300 mg del material de muestra en un microtubo de 2 ml
 - Añadir 700 µl de tampón AP1 y 4 µl de solución *stock* de RNasa A (100 mg / ml)
 - Incubar la mezcla durante 1 hr a 65 ° C en el equipo thermoblock EppendorfThermoMixer® con vortexeos cada 15 min.
 - Una vez finalizada la incubación agregar 130 µl de tampón P3 al lisado, mezclar e incubar durante 5 minutos en hielo.
 - Centrifugar el lisado por 5 min a 14,000 rpm
 - Trasladar el sobrenadante a la columna QIAshredder Mini (lila) colocada en un tubo de recolección de 2 ml y centrifugar durante 2 minutos a 14,000 rpm.
 - Transfiera la fracción de flujo del paso anterior a un tubo nuevo sin perturbar el *pellet* de desechos celulares.
 - Agregar 1,5 volúmenes de Buffer AW1 al lisado clarificado y mezclar por inversión.
 - Tomar 650 µl de la mezcla del paso previo, incluido cualquier precipitado que pueda haberse formado, en la columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 ml (suministrado).
 - Centrifugar durante 1 minuto a ≥ 8000 rpm y deseche el flujo.
- * Reutilice el tubo de recolección en el paso anterior.
- Repita el paso anterior con la muestra restante.
- *Deseche el flujo y el tubo de recolección
- Coloque la columna giratoria DNeasy Mini en un nuevo tubo de recolección de 2 ml (suministrado), agregar 500 µl de tampón AW2 y

centrifugar durante 1 minuto a ≥ 8000 rpm. Desechar el líquido y reutilizar el tubo de recolección en el paso anterior.

- Agregar 500 μ l Buffer AW2 a la columna DNeasy Mini spin y centrifugue durante 2 minutos a 14,000 rpm para secar la membrana.
- Transferir la columna giratoria DNeasy Mini a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml o 2 ml y agregar 50 μ l de tampón AE directamente sobre la membrana DNeasy.
- Incubar durante 5 minutos a 65 ° C en el equipo **thermoblock EppendorfThermoMixer®** y posteriormente centrifugar durante 1 minuto a ≥ 8000 rpm para eluir.
- Repita el paso anterior

13. Anexo II. Certificado de Material de Referencia MR941



Certified Reference Material

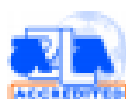
Address:
2710 S. Boulder Drive, Urbana, IL 61802 USA
Email: CRM@aoocs.org
Tel: +1-217-359-2344; Fax: +1-217-351-8091

Certificate of Analysis AOCS 1206-B, H7-1 sugar beet seed powder			
Certified Property	Certified Presence	Measurement Uncertainty	Test Method
H7-1	Yes Pure, Heterozygous H7-1 sugar beet seed	NA	Immunoassay Test Kit and event-specific real-time PCR
<p>Description: This is the first batch of H7-1 sugar beet seed CRM prepared by AOCS for Monsanto Company. This material is for limited purposes only: see "Intended Use" and "Terms and Conditions."</p>			
<p>This certificate is valid through: August 2017</p> <p>This validity may be extended when further evidence of stability becomes available. Customers will be notified by AOCS if a stability issue arises at AOCS Headquarters. Introduced: 3 January 2007 Revised: 3 April 2008 , 3 May 2009 , 3 May 2011 , 3 January 2012 , 13 June 2012, 17 February 2013, 29 May 2013, 24 July 2013, 27 August 2013, 9 July 2014, 31 August 2015</p>			
<p>AOCS Reference Materials Manager G. M. Clapper Urbana, IL 61802</p>		<p>AOCS Chief Science Officer and Technical Director R. C. Cantrell Urbana, IL 61802</p>	
<p>AOCS Mission: AOCS advances the science and technology of oils, fats, surfactants and related materials, enriching the lives of people everywhere.</p>			

Characterization

Product Description

AOCS 1206-B has been prepared by AOCS from sugar beet seed seed. AOCS 1206-B is available in 27-mL glass headspace vials containing approximately 10 g of sugar beet seed powder. Users are informed that this reference material has been produced from seed of H7-1 sugar beet



ISO Guide 34
A2LA Certificate 3438.01

Certificate of Analysis for 1206-B
Page 1 of 4, © AOCS, 2015

14. Anexo III

Imágenes de las curvas obtenidas al realizar la prueba de inhibidores en el equipo Light Cycler 480®

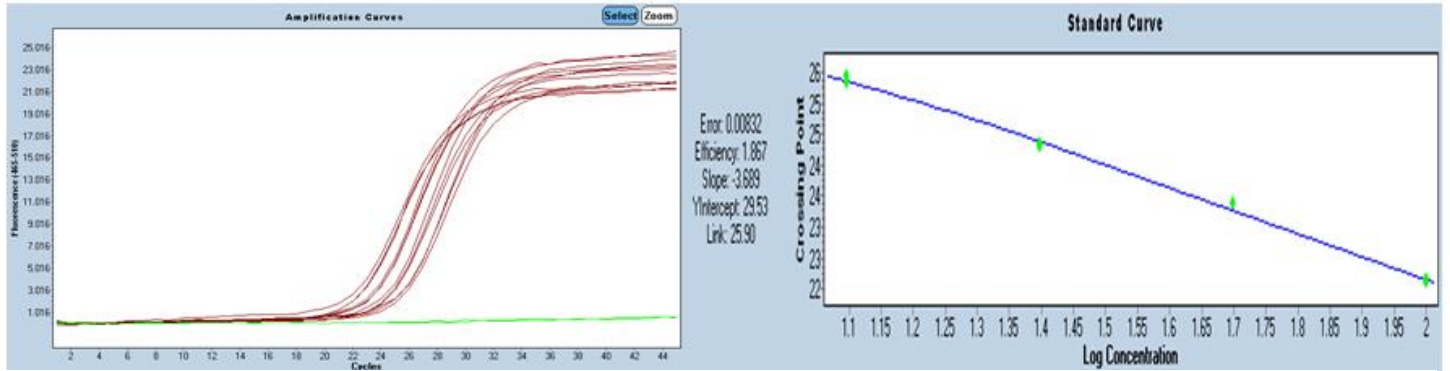


Figura 27. Curva para verificar la presencia de inhibidores, se muestran los parámetros de eficiencia, pendiente y error.

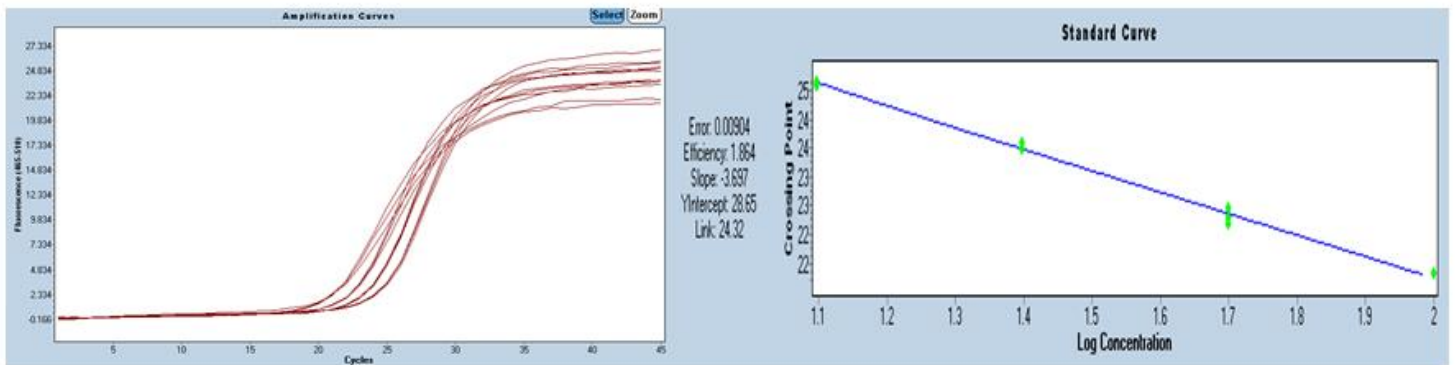


Figura 25. Curva para verificar la presencia de inhibidores, se muestran los parámetros de eficiencia, pendiente y error.

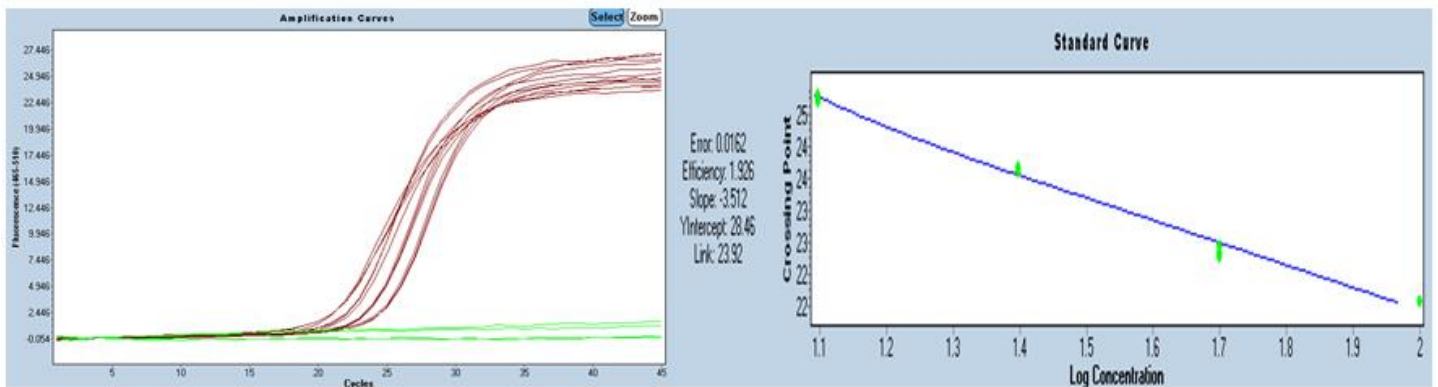


Figura 26. Curva para verificar la presencia de inhibidores, se muestran los parámetros de eficiencia, pendiente y error.

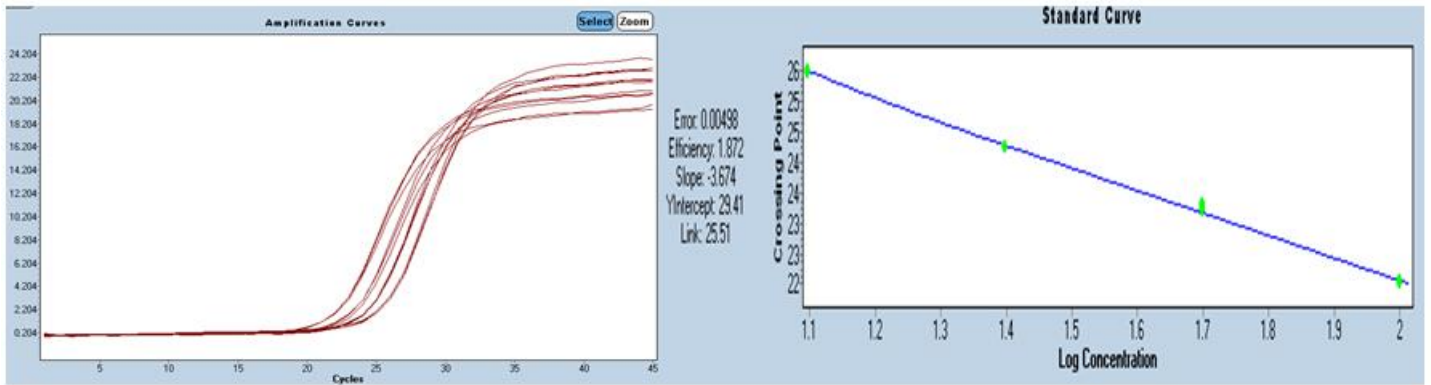


Figura 28. Curva para verificar la presencia de inhibidores, se muestran los parámetros de eficiencia, pendiente y error.

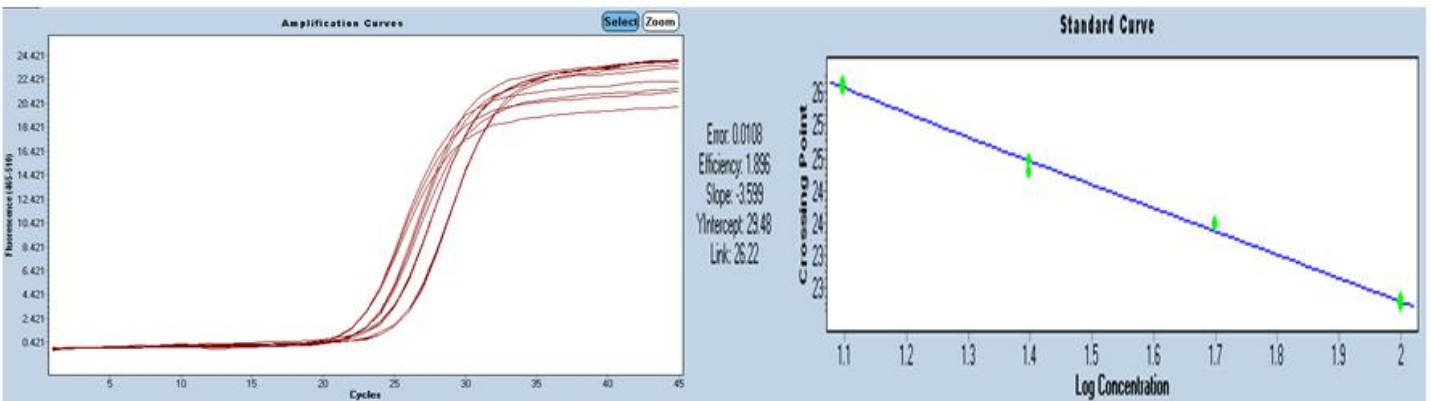


Figura 29. Curva para verificar la presencia de inhibidores, se muestran los parámetros de eficiencia, pendiente y error.

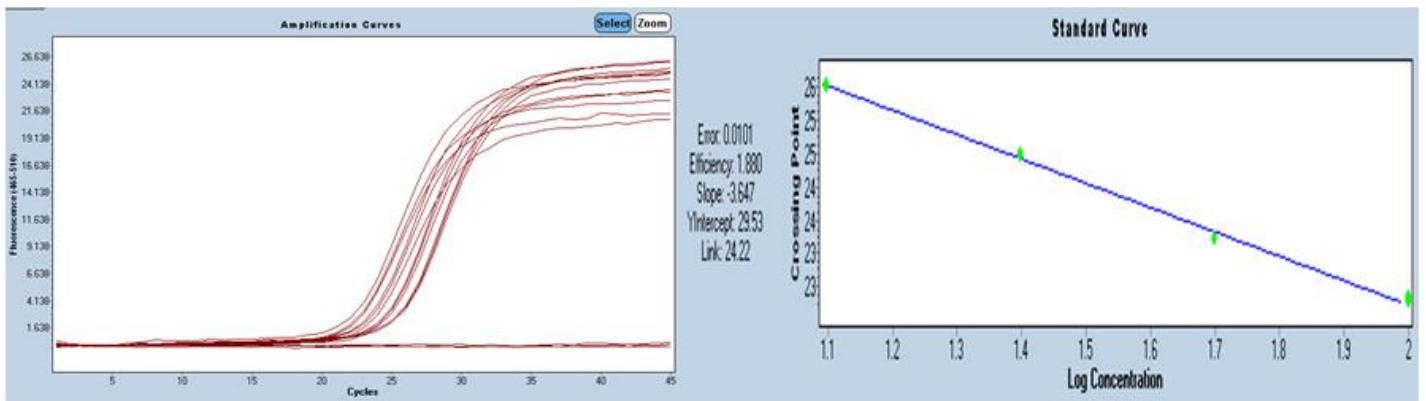


Figura 30. Curva para verificar la presencia de inhibidores, se muestran los parámetros de eficiencia, pendiente y error.

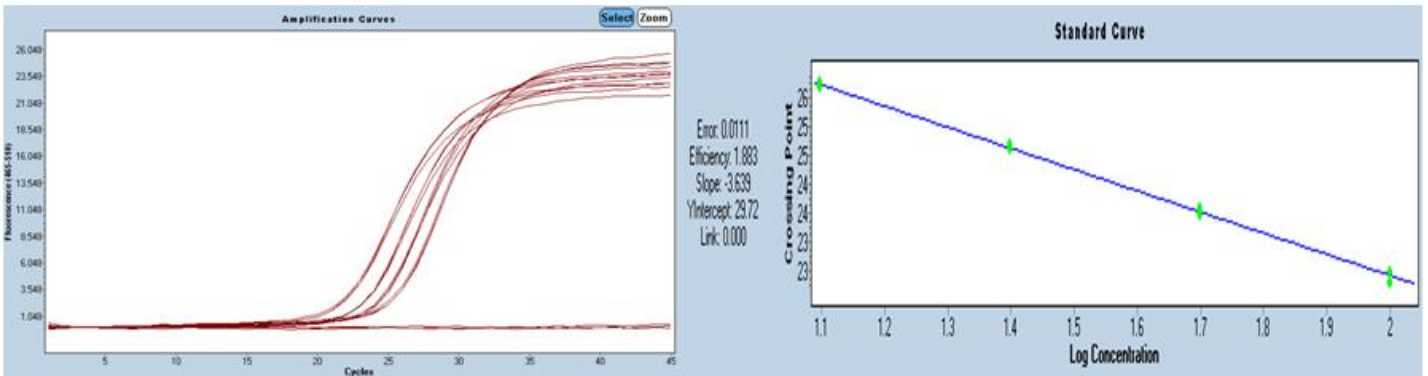


Figura 32. Curva para verificar la presencia de inhibidores, se muestran los parámetros de eficiencia, pendiente y error.

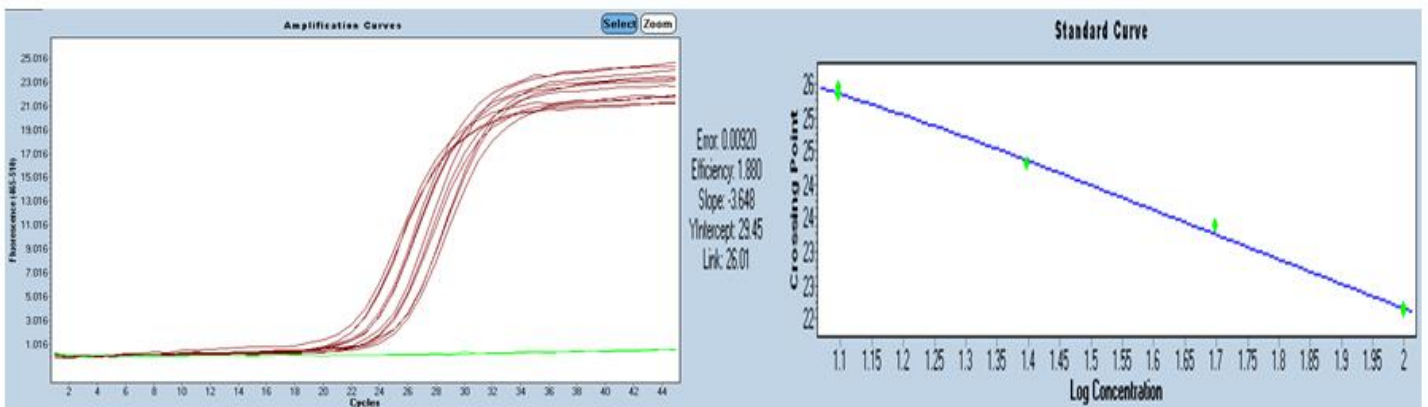


Figura 31. Curva para verificar la presencia de inhibidores, se muestran los parámetros de eficiencia, pendiente y error.

15. Anexo IV. Análisis de Varianza

Repetibilidad y Reproducibilidad

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	8	940,369569	117,546196	31,5154113
Columna 2	8	864,344448	108,043056	49,7642658
Columna 3	8	769,33603	96,1670038	104,126877
Columna 4	8	802,32001	100,290001	86,3194726

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	2126,61077	3	708,870257	10,4350734	8,8611E-05	2,94668527
Dentro de los grupos	1902,08219	28	67,9315066			
Total	4028,69296	31				

Figura 33. Análisis de varianza para la mezcla de 100% repetibilidad vs reproducibilidad

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	8	82,8297528	10,3537191	0,07077282
Columna 2	8	70,5846538	8,82308173	0,34831865
Columna 3	8	64,6503424	8,0812928	0,08791853
Columna 4	8	69,3647113	8,67058891	0,17871847

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	22,5209482	3	7,50698272	43,7898263	1,0581E-10	2,94668527
Dentro de los grupos	4,80009934	28	0,17143212			
Total	27,3210475	31				

Figura 34. Análisis de varianza para la mezcla de 10% repetibilidad vs reproducibilidad.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	8	6,99402697	0,87425337	0,00170388
Columna 2	8	8,14391443	1,0179893	0,00411902
Columna 3	8	8,37625789	1,04703224	0,00221959
Columna 4	8	6,98169216	0,87271152	0,02037221

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,20570354	3	0,06856785	9,6524463	0,00015343	2,94668527
Dentro de los grupos	0,19890292	28	0,00710368			
Total	0,40460646	31				

Figura 35. Análisis de varianza para la mezcla de 1% repetibilidad vs reproducibilidad.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	8	0,76701566	0,09587696	0,0003511
Columna 2	8	0,86509488	0,10813686	0,00012547
Columna 3	8	0,85346025	0,10668253	0,00122574
Columna 4	8	0,70734664	0,08841833	8,1478E-06

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00209443	3	0,00069814	1,63263789	0,20422299	2,94668527
Dentro de los grupos	0,01197325	28	0,00042762			
Total	0,01406768	31				

Figura 36. Análisis de varianza para la mezcla de 0. 1% repetibilidad vs reproducibilidad

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	8	907,504459	113,438057	85,5802334
Columna 2	8	858,078598	107,259825	127,563332
Columna 3	8	743,444815	92,9306019	76,6440565
Columna 4	8	787,775547	98,4719434	86,8394547

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1991,94162	3	663,980541	7,05186197	0,00112219	2,94668527
Dentro de los grupos	2636,38954	28	94,1567693			
Total	4628,33116	31				

Figura 37. Análisis de varianza para la mezcla de 100% repetibilidad vs robustez.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	8	83,7213899	10,4651737	0,09149281
Columna 2	8	83,8952704	10,4869088	4,01089925
Columna 3	8	70,3886275	8,79857843	0,95293372
Columna 4	8	82,7371682	10,342146	3,24042348

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	16,0943295	3	5,3647765	2,58675923	0,07293222	2,94668527
Dentro de los grupos	58,0702448	28	2,07393732			
Total	74,1645743	31				

Figura 38. Análisis de varianza para la mezcla de 10% repetibilidad vs robustez.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	8	7,44107175	0,93013397	0,00450167
Columna 2	8	7,97195722	0,99649465	0,0026752
Columna 3	8	8,07527833	1,00940979	0,00282558
Columna 4	8	8,41545229	1,05193154	0,01033915

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,06114238	3	0,02038079	4,0077072	0,01714519	2,94668527
Dentro de los grupos	0,1423912	28	0,0050854			
Total	0,20353358	31				

Figura 39. Análisis de varianza para la mezcla de 1% repetibilidad vs robustez.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Columna 1	8	0,76454024	0,09556753	0,00041667
Columna 2	8	0,85697347	0,10712168	9,2259E-05
Columna 3	8	0,74028364	0,09253545	0,00041325
Columna 4	8	0,79596302	0,09949538	0,00043733

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0,00095496	3	0,00031832	0,93656727	0,43612427	2,94668527
Dentro de los grupos	0,00951661	28	0,00033988			
Total	0,01047157	31				

Figura 40. Análisis de varianza para la mezcla de 0.1% repetibilidad vs robustez.