



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA DE CAPTURA DE ADN DE
ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS POR SONDAS DE
ARN ACOPLADAS A PERLAS ELECTROMAGNÉTICAS PARA EL
SISTEMA DE PIROSECUENCIACIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

VALERIA ORTEGA MENDOZA



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dr. Samuel Canizales Quinteros

VOCAL: Profesor: Dr. Felipe Cruz García

SECRETARIO: Profesor: M. en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2° SUPLENTE: Profesor: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CENTRO NACIONAL DE REFERENCIA EN DETECCIÓN DE ORGANISMOS GENÉTICAMENTE MODIFICADOS (CNRDOGM), CARRETERA FEDERAL MÉXICO-PACHUCA KM 37 C. P. 55740, TECAMAC ESTADO DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Abraham Itzcoatl Acatzi Silva

SUSTENTANTE:

Valeria Ortega Mendoza

DEDICATORIAS

A usted lector.



“Todo es veneno, nada es sin veneno. Sólo la dosis hace el veneno.”
PARACELSO (Theophrastus Phillippus Aureolus Bombastus Von Hohenheim).

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos aquellos que hicieron posible la realización de esta tesis y gracias también, a quiénes me acompañaron durante este tiempo:

MI FAMILIA (Seferina, Daria⁺, Albino⁺, Trinidad⁺, María Carolina, Roberto, Carito, Odette, Andrés, Roberto Carlos, Elena, Kitty, Emiliano, César, Diego Alejandro, Arturo, Guadalupe, Daniela, Luis Arturo, Mario, Lucero, Aimee, Chibigón, Pipita), ya que sin su apoyo no lo hubiera logrado.

EL EQUIPO DEL CNRDOGM Y LOS QUE PERTENECIERON A ÉL (Abraham, Lupita, Zhaila, Claudia, Salvador, Jose Luis, Karina, Abril, Luis, Isabel, Felipe, Lizbeth, Arturo, Rafael, Blanca Estela, Ana Lilia, Guadalupe, Yesenia, Miriam, Joel, César, Juan Manuel, Juan Carlos, Rosalba, Astrid, Blanca, Selene, Luz, Geovanni, Omar y todos los chicos de servicio social y estancia que no recuerdo), gracias por haber compartido su conocimiento y experiencia y gracias por todos los ratos agradables (y no tanto), incómodos, estresantes y divertidos que pasamos juntos.

MÉXICO Y SU GOBIERNO, EN ESPECIAL LA SAGARPA-SENASICA Y LOS INTEGRANTES DE CENASA ya que, sin ellos, esta tesis no hubiera sido posible. Gracias a todos los que conocí en los laboratorios del CENASA porque hicieron realmente agradables y divertidos los viajes hacia el trabajo y de regreso.

MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE LA UNAM (Chio, Clau, Liz, Malu, Isa, Mariana, Claudia, Caro, Sara, Isabel, Sandybel, Aidée, Carmen, Teresa, Erika, Cristina, Fabiola, Srita. Pelayo, Ana María, Rosario, Katia, Jimena, Sandra, Alisul, Ana, Alina, Shamira, Frida, Itzel, Caro, Daniel, Fanito, Carlitos, Luis Alberto, Aarón, Andrés, Sr. Cucharón-Montaña, Yabin, Ramón, May, Esteban, Waldo, Alberto, Edgar, Edwin, Sr. Cerecedo, Eduardo, Daniel Pablo, Víctor, Héctor, Hans, Martín, Omar, René, Edgar Arturo, los vecinos y compañeros de LABTEC, los que me faltaron tanto del grupo 14 y de mis equipos y los compañeros del CELE) gracias a ustedes por el tiempo compartido, por su apoyo, sus porras y consejos, por hacerme reír y por hacer que la estancia en la Facultad fuese leve.

MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DEL IPN (Zuilly, Maribel, y los que me faltan de las *Frutas Frescas* y del *Dewey's Site*, Ale, Dulce, Moy, Gina, Gaby, Edna de amigas que somos, Iris, Karina, Yuri, Ana Karen, Alí, Pichis amigo, Héctor, todos los *Upibianos* que me hagan falta y los compañeros del CENLEX) sin ustedes no hubiera conocido sus vicios (y los míos), el trabajo en equipo, los enojos, desveladas y tantas cosas más.

TODOS MIS PROFESORES que durante la carrera me proporcionaron su conocimiento, experiencia, frustraciones, consejos y esos momentos de adrenalina (llamados exámenes).

MI ASESOR Y EL JURADO que dedicaron una parte de su valioso tiempo a la revisión de esta tesis.

LA FACULTAD DE QUÍMICA por ser la mejor facultad, por contar con los mejores profesores, por tener a los mejores estudiantes y por permitirme ser parte de ella.

Y FINALMENTE, GRACIAS A LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS UNAM por dejarme pertenecer a una gran comunidad y por haberme dado tantos beneficios que no terminaría de contar.

☺ *De verdad iiiMUCHAS GRACIAS!!!* ☺

ÍNDICE

ABREVIATURAS, SIGLAS, UNIDADES Y OTROS TÉRMINOS	7
I. RESUMEN	9
II. JUSTIFICACIÓN	10
III. INTRODUCCIÓN	11
IV. MARCO TEÓRICO	13
IV.1 OGM y su proceso de generación	13
IV.2 La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como técnica para detección de OGM	14
IV.3 Los materiales de referencia (MR) y su uso en la PCR	18
IV.4 La pirosecuenciación como método de secuenciación de nueva generación (NGS)	18
IV.5 Sistema de captura de ADN por sondas de ARN acopladas a perlas electromagnéticas	22
V. OBJETIVOS	25
V.1 Objetivo General	25
V.2 Objetivos Particulares	25
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	27
VII.1 Evaluación analítica de las sondas de ARN sintetizadas	27
VII.1.1 Calidad de sondas de ARN mediante electroforesis en "chip" de Alta Sensibilidad	27
VII.2 Diseño y elaboración de bibliotecas de las matrices 1, 2, 3 y 4	28
VII.2.1 Extracción de ADN	28
VII.2.1.1 Elaboración de Matriz 1 y Matriz 2	28
VII.2.1.2 Elaboración de Matriz 3 y Matriz 4	29
VII.2.2 Preparación de bibliotecas	30
VII.2.3 Calidad de bibliotecas mediante electroforesis en "chip" de Alta Sensibilidad	30
VII.3 Hibridación	30
VII.3.1 Amplificación de bibliotecas	31
VII.3.2 Calidad de bibliotecas amplificadas mediante electroforesis en "chip" 7500	31
VII.3.3 Hibridación	32
VII.3.4 Amplificación de bibliotecas capturadas	32
VII.3.5 Calidad de bibliotecas capturadas y amplificadas mediante electroforesis en "chip" de Alta Sensibilidad	33
VII.4 Cuantificación	34
VII.5 Emulsión pequeña (emPCR SV) de bibliotecas capturadas y amplificadas	35
VII.6 Emulsión grande (emPCR LV) de bibliotecas capturadas y amplificadas	37
VII.7 Corrida de secuenciación	39
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
VIII.1 Evaluación analítica de las sondas de ARN sintetizadas	44
VIII.2 Diseño y elaboración de bibliotecas de las matrices 1, 2, 3 y 4	45

VIII.2.1 Elaboración de matrices M1, M2, M3 y M4	45
VIII.2.2 Preparación de bibliotecas	47
VIII.3 Hibridación	49
VIII.3.1 Amplificación de bibliotecas	49
VIII.3.2 Hibridación y post-hibridación	54
VIII.3.3 Amplificación de bibliotecas capturadas	57
VIII.4 Cuantificación	60
VIII.5 Emulsión pequeña (emPCR SV) de bibliotecas capturadas y amplificadas	63
VIII.6 Emulsión grande (emPCR LV) de bibliotecas capturadas y amplificadas	65
VIII.7 Corrida de secuenciación	67
VIII.8 Evaluación de las lecturas capturadas	75
IX. CONCLUSIONES	79
X. PERSPECTIVAS	80
XI. REFERENCIAS	81
ANEXO I: RESUMEN DE RESULTADOS	86
ANEXO II: MARCO LEGAL DE OGM	87
ANEXO III: INFORMACIÓN ADICIONAL PARA LA METODOLOGÍA	91
ANEXO IV: RESULTADOS SUPLEMENTARIOS	98

ABREVIATURAS, SIGLAS Y OTROS TÉRMINOS

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

ATP: Adenosin trifosfato.

BB2: Disolución amortiguadora de perlas 2 (*Bead Buffer 2*).

BDD: Dispensador de deposición de perlas (*Bead Deposition Device*).

C1: perlas electromagnéticas C1.

CENAM: Centro Nacional de Metrología.

CIBIOGEM: Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados.

Cor 1: corrida de secuenciación 1.

Cor 2: corrida de secuenciación 2.

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

CONACyT: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

ddNTP: didesoxinucleotidos trifosfato (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP).

dNTP: desoxinucleotidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

DTT: Ditiotreitól.

eArray: programa de arreglos virtuales para relacionar lógicamente secuencias.

EMA: Entidad Mexicana de Acreditación.

emPCR LV: Reacción en cadena de la polimerasa en emulsión grande (*emulsion Polymerase Chain Reaction Large Volume*).

emPCR SV: Reacción en cadena de la polimerasa en emulsión pequeña (*emulsion Polymerase Chain Reaction Small Volume*).

GM: Genéticamente Modificado o Genéticamente Modificados.

Hyb I: Hibridación I.

Hyb II: Hibridación II.

Hyb III: Hibridación III.

LBOGM: Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

M1: Matriz 1.

M2: Matriz 2.

M3: Matriz 3.

M4: Matriz 4.

MR: Material de Referencia o Materiales de Referencia

NCBI: Centro Nacional de Información sobre Biotecnología de Estados Unidos de América (*National Center for Biotechnology Information*).

NGS: Secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*).

OGM: Organismo Genéticamente Modificado u Organismos Genéticamente Modificados.

PBI: Disolución amortiguadora con hidrocloreuro de guanidina e isopropanol.

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

PCRpf: Reacción en Cadena de la Polimerasa en punto final.

PE: Disolución amortiguadora con Tris y etanol.

PNK: Cinasa polinucleótido.

PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.

Ppi: pirofosfato inorgánico (*pyrophosphate inorganique*).

PPiase: Cis-trans propil isomerasa.

PTP: Placa de secuenciación (*Pico Titer Plate*).

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (*real time Polymerase Chain Reaction*).

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

SE: Secretaría de Economía.

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

SEP: Secretaría de Educación Pública.

SeqGMOCap: Sistema de captura de secuencias de Organismos Genéticamente Modificados (*Sequences Genetically Modified Organisms Captured System*).

SHCP: Secretaría de Hacienda y Crédito Público.

SSALUD: Secretaría de Salud.

T1: perlas electromagnéticas T1.

Taq: *Thermophilus aquaticus*.

TE: Disolución amortiguadora con 10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.

WS: Solución de Trabajo (*Working Solution*).

% (v/v): porcentaje volumen / volumen

": pulgada.

° C: grados Celsius.

bp: pares de bases (*base pairs*).

cpb: copias de biblioteca de ADN por perla (*copies per bead*).

FU: unidades de fluorescencia (*Fluorescent Units*).

h: hora.

Hz: hercio.

Mb: mega bases.

min: minuto.

N: normal.

psi: libra por pulgada cuadrada 14.696 psi = 1 atm

rpm: revoluciones por minuto.

s: segundo.

I. RESUMEN

En México, la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) tiene como uno de sus objetivos regular la liberación al ambiente de organismos genéticamente modificados (OGM), con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que esas actividades pudieran ocasionar a la salud humana y a la sanidad vegetal, animal y/o acuícola. Para el cumplimiento de esta Ley, se realizan actividades como la secuenciación de los eventos genéticamente modificados (GM) liberados al ambiente así como del monitoreo en cultivos no permitidos.

En el presente estudio, la técnica de pirosecuenciación se integró a un sistema de captura de ADN de OGM mediante sondas de ARN acopladas a perlas electromagnéticas (*SeqGMOCap*), que permitió la captura de ADN de varios eventos GM contenidos en una muestra llamada matriz, la cual incluyó cinco diferentes especies GM. El protocolo aplicado primero se evaluó con la matriz diseñada con el fin de optimizar las condiciones experimentales y observar la captura de los elementos transgénicos; después se corroboró la funcionalidad del protocolo generado, repitiendo el experimento con la misma matriz.

Se concluyó que el protocolo experimental optimizado para el sistema *SeqGMOCap* implementado a la pirosecuenciación fue adecuado. Además fue posible determinar que la técnica aplicada para *SeqGMOCap* es adecuada para la captura de secuencias transgénicas de una matriz con eventos GM conocidos de cinco diferentes especies. El presente estudio fue el primero en su tipo, debido a que se logró implementar el sistema de captura de ADN enfocado a OGM de varias especies al sistema de pirosecuenciación y se logró generar un protocolo optimizado que cumplió con el sistema de gestión de calidad del CNRDOGM con el que se obtuvieron resultados técnico-científicos confiables.

II. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a la LBOGM, las autoridades mexicanas competentes deben garantizar la protección de la salud humana y proteger las especies de centro de origen respecto a los efectos adversos que pudieran ocasionar la realización de actividades con OGM. Por ello, es imprescindible identificar y caracterizar totalmente éstos organismos; la mayoría de las caracterizaciones genéticas distinguen genotipos y verifican la identidad de la población por medio del uso de métodos de nueva generación, la pirosecuenciación es uno de ellos; sin embargo, el uso de sistemas de captura de ADN o *SeqCap* acoplados a estos métodos de secuenciación, ha logrado la optimización de muestras a secuenciar. Actualmente, no existen trabajos reportados que aprovechen estos *SeqCap* en la caracterización de las construcciones insertadas en un OGM, por ello al implementar un sistema de captura de ADN de OGM (*SeqGMOCap*) a la pirosecuenciación se buscó realizar un protocolo funcional y acoplarlo al método de pirosecuenciación validado por el CNRDOGM, con el cual se logrará la caracterización masiva de elementos genéticamente modificados (GM) que el CNRDOGM analiza.

III. INTRODUCCIÓN

Los Estados Unidos Mexicanos se rigen por una jerarquía del orden jurídico, es decir Constitución Política, Tratados Internacionales, Leyes, Reglamentos, Normas Oficiales Mexicanas, Ordenamientos, acuerdos, resoluciones, modificaciones circulares y por Normas individualizadas. El documento más importante de esta jerarquía es la Constitución Política y con base en ella se dan los diferentes acuerdos internacionales para la comercialización de productos y servicios. Para que estos tratados sean adoptados por todo el país, es necesario elaborar leyes, reglamentos y normas que dictaminen las acciones necesarias para cumplir con ellos (ANEXO II).

En 2003, México adoptó el Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología o Protocolo de Bioseguridad (Figura 1), el cual es un acuerdo internacional que tiene como objetivo contribuir a garantizar un nivel adecuado de protección en la esfera de la transferencia, manipulación y utilización seguras de los organismos vivos modificados resultantes de la biotecnología moderna. Una consecuencia de la adopción de este Protocolo fue la expedición de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados o LBOGM (Álvarez y Gloria, 2012; AgroBIO, 2012).



Figura 1. Desarrollo del marco legal de OGM en México (AgroBIO, 2012).

La LBOGM tiene como objetivo regular las actividades de utilización confinada, liberación experimental, liberación en programa piloto, liberación comercial, comercialización, importación y exportación de OGM, con el fin de prevenir, evitar o reducir los posibles riesgos que estas actividades pudieran ocasionar a la salud humana o al medio ambiente y a la diversidad biológica o a la sanidad animal, vegetal y acuícola. Para cumplir con ésta Ley es necesario establecer un régimen de permisos que involucran una serie de análisis y trámites dentro de los cuales se involucra a diversas secretarías de estado como la Secretarías de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), la Secretaría de Salud (SSALUD) y la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM) (AgroBIO, 2012).

La información presentada por la CIBIOGEM indica que los OGM con mayor número de cultivos aprobados para su liberación en el periodo 1988-2005 son algodón, soya y maíz (ANEXO II).

El Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM) se instauró debido al aumento en la demanda de análisis para la detección, identificación y cuantificación de OGM por efecto de la última modificación del Reglamento de la LBOGM (Reglamento de LBOGM, 2009); su misión es conducir actividades para detectar, identificar y cuantificar, así como secuenciar OGM de especies vegetales, animales, acuícolas y microorganismos, relacionadas con la utilización confinada, liberación al ambiente en etapa experimental, programa piloto y comercial. Actualmente el CNRDOGM realiza análisis de OGM en semillas, hojas y granos de algodón, soya y maíz a fin de detectar, identificar, cuantificar y secuenciar la presencia de características como la resistencia a plagas, tolerancia a herbicidas o resistencia a sequía (SENASICA, 2012).

IV. MARCO TEÓRICO

IV.1 OGM y su proceso de generación.

Existen diversas definiciones de OGM, algunas de estas son:

- Aquellos organismos en los que el material genético o ADN ha sido alterado de un modo artificial (FAO, 2002).
- Organismos vivos, con excepción de los seres humanos, que han adquirido una combinación genética novedosa, generada a través del uso específico de técnicas de la biotecnología moderna (LBOGM, 2005).
- Variedades de especies conocidas a los que se les ha conferido alguna capacidad funcional (detectable, heredable e intencionalmente útil), por tecnologías de ingeniería genética a partir de la incorporación de los factores hereditarios (transgenes) de especies distantes o cercanas (AgroBIO México, 2012).
- Organismos en los cuales el material genético ha sido alterado de una manera que no ocurre de forma natural por apareamiento y/o recombinación natural. Las plantas GM son aquellas en cuyo genoma se han introducido de forma estable uno o varios genes procedentes de otras especies, mediante técnicas de transferencia genética y en la mayoría se ha comprobado que tales genes introducidos hacen que se obtenga un producto génico (proteína). (Council Directive, 2001).

Al desarrollarse la ingeniería genética, fue posible transferir genes específicos de un organismo a otro aunque no exista compatibilidad entre ellos, el resultado ha sido la manifestación de características específicas en éstos transgenes. Esta aplicación biotecnológica requiere un hospedero y un donante, es decir, un organismo que reciba los genes y otro que los aporte (Garrido *et al.*, 2007). Una técnica para generar un donante es la clonación que consiste en escoger una porción de ADN en particular que será fragmentada por medio de un enzima llamada endonucleasa de restricción; los fragmentos obtenidos se unen a otras

moléculas de ADN que sirven de vectores o ADN al que se le insertará el ADN foráneo. El vector que lleva al ADN insertado (ADN recombinante) se transfiere a una célula huésped, dentro de la que se replicará produciendo copias idénticas o clones y las descendientes heredarán el ADN recombinante; estos clones o donantes se seleccionan para implantarlas mediante técnicas de ADN recombinante y obtener plantas completas que puedan propagarse, estas plantas son denominadas OGM o transgénicos (Mussin, 2006).

Para que los genes donados puedan insertarse en los hospederos existen principalmente dos técnicas. La primera técnica es la transformación mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, este es un agente patógeno que tiene la capacidad natural de transferir genes a las plantas que infecta o huéspedes, entrando por una herida, inyectando su material genético en el interior de la célula y haciendo que una pequeña porción se integre al genoma del huésped. La segunda técnica es la biobalística, ésta consiste en transportar el ADN al interior de una célula por medio de la adhesión de los genes a pequeñas partículas metálicas, las que actúan como balas a alta velocidad sobre un cultivo de células del vegetal a modificar (Tamasi *et al.*, 2003).

Las modificaciones genéticas se llevan a cabo por la inserción de varias piezas pequeñas de ADN de diferentes fuentes en el genoma de algún organismo. Una construcción del gen puede contener como mínimo tres elementos básicos: un Promotor, el cual funciona como un interruptor para activar el gene insertado/modificado, el Gene insertado/modificado, que codifica para una característica seleccionada específica y un Terminador, el cual funciona como una señal de paro para la transcripción del gene insertado/modificado (Lübeck, 2001).

IV.2 La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como técnica para detección de OGM.

Los OGM se pueden detectar por medio de diferentes técnicas aunque, actualmente la técnica más utilizada es la PCR ya que se puede adaptar a

diferentes análisis y muestras, en amplificaciones de genes y clonaciones, en detección a diferentes niveles de expresión (PCR en tiempo real o qPCR), y en secuenciación de genes (Método Sanger).

La PCR (Figura 2) consiste en obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en particular a partir de una serie de ciclos, de 20 a 50, y cada ciclo comprende tres etapas de temperaturas y tiempos diferentes, las cuales dependen de la enzima usada para la síntesis de ADN, la concentración de iones divalentes, cantidad y proporción de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y la temperatura de unión de los *primers* (secuencias cortas de ADN reconocidos por la enzima para iniciar la síntesis).

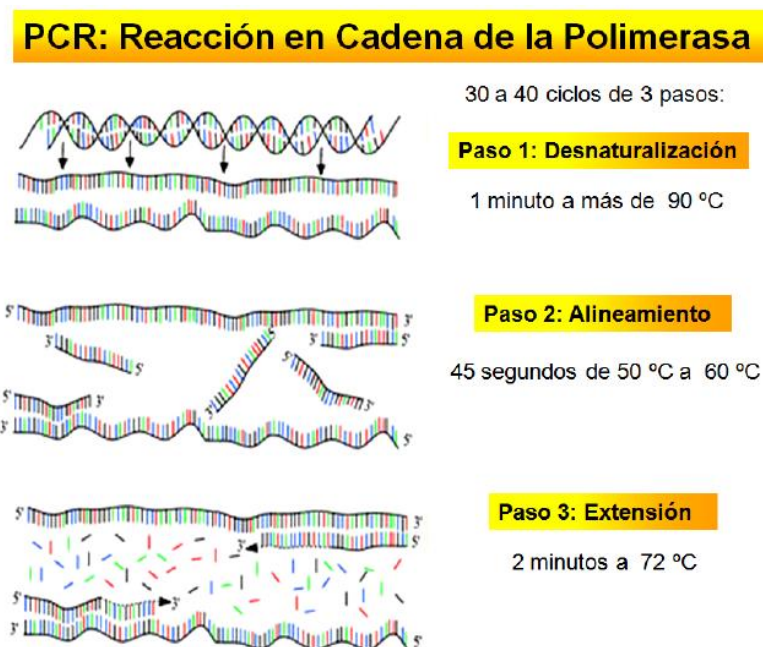


Figura 2. Etapas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

(Vierstraete, 1999).

La detección de OGM se puede realizar por medio de secuencias no específicas o específicas; en las primeras se detectan los elementos biotecnológicos como promotores, terminadores y genes insertados (por ejemplo gen de resistencia a

antibióticos), mientras que en las segundas se busca amplificar secuencias específicas de los OGM (nivel de especificidad) (Maldonado *et al.*, 2007).

El método, utilizado en la Unión Europea y muchos países más, para analizar si una muestra es OGM se divide en diferentes módulos, dónde cada módulo se caracteriza por su especificidad; en el caso del módulo de PCR, los niveles de especificidad que maneja son Taxón o Especie específica, Elemento específico, Construcción específica y Evento específico (Figura 3).

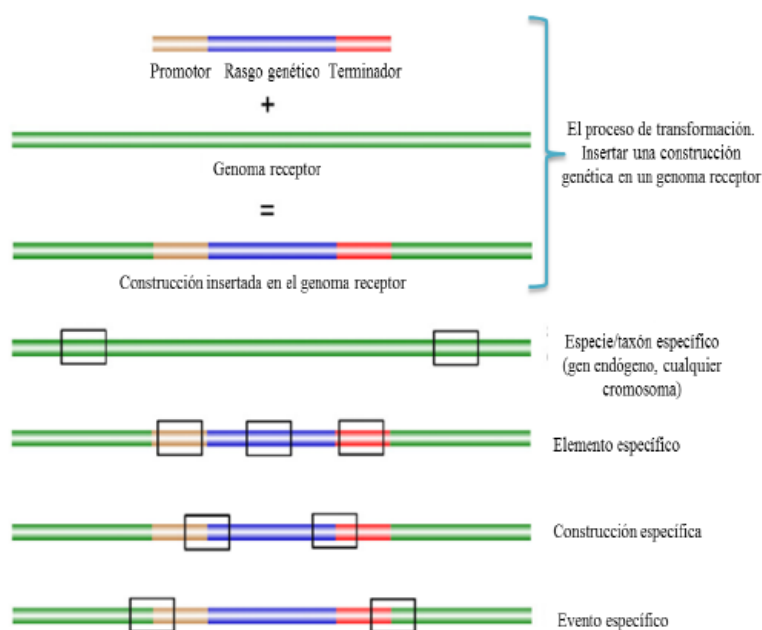


Figura 3. Proceso de transformación y cuatro niveles de especificidad de análisis dirigidos a secuencias de ADN (Holst *et al.*, 2012).

El nivel Taxón o Especie específica detecta una secuencia conocida por ser específica para las especies o taxones y ausente para otras especies, este nivel es adecuado para identificaciones y cuantificaciones de especies o taxones de interés y los datos obtenidos se ocupan como la base para el cálculo relativo de contenido OGM. El Elemento específico tiene como objetivo la secuencia de ADN insertada, esta puede ser promotor, terminador, intrón o la parte codificante del gen, este es adecuado para determinar si es OGM o no, limita la cantidad de muestra y

proporciona una pista para identificar el OGM presente. La Construcción específica se refiere a los análisis para detectar secuencias insertadas compuestas por al menos dos elementos que naturalmente no existen en el organismo. Por ejemplo, las uniones entre los diferentes componentes de la construcción, algunos análisis de este tipo detectarán también el gen insertado característico; estos análisis son adecuados para la identificación de un OGM desde la construcción y que pueden estar presentes en más de un OGM. El Evento específico analiza la unión de las secuencias entre el constructo insertado y el ADN genómico, estos resultados son adecuados para la cuantificación y para la identificación de los eventos específicos GM (Griffiths *et al.*, 2003; Holst, 2012).

Las principales técnicas de análisis realizados por el CNRDOGM están basadas en ADN o proteínas; una de estas técnicas es la qPCR para los análisis de detección, identificación y cuantificación de secuencias de ADN asociadas con OGM.

Durante cualquier análisis de PCR, los *primers* requeridos pueden formar dímeros lo que resulta en productos de PCR no específicos. Esto se ha reducido con la optimización de la técnica al evitar análisis con bajo número de copias y por medio del uso de sondas específicas con un marcador de fluorescencia (Hübner *et al.*, 1999 y Bustin, 2009). Para diseñar los *primers* y las sondas específicas marcadas es necesario conocer alguna parte de la secuencia de la muestra a analizar, y en algunos casos esta información no está disponible o no es adecuada para el análisis deseado.

Otras limitaciones que influyen en los resultados de esta técnica son el tipo de termociclador, las condiciones de la reacción, la contaminación en la muestra que podría generar señales falsas y el contenido G+C ya que si es alto afecta la separación de las cadenas de ADN en la desnaturalización (Viljoen *et al.*, 2005).

IV.3 Los materiales de referencia (MR) y su uso en la PCR.

El protocolo de la técnica qPCR usada por el CNRDOGM ya ha sido validada y se han reducido las posibles limitaciones. Esta técnica requiere del uso de materiales de referencia (MR) como controles positivos y/o negativos y como calibrantes para análisis de cuantificación. Un material de referencia es una sustancia o material cuyas propiedades son suficientemente estables para ser usados en la evaluación de métodos de medición o para caracterizar otros materiales que servirán como patrones, ayudarán a validar métodos analíticos y comprobar exactitud y desempeño de los resultados de un laboratorio. Los MRC o materiales de referencia certificados son aquellos que han sido evaluados con un procedimiento técnicamente validado y se acompañan por un certificado emitido por un organismo técnicamente competente (VIM, 2010).

En el CNRDOGM, los MRC pueden ser utilizados debido a que son certificados por el Centro Nacional de Metrología (CENAM), de estos ya se conoce que contienen los eventos GM (construcciones) para los diferentes análisis. Para el caso de los MR no certificados se realizan validaciones o procedimientos para confirmar y proveer de evidencia objetiva cumpliendo así los requisitos para un uso específico propuesto (NMX-EC-17025-IMNC, 2000).

IV.4 La pirosecuenciación como método de secuenciación de nueva generación (NGS).

Existen dos razones fundamentales para determinar secuencias de ADN, para caracterizar genes o regiones del ADN genómico que no han sido estudiadas y para confirmar el arreglo de los segmentos clonados en un vector, observar las alteraciones introducidas o identificar un gen producido comparándolo contra la información de la secuencia en una base de datos (Brown, 2007).

Un componente fundamental de mayor aplicación en la genética molecular es la secuenciación de ADN. En los últimos cinco años se presentó una gran explosión

de plataformas tecnológicas de secuenciación que permiten secuenciar genomas completos en una sola corrida utilizando diferentes métodos, algunos de éstos son la pirosecuenciación, Sanger moderno, apareamiento y ligación, síntesis con fluoróforos (Tiessen, 2009) y por "chip" semiconductor (Life Technologies Corporation, 2012). Independientemente del método usado, la secuenciación se basa en el fundamento biológico de la replicación del ADN y actualmente es realizada por una gran cantidad de instrumentos; sin embargo, los métodos bioquímicos en los que se basan fueron desarrollados desde 1970 por dos grupos de personas por Fred Sanger y por el grupo encabezado por Allan Maxam y Walter Gilbert. Ambos métodos se basaron en la producción de moléculas de una sola cadena de ADN que tuvieron la misma terminación en el extremo 5', y diferente longitud debido a un nucleótido modificado (dideoxynucleotido o ddNTP) que al azar fue incorporado *in vitro* en el extremo 3' (Brown, 2007; Tiessen, 2009 y Herrera, 2012).

La pirosecuenciación es el método basado en la detección de señales de luz generadas por una cascada enzimática (Figura 4), la cual es desencadenada por la liberación de pirofosfato después de la incorporación de cada nucleótido durante la síntesis de ADN y estas señales se transforman en la secuencia nucleotídica. El pirofosfato inorgánico (PPi) liberado no permite distinguir los nucleótidos y por ello cada dNTP se debe agregar por separado. El equipo usa un sistema de microfluidos para agregar secuencialmente los nucleótidos mediante un ciclo repetitivo: deoxiadenosina trifosfato o dATP, lavado, deoxiguanidina trifosfato o dGTP, lavado, deoxicitosina trifosfato o dCTP, lavado, deoxitimina trifosfato o dTTP, lavado, para completar un ciclo. Esta técnica se desarrolló inicialmente por Mostaza Rognaghi y Pål NRyrén a finales de 1990 (Ronaghi, 2011).

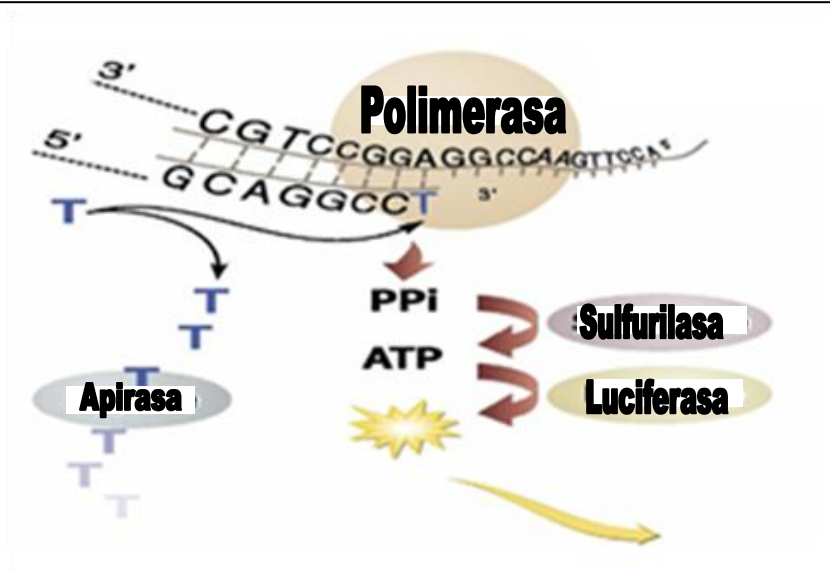


Figura 4. Cascada enzimática en la Pirosecuenciación. Al incorporar un nucleótido (en la figura timina, en azul **T**), se libera una molécula de pirofosfato inorgánico (PPI) la cual es transformada por la sulfurilasa en ATP y este ATP es transformado por la luciferasa en luz o fotones que son detectados por un sistema óptico (Tiessen, 2009).

La cascada enzimática se desencadena cuando la enzima sulfurilasa usa el PPI (proveniente de la incorporación de nucleótidos durante la síntesis de ADN), junto con la adenosina 5'-fosfosulfato (APS), para formar adenosina trifosfato (ATP), este ATP es usado por la luciferasa para producir fotones (o luz) que son detectados con una cámara CCD (Charge Coupled Device, según Hernández, 2004), la cual se trata de una cámara compuesta por sensores de imagen que utilizan elementos semiconductores fotosensibles en forma de arreglos matriciales que tienen receptores activos distribuidos en píxeles individuales (Tiessen, 2009).

La pirosecuenciación ha sido perfeccionada para la secuenciación de genomas completos o secuenciación masiva por la compañía ROCHE®, en su plataforma *454 GS FLX*, esta presenta las ventajas de ser automatizada, amable con los protocolos experimentales, obtener secuencias de fragmentos largos con tamaño entre 300 y 900 bases y una gran cantidad de lecturas por corrida (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de las tecnologías de secuenciación masiva paralela o métodos de nueva generación (NGS).

MÉTODO DE SECUENCIACIÓN	AMPLIFICACIÓN	LONGITUD DE LECTURA (bp)	LECTURAS POR CORRIDA	PRODUCCIÓN (datos/tiempo)	REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN	REFERENCIA
ABI 3730XI	PCR	~900 a 1,100	96	1 Mb/día	Método de Sanger	www.appliedbiosystems.com
454 GS FLX ROCHE	PCR en emulsión	~400	1,000,000	400 Mb/corrída/7.5 a 8 horas	Pirosecuenciación	www.rockefeller.edu/science.com
Illumina (SOLEXA) Genome Analyzer	PCR por puente	36 a 175	40,000,000	>17 Gb/corrída/3 a 6 días	Terminador reverso	www.illumina.com
ABI SOLID	PCR en emulsión	~50	85,000,000	10 a 15 Gb/corrída/6 días	Secuenciación de ligación	www.appliedbiosystems.com
Helicos Heliscope	Ninguna	30 a 35	800,000,000	21 a 28 Gb/corrída/8 días	Secuencia de una sola molécula por síntesis	www.helicosbio.com
Ion Torrent (Ion PGM) "Chip" 314 "Chip" 316 "Chip" 318	PCR en emulsión	35 200 400	1,200,000 6,200,000 11,100,000	>10 Mb/0.5 a 0.9 horas >100 Mb/2.3 a 4.4 horas >1000 Mb/3.7 a 7.3 horas	"Chip" semiconductor	www.iontorrent.com

Esta tabla fue obtenida de Reis-Filho, 2009 y adaptada.

La plataforma *454 GS FLX* de ROCHE® obtiene las secuencias nucleotídicas en tres etapas experimentales básicas: preparación de bibliotecas *shotgun* de ADN (sstADN), preparación de emulsión para amplificar la biblioteca por PCR y por último la secuenciación (Figura 5).

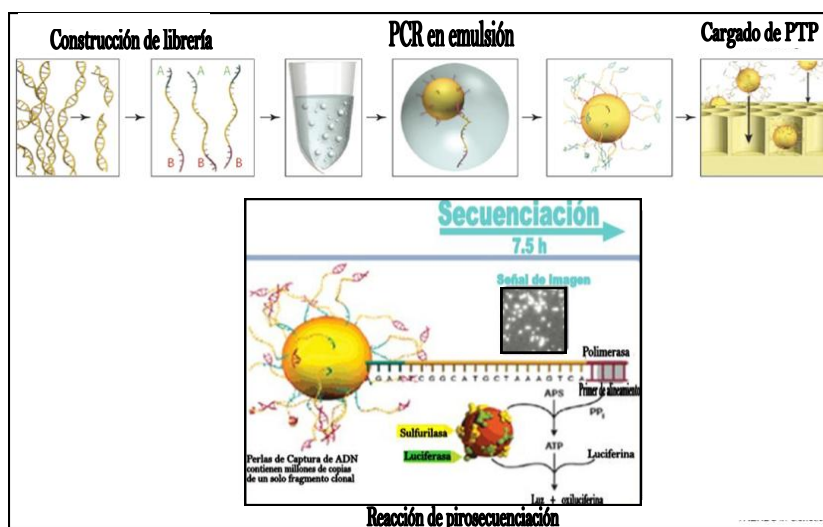


Figura 5. Flujo de trabajo de la plataforma 454 GS FLX para pirosecuenciación. La construcción de bibliotecas liga adaptadores específicos-454 a los fragmentos de ADN y se acoplan a perlas para su amplificación en una PCR en emulsión antes de secuenciar. Las perlas son cargadas en una micropocla (PTP). En la imagen de abajo se ilustra la reacción de pirosecuenciación que ocurre al incorporar un nucleótido para reportar la secuenciación por síntesis (Mardis, 2008 y Roche, 2008).

IV.5 Sistema de captura de ADN por sondas de ARN acopladas a perlas electromagnéticas.

Mientras que las plataformas de secuenciación masiva han revolucionado la forma de secuenciar los genomas, existen muchos estudios que no requieren ni se enfocan a todo un genoma; para poder aplicar estas plataformas se debe aislar y enriquecer la región o elemento genómico a estudiar lo cual se puede convertir en una barrera para estudios más específicos.

Para solucionar este problema se han desarrollado los Sistemas de Enriquecimiento Específico o Sistemas de Captura (*SeqCap*), que son alternativas simples con una buena relación de costo-efectividad; ellas complementan las tecnologías de secuenciación masiva permitiendo la investigación de secuencias específicas y su análisis de variación en regiones específicas en corto tiempo. Estos sistemas se componen principalmente de sondas de ARN o ADN complementarias a la región de interés que son diseñadas por medio de un programa de arreglos virtuales para relacionar lógicamente secuencias (*eArray*), las cuales se mandan sintetizar especificando la plataforma de secuenciación que se empleará para su aplicación (Agilent Technologies Genomics, 2012).

Estos sistemas usan una técnica eficiente de hibridación de ácidos nucleicos en solución, es decir, la asociación parcial de dos hebras procedentes de distinta especie o distinto ácido nucleico. Para ésta hibridación se requieren dos elementos la secuencia diana o de la muestra y un fragmento corto de ácido nucleico marcado o sonda, los cuales se ponen en contacto y si son complementarias forman híbridos que son aislados o identificados para posteriores análisis. En el caso del sistema utilizado en este estudio la muestra de ADN es la secuencia diana y las sondas de ARN (u oligonucleótidos de ARN) biotiniladas son los fragmentos cortos de ácido nucleico, así los híbridos formados son de ARN-ADN, que se capturan y separan por medio perlas electromagnéticas recubiertas con estreptavidina (Luque y Hernández, 2006).

El ADN de interés capturado permanece separado del resto de ADN y se aísla de las sondas de ARN a través de la digestión del ARN; finalmente, la muestra capturada se amplifica para seguir con el proceso de secuenciación (Figura 6), (Gnirke *et al.*, 2009).

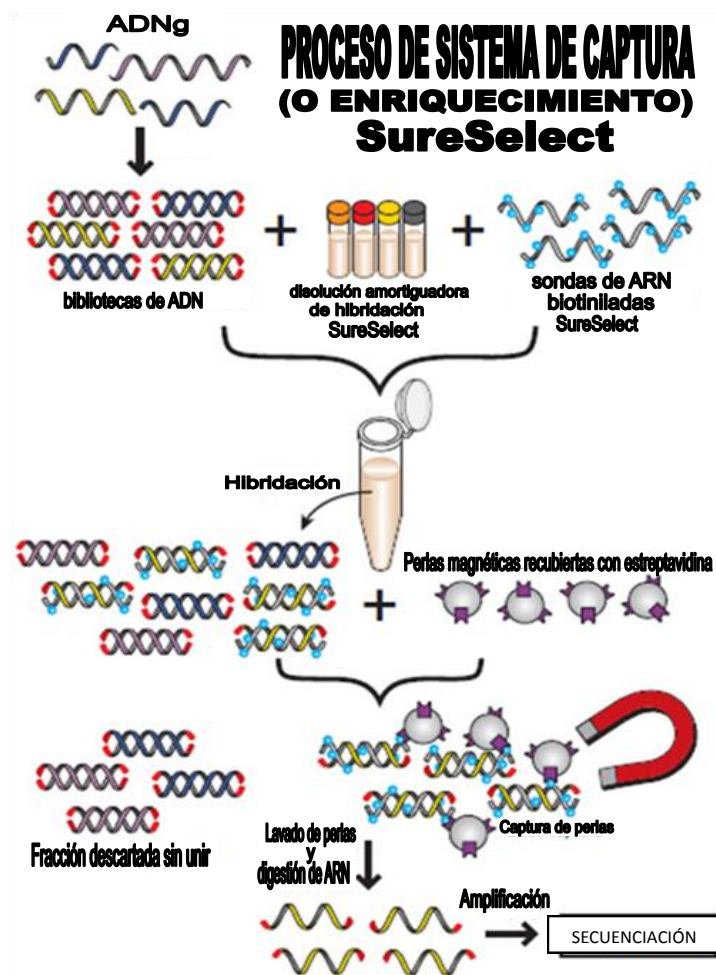


Figura 6. Diagrama del sistema de captura de ADN usando sondas de ARN.

El sistema de captura consiste en que la muestra de ADN genómico (izquierda) se pone a incubar con sondas de ARN (derecha "baits"), esta incubación se le llama hibridación, en ella se forman híbridos de ARN-ADN los cuales son capturados con perlas electromagnéticas que contienen estreptavidina y después de la digestión de las sondas de ARN sigue el proceso para secuenciar (Ernani & LeProust, 2009).

Los *SeqCap* utilizan sondas de ARN o ADN prediseñadas o que se diseñarán para llevar a cabo la hibridación, estos diseños son desarrollados por compañías como AgilentTechnologies[®], LifeTechnologies[®] y ROCHE[®] en colaboración con

investigadores y se aplican para la secuenciación y re-secuenciación de un número mayor de muestras por análisis en busca de polimorfismos de nucleótido único (SNP) o mutaciones por ejemplo, en el diagnóstico e investigaciones sobre cáncer, en el estudio de exones de humano y de ratón, así como en la investigación de polimorfismos de plantas (Genotypic Technology PVT LTD, 2009).

Los diseños disponibles hasta la fecha y sus validaciones son para ratón, el exoma de la soya y determinadas regiones genómicas humanas, incluyendo un panel integral del cáncer y el panel de la enfermedad neurológica (Roche NimbleGen Inc., 2013).

Los diseños de sondas de ARN usados para los sistemas de captura presentan un reto a futuro ya que, los sistemas disponibles sólo contemplan a una especie, y existen diferentes estudios enfocados a más de una. En el caso de los OGM se sabe que tienen secuencias insertadas provenientes de diferentes especies por lo que se detectó la necesidad de desarrollar un nuevo diseño de un sistema de captura de ADN para caracterizar los eventos GM. Al no existir un diseño comercial disponible para más de una especie y mucho menos para OGM, en el CNRDOGM se logró diseñar el primer sistema de captura de ADN para OGM (*SeqGMOCap*), el cual fue elaborado por la Unidad de Secuenciación y Bioinformática; sin embargo, este diseño no ha sido evaluado experimentalmente, ni se ha implementado a ningún método de secuenciación (Romero, 2012).

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo general.

Implementar y optimizar el proceso experimental del sistema de captura de ADN de OGM, denominado como *SeqGMOCap*.

V. 2 Objetivos particulares.

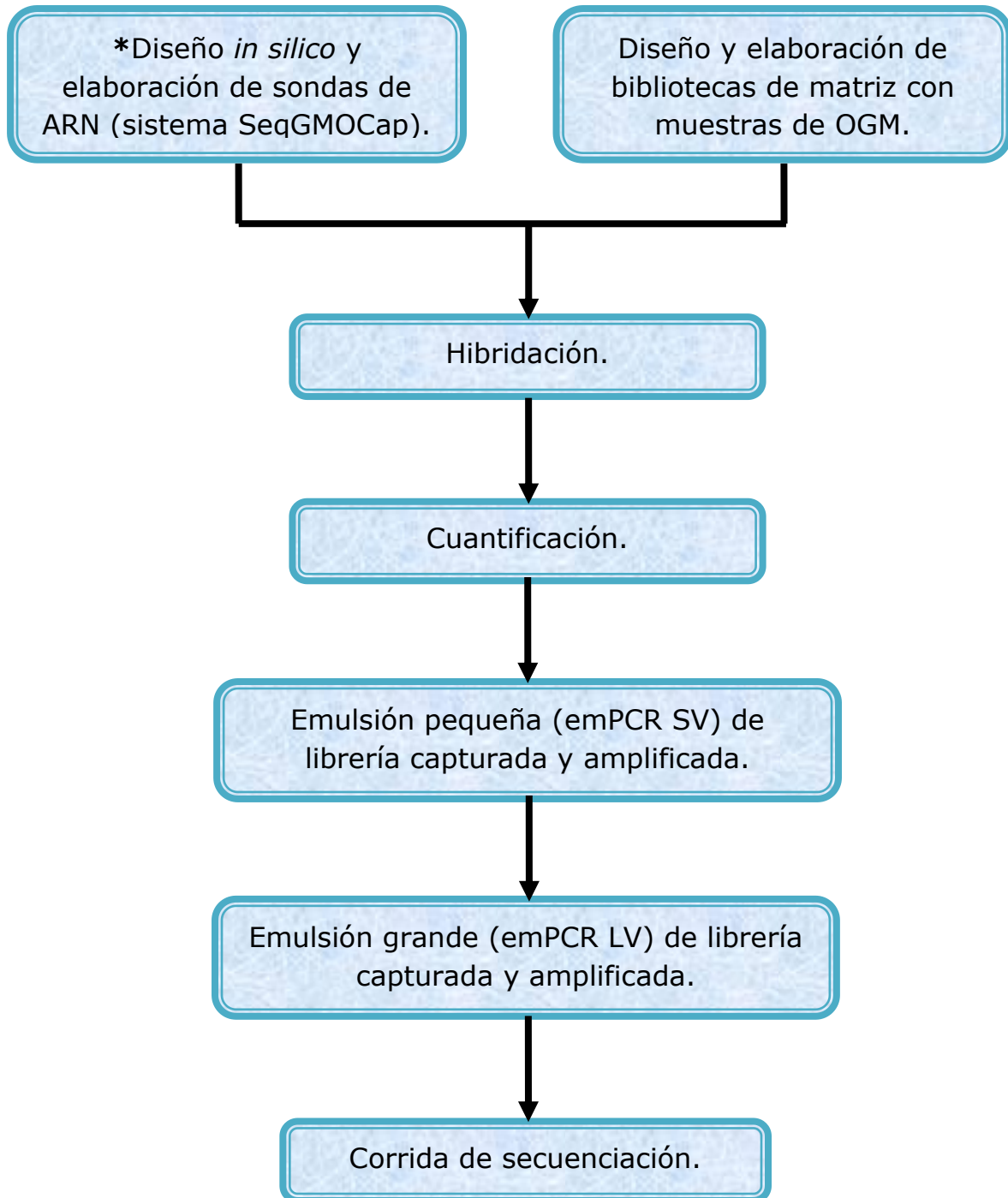
Elaborar una matriz que presente eventos GM conocidos de diferentes especies (algodón, maíz, soya, trigo y papa).

Obtener los ciclos de amplificación óptimos para la amplificación de las bibliotecas antes y después de realizar la hibridación.

Evaluar diferentes concentraciones por perla (cpb) de las bibliotecas capturadas para determinar el cpb estándar por medio de su titulación en una PCR en emulsión grande (emPCR LV).

Evaluar cualitativamente las secuencias obtenidas en la corrida de secuenciación por medio de los parámetros de cantidad de lecturas, distribución de tamaño, contenido G-C, contribución de nucleótidos, bases ambiguas, nivel de duplicación y calidad de lecturas.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



(*) Trabajo realizado en paralelo al presente estudio dentro del grupo de trabajo de la Unidad de Secuenciación y bioinformática del CNRDOGM.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Evaluación analítica de las sondas de ARN sintetizadas.

El diseño y validación del sistema de captura se realizó en paralelo y como parte del estudio global para la ejecución del presente proyecto en el CNRDOGM. Este fue realizado por el equipo de secuenciación y bioinformático del Centro, el cual diseñó sondas de ARN complementarias a diferentes eventos GM, promotores, terminadores y genes representativos de diferentes especies. Se buscó las secuencias de diferentes eventos GM, promotores, terminadores y genes representativos en diferentes bases de datos públicas y se redujo la complementariedad entre secuencias mediante el uso del software eArray de la compañía Agilent®. El tamaño total de las secuencias en el diseño de estas sondas de ARN es menor a 0.3 Mb con un tamaño promedio de 200 nucleótidos. Este diseño final se sintetizó por la compañía Agilent® para el sistema SureSelect Target-Enrichment®. La descripción completa de la elaboración del diseño de las sondas de ARN se encuentra en el trabajo *"Application of integrated bioinformatic and Next-Gen DNA sequencing methodologies for the analysis and characterization of genetically modified organisms"* de Romero, 2012.

VII.1.1 Calidad de sondas de ARN mediante electroforesis en "chip" de Alta Sensibilidad.

La calidad de las sondas de ARN se analizó para verificar el diseño realizado a través de una electroforesis en "chip" de Alta Sensibilidad con rango de medición de 50-7000 bp y 5-500 pg/ μ L, usando el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer*® de la compañía *Agilent Technologies*®, y siguiendo el método *Agilent High Sensitivity DNA Kit Quick Start Guide*®. El equipo *Bioanalyzer 2100*® determinó el tamaño promedio de los fragmentos y la concentración de éstos.

VII.2 Diseño y elaboración de bibliotecas de las matrices 1, 2, 3 y 4.

Para evaluar el sistema de captura SeqGMOCap, se realizaron 4 matrices que contienen 30 eventos GM en total, usando 25 materiales de referencia o MR. Algunos de los MR usados son apilados (tienen más de un evento) y la mayoría son MR no apilados de cinco especies diferentes: maíz, trigo, algodón, soya y papa (ANEXO III, Tabla A.4, Tabla A.5 y Tabla A.6).

Las matrices 1 y 2 (M1 y M2) se realizaron al mezclar ADN extraído de cada MR (17 ng de ADN por evento GM para M1 y 34 ng de ADN por evento para M2). Las matrices 3 y 4 (M3 y M4) se realizaron al mezclar 2 g de cada MR en forma de harina y a esta mezcla se le extrajo ADN.

VII.2.1 Extracción de ADN.

Para la elaboración de las matrices, se necesitó el ADN de las diferentes especies GM, para ello se realizó la extracción de ADN empleando el método *FAST ID Genomic DNA extraction*[®], utilizando *Sistema de Genetic-ID*[®], el cual se basa en la ruptura de la membrana celular por medio de detergentes iónicos y su posterior purificación con una membrana de sílica.

El ADN extraído se encontró en una disolución amortiguadora TE 1x se cuantificó usando un espectrofotómetro *NanoDrop 2000*[®] o *NanoDrop 8000*[®] ambos de la compañía *Invitrogen*[®], que midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm, obteniendo la concentración de ADN de cada muestra en ng/ μ L.

VII.2.1.1 Elaboración de Matriz 1 y Matriz 2.

Para tener una cantidad similar de ADN por evento GM usado durante este experimento, se generaron las matrices M1 y M2.

MATRIZ 1: Una vez que se extrajo el ADN de cada MR, la matriz 1 (M1) se elaboró mezclando 17 ng de ADN por evento de cada MR. Primero se realizaron diluciones 1:25 de cada ADN extraído y se realizaron los cálculos (ANEXO III, Ecuación 1 y 2)

para determinar la concentración de las diluciones generadas y el volumen de ADN correspondiente a 17 ng por evento de cada MR. Se tomó el volumen calculado, se concentró a 65 °C por 20 min, se llevó a un volumen final de 100 µL usando disolución amortiguadora TE del sistema *Library Prep Kit Rapid Library Buffers* de la compañía *ROCHE*[®] y se etiquetó como MATRIZ 1.

MATRIZ 2: Esta matriz se generó para asegurar la presencia de los eventos GM aumentando la cantidad de ADN de cada MR. Una vez que se extrajo el ADN de cada MR, la matriz 2 (M2) se elaboró mezclando 34 ng de ADN por evento de cada MR. Se realizaron diluciones 1:25 de cada ADN extraído y se realizaron los cálculos (ANEXO III, Ecuación 1 y 3) para determinar la concentración de las diluciones generadas y el volumen de ADN correspondiente a 34 ng por evento de cada MR. Se tomó el volumen calculado, se concentró a 65 °C por 30 min, se llevó a un volumen final de 100 µL usando disolución amortiguadora TE y se etiquetó como MATRIZ 2.

VII.2.1.2 Elaboración de Matriz 3 y Matriz 4.

Para observar el comportamiento del ADN extraído de una matriz compleja se generaron las matrices M3 y M4.

Se elaboró una mezcla de harinas pesando 2 g de cada MR y se colocaron en un recipiente debidamente etiquetado como MEZCLA DE HARINAS. El contenido de este recipiente se homogeneizó por agitación manual y se almacenó a -20 °C.

MATRIZ 3: Se pesó 2 g de la mezcla de harina y se procedió a la extracción de ADN de esta matriz como lo indica el apartado VII.2.1. Una vez extraído el ADN, se tomó el volumen correspondiente a 500 ng de ADN, se llevó a un volumen final de 100 µL usando disolución amortiguadora TE y se etiquetó como MATRIZ 3.

MATRIZ 4: Esta matriz se elaboró como duplicado de la matriz M3.

VII.2.2 Preparación de bibliotecas.

La preparación de bibliotecas se realizó con el fin de generar fragmentos de ADN con adaptadores necesarios para la corrida de secuenciación, por medio del método *GS FLX Titanium General Library Preparation Method Manual*[®], utilizando el sistema *GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit*[®] de la compañía *ROCHE*[®], el cual se basa en la nebulización (con N₂ gas a una presión de 30 psi) para generar fragmentos de ADN entre 300 y 1,000 bp, los cuales fueron purificados mediante una membrana de sílica y después reparados en sus extremos para ser ligados a adaptadores. Se seleccionaron los fragmentos por su tamaño mediante el uso de perlas magnéticas *Agencourt AMPure XP* de la compañía *Beckman Coulter*[®], lavados de Solución de Tamaño y disolución amortiguadora TE y con un lavado final de etanol 70 % (v/v). Finalmente las bibliotecas se eluyeron con 53 µL de agua libre de nucleasas y se etiquetaron.

VII.2.3 Calidad de bibliotecas mediante electroforesis en "chip" de Alta Sensibilidad.

Se determinó la calidad del NEBULIZADO, NEBULIZADO PURIFICADO y BIBLIOTECAS de cada matriz generada para corroborar que las bibliotecas son adecuadas para la corrida de secuenciación, analizando el tamaño de los fragmentos en pares de bases (bp) y su concentración en unidades de fluorescencia (FU) o en pg/µL, por medio de una electroforesis en "chip" de Alta Sensibilidad o *High Sensitivity*, con rango de medición de 50-7000 bp y 5-500 pg/µL, usando el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer*[®] de la compañía *Agilent Technologies*[®], y siguiendo el método *Agilent High Sensitivity DNA Kit Quick Start Guide*[®].

VII.3 Hibridación.

El método de hibridación se subdividió en varias etapas:

- Amplificación de las bibliotecas,

- Calidad de las bibliotecas amplificadas,
- Hibridación,
- Amplificación de bibliotecas capturadas y,
- Calidad de bibliotecas capturadas y amplificadas.

VII.3.1 Amplificación de bibliotecas.

Para alcanzar la concentración de las bibliotecas indicadas en este protocolo, se amplificaron las bibliotecas de las Matrices M1, M2, M3 y M4 siguiendo el método *SureSelect Target Enrichment System for Roche 454 GS FLX and GS Junior Sequencing Platforms Protocol* utilizando el sistema *SureSelect Target Enrichment Kit RCH Hyb Module Box #2* y el sistema *Herculase II Fusion DNA Polymerase* de la compañía *Agilent Technologies*[®].

En este paso se evaluaron los siguientes ciclos de amplificación: primero 12 ciclos para todas las matrices y después 17, 22, 24 y 26 ciclos para M4, M3, M2 y M1 respectivamente. Las condiciones para esta amplificación fueron: un ciclo a 98 °C por 2 min; seguido del número de ciclos a evaluar de 98 °C durante 20 s, 60 °C durante 45 s y 72 °C durante 1.5 min; seguido de un ciclo a 72 °C por 5 min y un ciclo final de 4 °C. Después las bibliotecas amplificadas fueron purificadas y seleccionadas por su tamaño por medio de perlas magnéticas *Agencourt AMPure XP* de la compañía *Beckman Coulter*[®], con lavados de Solución de Tamaño y disolución amortiguadora TE, y con un lavado final de etanol 70 % (v/v). Finalmente se eluyeron con 28 µL de agua libre de nucleasas y se etiquetaron.

VII.3.2 Calidad de bibliotecas amplificadas mediante electroforesis en "chip" 7500.

Se determinó la calidad de las bibliotecas amplificadas de cada matriz para verificar que el proceso de amplificación fue el adecuado analizando el tamaño de los fragmentos en pares de bases (bp) y su concentración en unidades de fluorescencia (FU) o en ng/µL, por medio de una electroforesis en "chip" de 7500,

con un rango de medición de 100-7500 bp y 0.5-50 ng/ μ L, usando el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer*[®] de la compañía *Agilent Technologies*[®], y siguiendo el método *Agilent DNA 7500 and DNA 12000 Kit Quick Start Guide*[®]. El equipo *Bioanalyzer 2100*[®] determinó el tamaño promedio de los fragmentos y la concentración de éstos. Con estos datos se seleccionó la biblioteca amplificada adecuada para seguir con la hibridación.

VII.3.3 Hibridación.

Para la captura de los eventos GM en cuestión, se procedió a la hibridación de las bibliotecas amplificadas siguiendo el método *SureSelect Target Enrichment System for Roche 454 GS FLX and GS Junior Sequencing Platforms Protocol* utilizando el sistema *SureSelect Reagent Kit Contents* de la compañía *Agilent Technologies*[®].

La hibridación se realizó con 500 ng de bibliotecas amplificadas, 24 h de incubación a 65 °C y utilizando tubos de 0.2 mL sellados con *Parafilm*[®]. Para capturar los híbridos formados (ARN-ADN), se evaluó la funcionalidad de 2 tipos de perlas electromagnéticas, en la Hibridación I (Hyb I) se utilizaron las perlas *Dynabeads MyOne Streptavidin C1* y en las Hibridaciones II y III (Hyb II y Hyb III, respectivamente) las perlas *Dynabeads MyOne Streptavidin T1* ambas de la compañía *Invitrogen*[®]. De cada lavado se tomaron alícuotas para tener evidencia de que no se perdieron bibliotecas capturadas durante estos pasos (CONTROLES 1 al 5), también se tomó una alícuota después de la digestión de las sondas de ARN (CONTROL 6), una alícuota después de cada lavado para la selección por tamaño (CONTROLES 7 al 9) y una alícuota de las bibliotecas capturadas purificadas y seleccionadas (CONTROL 10).

VII.3.4 Amplificación de bibliotecas capturadas.

Después de la captura de los eventos GM o hibridación, la muestra disminuyó su concentración por lo cual se amplificaron las bibliotecas capturadas siguiendo el método *SureSelect Target Enrichment System for Roche 454 GS FLX and GS*

Junior Sequencing Platforms Protocol utilizando el sistema *SureSelect Target Enrichment Kit RCH Hyb Module Box #2* y el sistema *Herculase II Fusion DNA Polymerase* de la compañía *Agilent Technologies*[®].

En este paso se evaluaron los siguientes ciclos de amplificación: para Hyb I 12, 14 y 28 ciclos; para Hyb II 14 y 28 ciclos y para Hyb III 14 ciclos. Las condiciones para esta amplificación fueron: un ciclo a 98 °C por 2 min; seguido del número de ciclos a evaluar de 98 °C durante 20 s, 60 °C durante 45 s y 72 °C durante 1.5 min; seguido de un ciclo a 72 °C por 5 min y un ciclo final de 4 °C. Después las bibliotecas amplificadas fueron purificadas y seleccionadas por su tamaño por medio de perlas magnéticas *Agencourt AMPure XP* de la compañía *Beckman Coulter*[®], con lavados de Solución de Tamaño y disolución amortiguadora TE, y con un lavado final de etanol 70 % (v/v). Finalmente se eluyeron con 33 µL de agua libre de nucleasas y se etiquetaron.

VII.3.5 Calidad de bibliotecas capturadas y amplificadas mediante electroforesis en "chip" de Alta Sensibilidad.

Se determinó la calidad de la biblioteca capturada (CONTROL 10), la biblioteca capturada y amplificada (CONTROL 11) y los controles (CONTROL 1, al 9) para conocer si las bibliotecas generadas son adecuadas para la corrida de secuenciación y saber si se perdieron bibliotecas después de la captura de los eventos GM. Se analizaron el tamaño de los fragmentos en pares de bases (bp) y su concentración en unidades de fluorescencia (FU) o en pg/µL, por medio de una electroforesis en "chip" de Alta Sensibilidad o *High Sensitivity*, con un rango de medición de 50–7,000 bp y 5–500 pg/µL, usando el equipo *Agilent 2100 Bioanalyzer*[®] de la compañía *Agilent Technologies*[®], y siguiendo el método *Agilent High Sensitivity DNA Kit Quick Start Guide*[®].

VII.4 Cuantificación.

Se cuantificaron las bibliotecas capturadas y amplificadas para realizar diferentes soluciones de trabajo (*Working Solution*), por medio de una Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR) usando el método *KAPA Library Quantification Kits for Roche 454 GS FLX platform* con el sistema *KAPA 454 GS Titanium Library Quantification Kit* de la compañía *KAPABIOSYSTEMS*[®].

Se hicieron diluciones seriales de las bibliotecas capturadas y amplificadas 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:4000. Se preparó la mezcla de reacción o *Master mix* para la qPCR adicionando 1 mL de *primer (454 FLX Primer Premix)* a la mezcla de reacción 2X (*KAPA SYBR*[®] *FAST qPCR Master Mix 2X*). Se prepararon por separado los seis estándares de la siguiente forma: se tomó 8 μ L del estándar (*DNA Standard*) y se mezcló con 12 μ L de mezcla de reacción preparada. Los estándares y las diluciones se cargaron en una placa correspondiente al equipo *Light Cycler 480* de la compañía *ROCHE*[®], se selló la placa con cinta adhesiva óptica, se centrifugó a 3,400 rpm por 2 min y posteriormente se colocó en un termociclador en tiempo real *Light Cycler 480* de la compañía *ROCHE*[®] en las siguientes condiciones de termociclado: un ciclo a 95 °C por 5 min seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s y 60 °C durante 45 s.

Al término de la PCR se procedió a realizar el análisis de resultados para la cuantificación absoluta a través del software LC-480, el cual construyó una curva de calibración con los estándares que sirvió para la cuantificación de las muestras. Los parámetros que se consideraron para corroborar la funcionalidad de la curva fueron eficiencia, entre 90 y 110 %, error, menor 0.2, y amplificación de muestras, deben quedar dentro de la curva. Con la curva se realizaron los cálculos (ANEXO III, Tabla A.5) para determinar las concentraciones de todas las muestras, obteniendo cuatro concentraciones por muestra, de las cuales la de mayor valor se ocupó para preparar cada Solución de Trabajo o *Working Solution* o *WS*, que es la solución empleada en las emulsiones pequeña y grande (emPCR SV y emPCR LV).

VII.5 Emulsión pequeña (emPCR SV) de bibliotecas capturadas y amplificadas.

Para conocer la concentración adecuada de bibliotecas por perla (cpb) con la cual se obtuviera un enriquecimiento (perlas en las que ha sido anclado un sólo fragmento de biblioteca y amplificado clonalmente) entre 3 y 20 %, se prepararon diferentes emulsiones pequeñas (emPCR SV) evaluando varios cpb: 0.15, 0.4, 0.5, 0.6, 0.62, 1.23, 1.85, y 2.47. Para esto, se ocuparon las bibliotecas capturadas y amplificadas de Hyb I y se siguió el método *emPCR Method Manual –Lib-L SV* adaptado por el CNRDOGM con el sistema *GS FLX Titanium SV emPCR Kit (Lib-L)* y el sistema *GS FLX Titanium emPCR Filters SV 64pcs Kit* de la compañía *ROCHE*[®].

Se preparó una WS con una concentración tal que, el volumen a colocar en las perlas (para evaluar el cpb) estuviera entre 3 y 10 μL (ANEXO III, Ecuación 4). La WS preparada con las bibliotecas obtenidas de Hyb I que cumplió con este criterio tuvo una concentración de 1×10^5 copias/ μL . Con esta WS se evaluaron diferentes cpb y determinar el porcentaje de enriquecimiento o perlas enriquecidas.

Primero se preparó la emulsión agua en aceite (w/o) al colocar la fase acuosa en la fase oleosa emulsificándolas (25 Hz, 5 min en el equipo *TissueLyser II* de la compañía *Qiagen*[®]). En segundo lugar se desnaturalizaron las bibliotecas capturadas de la WS y se preparó la mezcla de reacción para la PCR añadiendo la cantidad correspondiente de biblioteca capturada y amplificada (ANEXO III, Ecuación 5) y mezclando con las perlas de captura de ADN (*DNA Capture Beads*). En tercer lugar se colocaron las perlas de captura de ADN con la mezcla de reacción de la PCR en la emulsión w/o y se homogeneizaron (12 Hz, 5 min en el equipo *TissueLyser II* de la compañía *Qiagen*[®]). Como cuarta etapa se procedió a cargar las emulsiones en placas de 96 pozos de la compañía *LifeTechnologies*[®], en cada pozo se colocaron 100 μL de la emulsión, se realizó el sellado de las placas y se colocaron en un termociclador *ABI 9700* en las siguientes condiciones de termociclado: un ciclo a 94 °C por 4 min seguido de 50 ciclos de 94 °C durante 30

s, 58 °C durante 4.5 min, 68 °C durante 30 s y un ciclo final de 10 °C. En una quinta etapa se rompió la emulsión recuperando las perlas con ADN clonal, utilizando jeringas y filtros del sistema *emPCR Kit emPCR filters SV 64 pcs* de la compañía *ROCHE*[®], así como isopropanol 99 % (v/v), disolución amortiguadora de potenciamiento (*Enhancing Buffer*), disolución de NaOH 0.125 N (*Melt*, con la cual se elimina una cadena de las bibliotecas de ADN permitiendo aislar a las bibliotecas con el adaptador A en el extremo 5' y el adaptador B en el extremo 3') y disolución amortiguadora de reasociación (*Annealing Buffer*), para los lavados. Se determinó el porcentaje de recuperación (o perlas recuperadas) al cuantificarlas con ayuda de una balanza analítica y del equipo *Contador de partículas Z2* de la compañía *Beckman Coulter*[®] (ANEXO III, Ecuación 6 y 7, teniendo en cuenta que las perlas iniciales fueron 2.4×10^6 perlas). Las perlas recuperadas se determinaron por cada cpb evaluado y se obtuvieron al relacionar la masa con el promedio de los conteos de las partículas o perlas recuperadas; estas perlas fueron un control para evaluar la técnica de recuperación, un valor mayor a 50 % es el adecuado para proseguir con la determinación de las perlas enriquecidas.

Como sexto y último paso se prepararon las perlas enriquecidas acoplado el *primer* de enriquecimiento (este permite aislar las perlas con bibliotecas, con ayuda de una barra magnética y perlas magnéticas de enriquecimiento, *Enrichment Beads*) a las bibliotecas en las perlas recuperadas; este paso incluyó lavados con disolución amortiguadora de potenciamiento para eliminar exceso del *primer* y lavados con una disolución NaOH 0.125 N (*Melt*, la cual desnaturalizó el *primer* de enriquecimiento recuperando las perlas enriquecidas) y con una disolución amortiguadora de reasociación (*Annealing Buffer*). Se determinó el porcentaje de enriquecimiento (o perlas enriquecidas) al cuantificarlas con ayuda de una balanza analítica y del equipo *Contador de partículas Z2* de la compañía *Beckman Coulter*[®] (ANEXO III, Ecuación 8 y 9, teniendo en cuenta que las perlas iniciales fueron 2.4×10^6 perlas). Las perlas enriquecidas se determinaron

relacionando la masa de estas con el promedio de las mediciones de partículas obtenidas. Las perlas enriquecidas indicaron el contenido de perlas con bibliotecas clonadas adecuadamente, se buscó un valor entre 3 y 20 % o cercano a 20 % para determinar los cpb adecuados para evaluarlos en la emulsión grande (emPCR LV).

VII.6 Emulsión grande (emPCR LV) de bibliotecas capturadas y amplificadas.

Con los cpb seleccionados, se procedió a realizar las PCR en emulsiones grandes (emPCR LV), para generar clonas o copias idénticas de las bibliotecas ancladas a perlas de captura de ADN y obtener un enriquecimiento cercano al 8 % (enriquecimiento óptimo). Se prepararon las emPCR LV de las bibliotecas capturadas y amplificadas obtenidas de la Hyb II y Hyb III usando los cpb (copias por perlas) 0.5 y 2.47 junto con el método *emPCR Method Manual –Lib-L LV* adaptado por el CNRDOGM, el sistema *GS FLX Titanium LV emPCR Kit (Lib-L)* y el sistema *GS FLX Titanium emPCR Breaking Kit LV/MV, 12 pcs* de la compañía *ROCHE*[®].

Se preparó una WS con una concentración tal que el volumen a colocar en las perlas (para evaluar el cpb) estuviera entre 3 y 10 μL (ANEXO III, Ecuación 4). La WS preparada con las bibliotecas de Hyb II y III que cumplieron con este criterio presentaron una concentración de 1×10^7 copias/ μL .

Primero se preparó la emulsión agua en aceite (w/o) al colocar la fase acuosa en la fase oleosa emulsificándolas (28 Hz, 5 min en el equipo *TissueLyser II* de la compañía *Qiagen*[®]). En segundo lugar se desnaturalizaron las bibliotecas capturadas de la WS y se preparó la mezcla de reacción para la PCR añadiendo la cantidad correspondiente de biblioteca capturada y amplificada (ANEXO III, Ecuación 10) y mezclando con las perlas de captura de ADN (*DNA Capture Beads*). En tercer lugar se colocaron las perlas de captura de ADN con la mezcla de reacción de la PCR en la emulsión w/o y se homogeneizaron (12 Hz, 5 min en el equipo *TissueLyser II* de la compañía *Qiagen*[®]). Como cuarta etapa se procedió a

cargar las emulsiones en placas de 96 pozos de la compañía *LifeTechnologies*[®], en cada pozo se colocaron 100 μ L de la emulsión, se realizó el sellado de las placas y se colocaron en un termociclador *ABI 9700* en las siguientes condiciones de termociclado: un ciclo a 94 °C por 4 min seguido de 50 ciclos de 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 4.5 min, 68 °C durante 30 s y un ciclo final de 10 °C. En una quinta etapa se rompió la emulsión recuperando las perlas con ADN clonal, utilizando el sistema *GS FLX Titanium emPCR Breaking Kit LV/MV, 12 pcs* de la compañía *ROCHE*[®], así como isopropanol 99 % (v/v), etanol 99 % (v/v), disolución amortiguadora de potenciamiento (*Enhancing Buffer*), disolución de NaOH 0.125 N (*Melt*, con la cual se elimina una cadena de las bibliotecas de ADN permitiendo aislar a las bibliotecas con el adaptador A en el extremo 5' y el adaptador B en el extremo 3') y disolución amortiguadora de reasociación (*Annealing Buffer*), para los lavados. Se determinó el porcentaje de recuperación (o perlas recuperadas) al cuantificarlas con ayuda de una balanza analítica y del equipo *Contador de partículas Z2* de la compañía *Beckman Coulter*[®] (ANEXO III, Ecuación 6 y 7, teniendo en cuenta que las perlas iniciales fueron 35×10^6 perlas). Las perlas recuperadas se determinaron por cada cpb evaluado y se obtuvieron al relacionar la masa con el promedio de los conteos de las partículas o perlas recuperadas; estas perlas fueron un control para evaluar la técnica de recuperación, un valor mayor a 50 % es el adecuado para proseguir con la determinación de las perlas enriquecidas.

Como sexto paso se prepararon las perlas enriquecidas acoplando el *primer* de enriquecimiento (que permite aislar las perlas con bibliotecas, con ayuda de una barra magnética y perlas magnéticas de enriquecimiento, *Enrichment Beads*) a las bibliotecas en las perlas recuperadas; este paso incluyó lavados con disolución amortiguadora de potenciamiento para eliminar exceso del *primer* y lavados con una disolución NaOH 0.125 N (*Melt*, la cual desnaturizó el *primer* de enriquecimiento recuperando las perlas enriquecidas) y con una disolución amortiguadora de reasociación (*Annealing Buffer*). Como séptimo y último paso se

acopló el *primer* de secuenciación (que da la secuencia clave de reconocimiento en la corrida de secuenciación) y lavados con disolución amortiguadora de reasociación (*Annealing Buffer*) para eliminar el exceso de *primer*. Se determinó el porcentaje de enriquecimiento (o perlas enriquecidas) al cuantificarlas con ayuda de una balanza analítica y del equipo *Contador de partículas Z2* de la compañía *Beckman Coulter*[®] (ANEXO III, Ecuación 8 y 9, teniendo en cuenta que las perlas iniciales fueron 35×10^6 perlas). Las perlas enriquecidas se determinaron relacionando la masa de estas con el promedio de las mediciones de partículas obtenidas. Las perlas enriquecidas indicaron el contenido de perlas con bibliotecas clonadas adecuadamente, se buscó un valor entre 3 y 20 % o cercano a 8 %, que es el ideal de acuerdo a los ensayos que se han realizado previamente en el CNRDOGM.

VII.7 Corrida de secuenciación.

Se prepararon dos corridas de secuenciación, la primera con cpb de 0.5 y 2.47 de las perlas enriquecidas con las bibliotecas capturadas en Hyb II. La segunda con cpb de 0.5 de las perlas enriquecidas con las bibliotecas capturadas en Hyb III. Se siguió el método *Sequencing Method Manual* adaptado por el CNRDOGM con el sistema *GS FLX Titanium Control Bead Kit*, el sistema *GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70* y el sistema *GS FLX Titanium PicoTiterPlate Kit 70 X 75* de la compañía *ROCHE*[®]. Se trabajó con 2 regiones para las corridas realizadas.

Se realizó el prelavado y lavado de mantenimiento del equipo *GS FLX 454* de la compañía *ROCHE*[®] retirando el contenedor de desechos y reactivos, vaciándolo, lavándolo y secándolo. Se cargó el cartucho de lavado de mantenimiento *GS FLX Maintenance Wash Kit* en el equipo *GS FLX 454* en el compartimiento de mantenimiento y se seleccionó el programa *GS Sequencer*, la opción *Service> Next> OK*. Cuando terminó el primer lavado se extrajo el contenedor y se desechó su contenido, después se colocaron los tubos *Sipper (Sipper Tubes)* y los tubos de prelavado (*GS FLX Pre-wash tubes*), éstos últimos se llenaron con disolución

amortiguadora de prelavado (*Pre-wash Buffer*), en el contenedor de lavado y se colocó en el equipo *GS FLX 454* y se seleccionaron los siguientes comandos Pestaña Instrument> START> Opción Pre-wash> Next> START. Cuando terminó el prelavado se extrajo el contenedor, se desechó su contenido y se lavó.

Por separado se prepararon las botellas de disolución amortiguadora CB (*Titanium Buffer CB*), adicionando a cada una 6.6 mL de disolución amortiguadora de suplemento CB (*Titanium Supplement CB*) y 1 mL de ditiotreitól (*DTT*), y se colocaron en el contenedor de reactivos. También se preparó la dilución de la PPIasa (*PPiase*) colocando 5 μL en un tubo de 1.6 mL etiquetado como dilución de PPIasa y se le adicionó a ese tubo 45 μL de reactivo inhibidor TW (*Inhibitor TW reagent*). El cartucho de reactivos se preparó de la siguiente forma: se adicionó una tableta de cloro al reactivo de lavado poscorrida (*Post Run Wash*), se añadió 13.2 μL de la dilución PPIasa al reactivo inhibidor TW (*Inhibitor TW*), se agregó 260 μL de Apirasa al reactivo disolución amortiguadora para apirasa (*Buffer for Apyrase*) y se adicionó 3 mL de *dATP* al reactivo disolución amortiguadora para ATP (A) (*Buffer for ATP (A)*). Este cartucho se homogeneizó y se colocó en el contenedor de reactivos. El contenedor de reactivos junto con las botellas de disolución amortiguadora CB preparadas y el cartucho de reactivos preparado se colocó en el equipo *GS FLX 454*.

Por otra parte se preparó el reactivo disolución amortiguadora de perlas 2 (*Bead Buffer 2*), *BB2*, agregando 1 mL de suplemento de titanio CB (*Titanium Supplement CB*) y 34 μL de Apirasa a la botella del reactivo disolución amortiguadora de titanio de perlas (*Titanium Bead Buffer*) previamente enfriado. Se homogeneizó este reactivo, *BB2*, se mantuvo en frío durante todo el procedimiento, también los reactivos Suplemento de titanio CB y Apirasa se mantuvieron en frío.

Se preparó la mezcla de incubación de perlas de ADN, (*DNA Bead Incubation Mix, DBIM*), juntando 1,570 μL de *BB2*, 150 μL de cofactor de la polimerasa (*Polymerase Cofactor*) y 300 μL de polimerasa (*DNA Polymerase*).

Se lavaron las perlas de empaque (*Packing Beads*) con *BB2* y cada tubo se resuspendió en 550 μL de *BB2*. Se prepararon las perlas enriquecidas con bibliotecas de ADN de la Hyb II o III tomando el volumen calculado de las perlas enriquecidas (ANEXO III, Ecuación 11) en un tubo de 2 mL. A cada tubo se le añadió 20 μL de perlas control (*Control Beads*), se centrifugaron a 10,000 rpm por 2 min, se les retiró el sobrenadante dejando sólo 50 μL , a cada tubo se le adicionó 950 μL de *DBIM* y se colocaron en un rotador *LabQuake mixer Rotator* de la compañía *Eppendorf*[®] por 15 min y después a cada tubo se le adicionó 265 μL de perlas de empaquetamiento y 435 μL de *BB2*, se agitaron y se incubaron 5 min más en un rotador; estas perlas corresponde a la segunda capa o L2.

Se lavaron las perlas con enzimas (*Enzyme beads*), colocando los tubos en una barra magnética por 1 min, se les retiró el sobrenadante y se lavaron tres veces adicionándole a cada tubo 1 mL de *BB2*, agitándolos y retirándoles el sobrenadante, posteriormente se resuspendieron en 1 mL de *BB2* y se mantuvieron en hielo.

Se prepararon las perlas PPIasa (*PPIase Beads*), colocando los tubos en una barra magnética por 1 min, se les retiró el sobrenadante y se lavaron tres veces adicionándole a cada tubo 500 μL de *BB2*, agitándolos y retirándoles el sobrenadante, posteriormente se resuspendieron en 500 μL de *BB2* y se mantuvieron en hielo.

Se prepararon los tubos L1, L3 y L4: Al tubo L1 se le adicionó 3.250 μL de *BB2* y 550 μL de perlas de enzimas lavadas. Al tubo L3 se le adicionó 2,500 μL de *BB2* y 1,300 μL de perlas de enzimas lavadas. Al tubo L4 se le adicionó 3.340 μL de *BB2* y 460 μL de perlas PPIasa.

Se preparó la pico placa de secuenciación (*PTP, Pico Titer Plate*): se sumergió la *PTP* en un recipiente con *BB2* por 10 min, se secó la parte inferior de la *PTP* y se ensambló con el empaque azul de cargado (*gasket*) en la *BDD (Bead Deposition Device)*. Se cargó la *PTP* colocando las cuatro capas de perlas de manera uniforme: primero se resuspendió el tubo L1, se tomó 1,860 μL y se depositó en la región 1 de la *PTP* ensamblada, se procedió de la misma forma para la región 2, se centrifugó a 2,640 rpm por 5 min y se retiró el sobrenadante de ambas regiones de la *PTP* ensamblada; después se resuspendieron los tubos marcados como L2, se tomó de cada uno 1,700 μL de las perlas y se depositaron en la región correspondiente, se centrifugó a 2,640 rpm por 10 min y con cuidado, se retiró el sobrenadante de ambas regiones; a continuación se resuspendió el tubo L3, se tomó 1,860 μL y se depositó en la región 1 de la *PTP* ensamblada, se procedió de la misma forma para la región 2, se centrifugó a 2,640 rpm por 5 min y con cuidado, se retiró el sobrenadante de ambas regiones; finalmente se resuspendió el tubo L4, se tomó 1860 μL y se depositó en la región 1 de la *PTP* ensamblada, se procedió de la misma forma para la región 2, se centrifugó a 2,640 rpm por 5 min y con cuidado, se retiró el sobrenadante de ambas regiones.

Se seleccionó en el programa *GS Sequencer* la pestaña Instrument> opción Unlock, se abrió el compartimento para la *PTP*, se colocó el protector de la cámara, se extrajo la *PTP* y el empaque gris de la corrida anterior, se limpió el área de montaje de la *PTP* y la cámara con Tween-20 al 10 % (v/v) e isopropanol al 99 % (v/v), respectivamente y se colocó el empaque gris lavado. Se desensambló la *PTP*, se colocó la *PTP* cargada con las cuatro capas de perlas en el compartimento deslizándola por el marco de montaje y se cerró el compartimento.

El equipo *GS FLX 454* realizó la corrida de secuenciación mediante el programa *GS Sequencer*, en el cual se seleccionó la pestaña Instrument> START> opción Sequencing Run> Next, en este punto se colocaron los códigos de barras (de la *PTP* y con ayuda del escáner de los reactivos empleados), se seleccionó la opción

XLR70 Ti> Next> opción 2 regiones> Next> opción 200 cycles> Next>opción bibliotecas Shotgun> Next> opción Back up Run and Processor data up on completion> Next> redactar observaciones o comentarios durante la elaboración del a corrida de secuenciación> Next> START. Se verificó que el equipo funcionará adecuadamente y cuando terminó la corrida de secuenciación se extrajeron los datos para su análisis mediante el *Software* del equipo 454 GS FLX y con el *Software CLC Genomics Workbench 5.5.2*[®].

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VIII.1 Evaluación analítica de las sondas de ARN sintetizadas.

Las sondas de ARN de cadena sencilla diseñadas *in silico* de acuerdo con el trabajo realizado por el CNRDOGM para generar el sistema de captura de ADN de OGM (*SeqGMOCap*), son suficientes para capturar 196 elementos transgénicos de 31 especies GM (Romero, 2012), por ello como primer paso se verificó la integridad de estas por una electroforesis en "chip".

En la Figura 7 se observan los resultados de la evaluación a través de una electroforesis en "chip" de alta sensibilidad de ADN (a falta de uno de ARN) de las sondas sintetizadas, por medio de la cual se determinó que el tamaño promedio de las sondas de ARN fue de 238 bp, siendo 228 bp el tamaño con mayor concentración (pico con más de 1000 unidades de fluorescencia (FU) ubicado alrededor de 60 s).

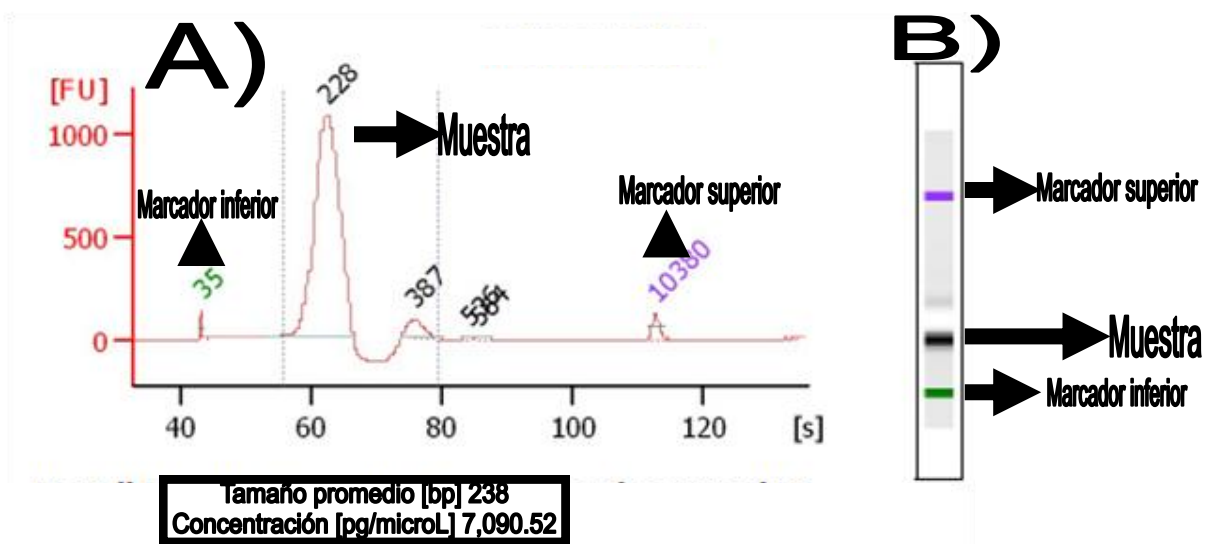


Figura 7. Evaluación del tamaño de las sondas de ARN. En la imagen A) se muestra la gráfica tiempo vs fluorescencia de la electroforesis. En la imagen B) se muestra un gel electroforético en chip. La muestra tiene un tamaño promedio de 238 bp. Los marcadores control son los picos de 35 bp y 10380 bp.

El tamaño predominante en las sondas analizadas fue de 228 bp, y se observaron otros picos de menor tamaño; sin embargo, el pico de interés indicó que las sondas de ARN son fragmentos de aproximadamente el mismo tamaño y que las sondas se encontraron íntegras, mientras que el resto de los picos se debieron a errores experimentales como interferencia con los reactivos utilizados. Al comparar el tamaño en el diseño de las sondas de ARN realizado por el CNRDOGM (120 bases), con los resultados obtenidos se observó un tamaño mayor (238 bp), lo cual indicó que la electroforesis en "chip" realizada influyó en el resultado, así como el hecho de que las sondas de ARN se encuentren biotinilizadas, ya que la migración fue lenta, lo cual llevó a un aumento en el tamaño. Sabiendo lo anterior se corroboró la integridad de las sondas de ARN y se prosiguió con el estudio.

VIII.2 Diseño y elaboración de bibliotecas de las matrices 1, 2, 3 y 4.

VIII.2.1 Elaboración de las matrices M1, M2, M3 y M4.

Las especies usadas para el presente estudio corresponden a maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), algodón (*Gossypium hirsutum*), soya (*Glycine max*) y papa (*Solanum tuberosum*). En total se estudiaron 30 eventos GM de los cuales 12 corresponden a maíz, 7 a trigo, 9 a algodón, 1 a soya y 1 a papa. (ANEXO IV Tabla A.7). Todos los eventos GM se manejaron como harinas (o materiales de referencia, MR), que el CNRDOGM tiene bajo su resguardo.

Para la selección de los MR se buscó que cada evento GM no se encontrara apilado o "stack", el cual se refiere a que contiene más de un evento GM dentro del mismo genoma; sin embargo, los eventos de maíz MON-88017-3 y MON-89034-3 sólo se encontraron de esta forma por lo que se trabajó con un mismo MR para dos eventos (MR51). El mismo caso se presentó en los eventos del algodón MON-15985-7 y MON-88913-8 (MR 134) y también en los eventos del algodón DAS-24236-5 y DAS-21023-5 (MR 279). Un caso parecido ocurrió con los eventos del algodón BCS-GH004-7, BCS-GH005-8 y BCS-GH002-5 (MR 135), donde se encontraron tres eventos apilados.

Otro parámetro que se buscó fue que los eventos GM tuvieran la misma proporción. Para ello se elaboraron cuatro matrices con eventos GM: la matriz 1 (M1) y la matriz 2 (M2) se elaboraron a partir de una mezcla de ADN obtenido independientemente de cada uno de los eventos GM. Mientras que las matrices 3 y 4 (M3 y M4), se elaboraron a partir del ADN obtenido de una mezcla de harinas de los eventos GM.

En todos los casos se corroboró la pureza del ADN al observar la relación de absorbancia a diferente longitud de onda (260 / 280 nm), donde el cociente de las absorbancias debió ser cercano a 2.0 (JRC, 2007). La presencia de inhibidores, producto de la extracción, fue descartada debido a que el método utilizado fue validado previamente en el CNRDOGM. Estos parámetros sólo se observaron y no se muestran en este trabajo.

El criterio para conocer la masa total de ADN en cada matriz fue el recomendado por el método *GS FLX Titanium General Library Preparation Method Manual*[®] de la compañía *ROCHE*[®] para generar bibliotecas, el cual indica que 500 ng de ADN genómico son necesarios para generar bibliotecas de buena calidad. En M1 la masa total de ADN fue cercana a 500 ng cumpliendo con el criterio mencionado. Para M2 se duplicó el criterio (a 1000 ng), con el fin de evaluar el comportamiento de los eventos GM al estar presentes en mayor concentración y asegurar su captura al presentarse en mayor cantidad. Ambos criterios se lograron al dividir la masa total de ADN entre el número de eventos GM presentes en cada matriz y se concentraron para tener un volumen final de 100 μ L (ANEXO IV Tabla A.8 y Tabla A.9).

El ADN para las matrices M3 y M4 (duplicado) se obtuvo a partir de una mezcla de harinas que se elaboró al pesar 2 g de harina de cada evento GM (cada evento GM representó el 4.6 % de la mezcla de harinas final). La concentración de ADN extraído para M3 y M4 fue de 52.1 y 48.1 ng/ μ L, respectivamente. Los cocientes de las absorbancias 260 /280 nm indicaron que el ADN extraído fue el adecuado.

Del ADN extraído se midió un volumen correspondiente a 500 ng (criterio mencionado en M1) y se llevó a un volumen final de 100 μ L para preparar las bibliotecas de M3 y M4 (ANEXO IV Tabla A.10).

VIII.2.2 Preparación de bibliotecas.

La preparación de las bibliotecas de M1, M2, M3 y M4 se realizó al obtener la fragmentación del ADN genómico por medio de presión y fuerza mecánica. Posterior a la fragmentación se procedió a la reparación para formar extremos romos y así lograr la ligación de los adaptadores A y B necesarios para la purificación con perlas magnéticas, para la amplificación y para el acoplamiento del *primer* de secuenciación y del *primer* de enriquecimiento en la emulsión pequeña y grande.

Para evaluar la calidad de las bibliotecas preparadas, fue necesario realizar una electroforesis en "chip" de alta sensibilidad y obtener así el tamaño promedio de los fragmentos y la concentración aproximada (ANEXO IV Figura A.3).

La calidad de las bibliotecas generadas de las matrices M1, M2, M3 y M4 se buscó fragmentos entre 300 y 900 bp con más de 50 FU o con una concentración mayor a 500 pg/ μ L. Los resultados se muestran en la Figura 8 donde se observa que la concentración y el tamaño de las bibliotecas fueron los adecuados.

Con el único objetivo de evaluar la repetibilidad en la preparación de bibliotecas, se realizó un duplicado sólo de la biblioteca de la matriz M2, a este duplicado se le aplicó el mismo procedimiento y se analizó su calidad, la cual resultó repetible ya que se obtuvo una concentración de los fragmentos y un tamaño promedio similar al obtenido (ANEXO IV Figura A.4).

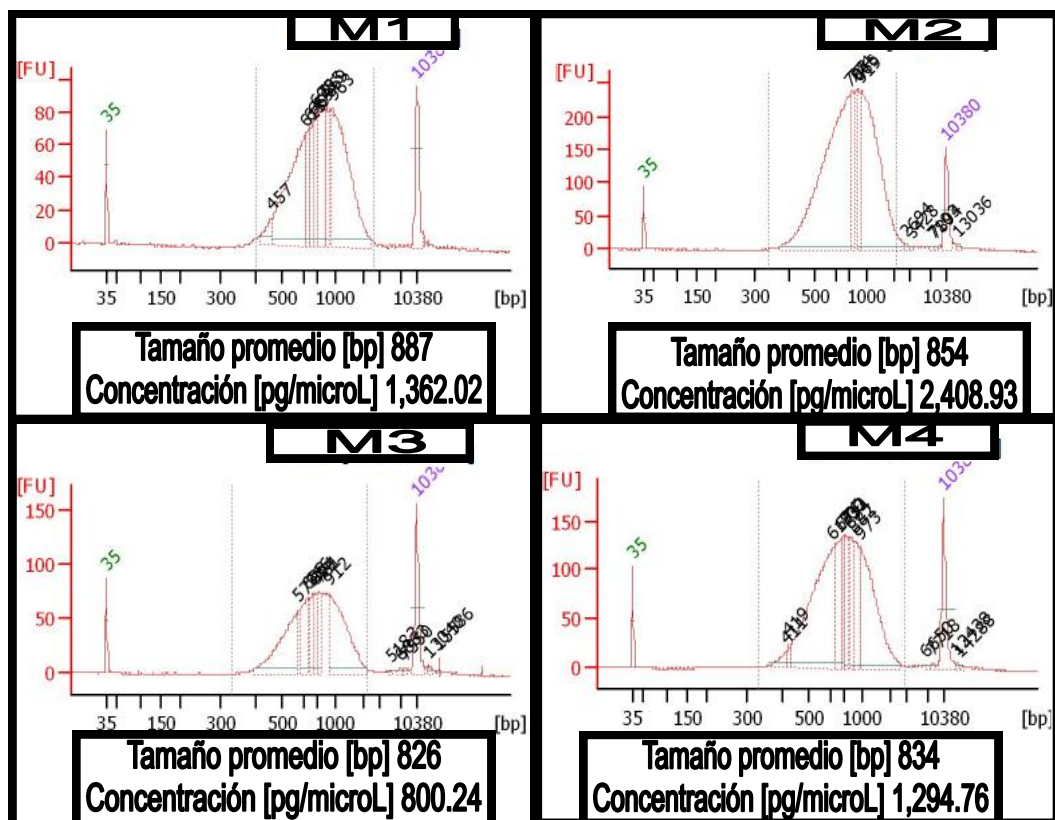


Figura 8. Evaluación de la calidad de las bibliotecas de las matrices M1, M2, M3 y M4. En la imagen M1 se muestran los resultados de la biblioteca de la matriz 1. En la imagen M2 se muestran los resultados de la biblioteca de la matriz 2. En la imagen M3 se muestran los resultados de la biblioteca de la matriz 3. En la imagen M4 se muestran los resultados de la biblioteca de la matriz 4. En todas las imágenes los picos de 35 y 10380 bp son los marcadores control.

Para analizar en conjunto la calidad del procedimiento de cada preparación de bibliotecas, se compararon los datos del tamaño y concentración de los puntos control obtenidos durante la preparación de las bibliotecas de las matrices evaluadas, como son el nebulizado, el nebulizado purificado y la biblioteca final (ANEXO IV Tabla A.11), donde se observó que la fragmentación (nebulizado) fue similar en todas las matrices obteniendo fragmentos entre 500 y 600 bp, la purificación generó una variación en tamaño en todas las matrices y la ligación no fue adecuada en la matriz M4, ya que no se observó el aumento mínimo de 60 bp en el tamaño de los fragmentos, de acuerdo con Lennon *et al.*, 2010.

Las bibliotecas generadas a partir de las matrices M1, M2, M3 y M4 presentaron un tamaño promedio alrededor de 900 bp y concentraciones mayores a 500 pg/ μ L, con lo cual cumplieron con la calidad requerida para continuar con el estudio (ANEXO I). Cabe mencionar que fragmentos de mayor o menor tamaño al especificado podrían repercutir en la secuenciación debido a que con los fragmentos cortos se podrían generar sus secuencias en exceso y con los fragmentos grandes no se generarían sus secuencias completas, mientras que las concentraciones menores a 500 pg/ μ L no producen suficientes secuencias necesarias para el paso experimental de emPCR.

VIII.3 Hibridación.

La hibridación se realizó en tres etapas: amplificación de bibliotecas, hibridación y amplificación de bibliotecas capturadas. Para la primera etapa (amplificación de bibliotecas) se ocuparon las bibliotecas de todas las matrices y a partir de la segunda etapa (hibridación) se utilizó sólo la biblioteca de M2, debido a que presentó la mejor distribución de tamaño, es decir, fragmentos con tamaño similar. En la segunda y tercera etapa (hibridación y amplificación de bibliotecas capturadas, respectivamente) se realizaron 3 ensayos Hyb I, Hyb II e Hyb III, de los cuales Hyb I e Hyb II se realizaron para optimizar las condiciones experimentales, mientras que Hyb III se realizó para corroborar los resultados obtenidos evaluando la repetibilidad del ensayo (ANEXO I).

VIII.3.1 Amplificación de bibliotecas.

Una vez que las bibliotecas de las matrices M1, M2, M3 y M4 presentaron la calidad apropiada, se procedió a su amplificación usando la enzima Herculasa II fusionada a la ADN polimerasa (*Herculase II Fusion DNA Polymerase SureSelect*[®]). Con ésta amplificación se esperaba obtener una mayor cantidad de eventos GM que serían capturados en la hibridación, una mayor probabilidad de captura de cada evento GM para poder detectarlo con los equipos utilizados y obtener de manera representativa las bibliotecas de interés.

El método *SureSelect Target Enrichment System for Roche 454 GS FLX and GS Junior Sequencing Platforms Protocol* recomienda 12 ciclos de amplificación sin embargo, al evaluarlos no se generó la amplificación de las bibliotecas que se observaría como picos definidos con fluorescencia mayor a 50 FU (Figura 9).

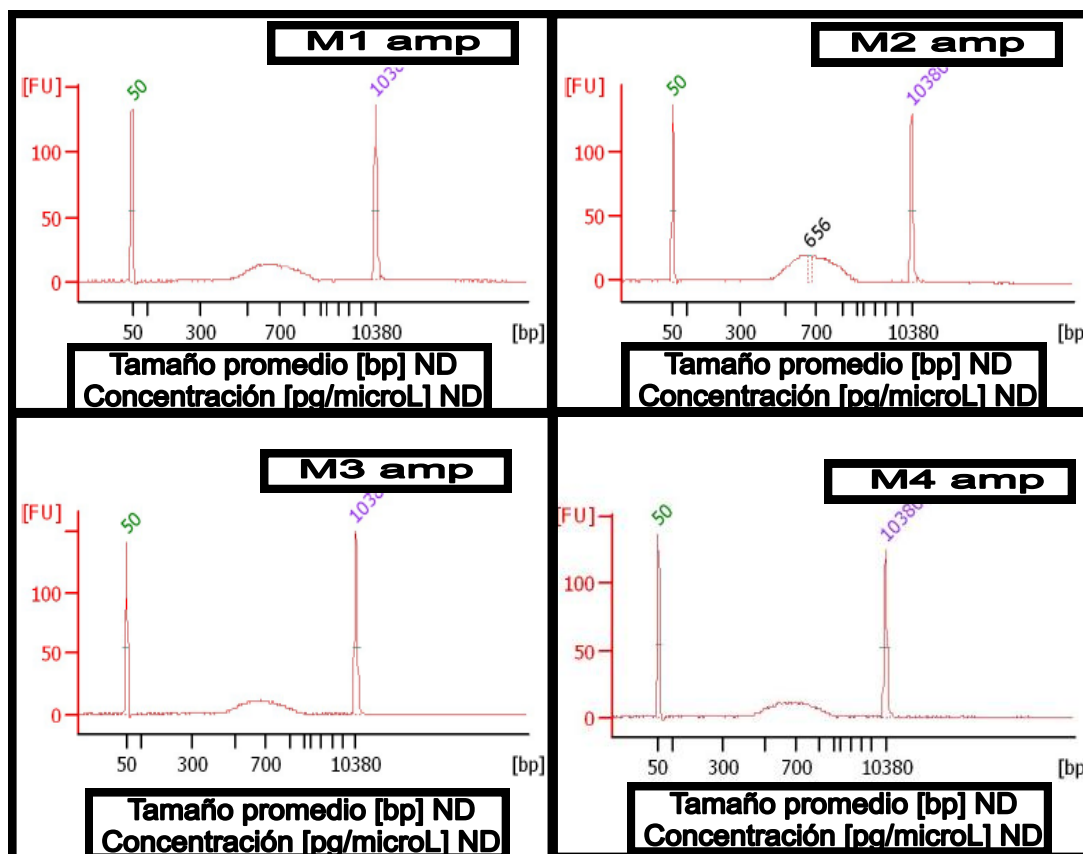


Figura 9. Evaluación de la calidad de la amplificación (12 ciclos) de las bibliotecas de las matrices. En la imagen M1 amp se muestran los resultados de la matriz 1. En la imagen M2 amp se muestran los resultados de la matriz 2. En la imagen M3 amp se muestran los resultados de la matriz 3. En la imagen M4 amp se muestran los resultados de la matriz 4. En todas las imágenes los picos de 50 bp y 10380 bp son los marcadores control. ND, no determinado.

Para conseguir la amplificación deseada, se buscó que las unidades de fluorescencia alcanzaran como mínimo 50 FU, por lo que se decidió el rango de ciclos a evaluar con base en lo expresado durante la comunicación con el personal técnico de la compañía Agilent®, debido a que un exceso de ciclos de amplificación podría generar secuencias repetidas y la dimerización de *primers* que influirían en

los resultados obtenidos de la secuenciación. Los ciclos a evaluar fueron de 17 ciclos a 26 ciclos, en la matriz M1 se evaluaron 26 ciclos, en M2 24 ciclos, en M3 22 ciclos y en M4 17 ciclos. Los resultados se muestran en la Figura 10, donde la matriz M4 fue la única que presentó la amplificación deseada.

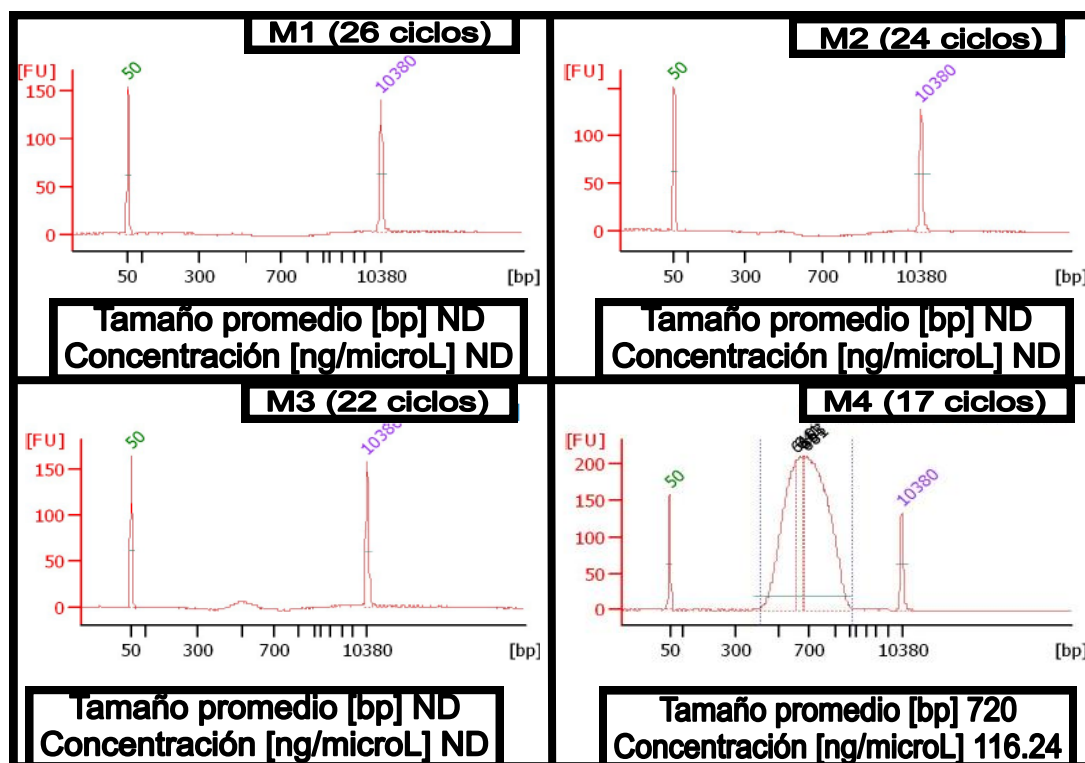


Figura 10. Evaluación de la calidad de las bibliotecas amplificadas con diferente número de ciclos. En la imagen M1 (26 ciclos) se muestran los resultados de la biblioteca de la matriz 1 amplificada con 26 ciclos. En la imagen M2 (24 ciclos) se muestran los resultados de la biblioteca de la matriz 2 amplificada con 24 ciclos. En la imagen M3 (22 ciclos) se muestran los resultados de la biblioteca de la matriz 3 amplificada con 22 ciclos. En la imagen M4 (17 ciclos) se muestran los resultados de la biblioteca de la matriz 4 amplificada con 17 ciclos. En todas las imágenes los picos de 50 y 10380 bp son los marcadores control.

Con base en los resultados anteriores, se determinó utilizar 17 ciclos para amplificar cada una de las bibliotecas de las matrices elaboradas (Figura 11), y se observó que con estos ciclos se alcanzaba la concentración de bibliotecas adecuada.

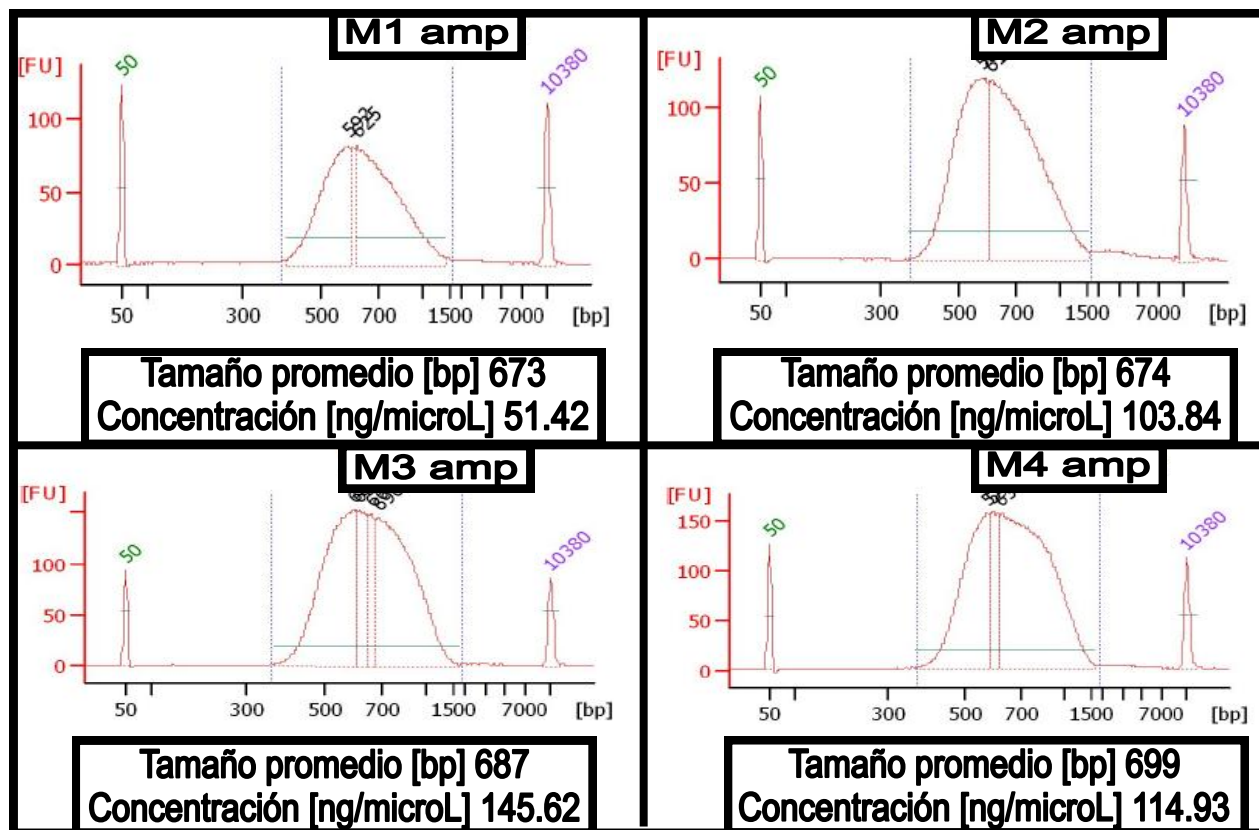


Figura 11. Evaluación de la calidad de la amplificación (17 ciclos) de las bibliotecas de cada matriz. En la imagen M1 amp se muestran los resultados de la amplificación de la biblioteca de la matriz 1. En la imagen M2 amp se muestran los resultados de la amplificación de la biblioteca de la matriz 2. En la imagen M3 amp se muestran los resultados de la amplificación de la matriz 3. En la imagen M4 amp se muestran los resultados de la amplificación de la matriz 4. En todas las imágenes los picos de 50 bp y 10380 bp son los marcadores control.

Una vez obtenidos las calidades adecuadas de la amplificación, se procedió a analizar la concentración y tamaño de cada biblioteca amplificada para seleccionar aquella con mejor calidad.

La biblioteca de M1 presentó un tamaño promedio de 673 bp, el cual se encuentra dentro del rango especificado (entre 300 y 900 bp) pero, debido a que su concentración fue la más baja de todas las matrices evaluadas (51.42 ng/μL), fue descartada. La biblioteca de M2 presentó un tamaño promedio de 674 bp, el cual se encuentra dentro del rango especificado y su concentración fue de 103.84 ng/μL la cual también es adecuada para el estudio. La biblioteca de M3 presentó

un tamaño promedio de 687 bp y concentración de 145.62 ng/ μ L, ambos adecuados para el estudio. Como se mencionó en el apartado VIII.2.2 de Resultados y Análisis, la ligación de adaptadores no fue la adecuada en la preparación de la biblioteca de M4, lo cual podría influir en los pasos experimentales posteriores ya que los adaptadores sirven para anclarse a las perlas que se ocuparán en la secuenciación, es por ello que se decidió descartar esta biblioteca para continuar con el estudio.

Por lo anterior, las bibliotecas que cumplieron con los parámetros adecuados de tamaño y concentración fueron M2 y M3, por lo cual se decidió compararlas entre sí para seleccionar sólo una biblioteca con la mejor calidad.

En la Figura 11, la biblioteca amplificada de M2 se mostró un pico más definido que el observado en la biblioteca amplificada de M3, por lo cual la biblioteca de M3 fue descartada para proseguir con el estudio. Un pico más definido corresponde a una variación menor en el tamaño de los fragmentos, mientras que un pico con una meseta mayor corresponde a una variación mayor, ésta última puede repercutir en el tamaño de las secuencias obtenidas al final del estudio y por ello es necesario descartar aquellas bibliotecas que presentaron los picos menos definidos.

Adicionalmente, cabe mencionar que la biblioteca M2 corresponde a la mezcla de 34 ng de ADN por evento GM, es decir, en esta matriz se conoce la cantidad de ADN por evento GM inicial, por lo cual se podría generar una estimación con mayor precisión sobre la cantidad de los elementos GM capturados posterior a la corrida de secuenciación.

Debido a todo lo anterior se seleccionó la biblioteca M2 para continuar con el estudio ya que esta biblioteca fue la que presentó mejor calidad al analizar el tamaño promedio de los fragmentos, la concentración y la definición del pico observados en la electroforesis en "chip".

Una vez que la biblioteca amplificada de M2 fue seleccionada, se decidió preparar un duplicado para evaluar la repetibilidad de ésta amplificación en los pasos experimentales posteriores (ANEXO IV Figura A.5), donde se observó una similitud entre el tamaño de los fragmentos obtenidos, el cual fue cercano a 700 bp y en la concentración ya que en ambas se obtuvieron valores arriba de los 100 FU.

Con base en los resultados anteriores la biblioteca generada a partir de la matriz M2 fue seleccionada para continuar con el estudio (ANEXO I).

VIII.3.2 Hibridación y post-hibridación.

Como se mencionó al inicio del presente apartado, con la biblioteca amplificada M2 se realizaron tres ensayos de hibridación (Hyb I, Hyb II e Hyb III), los cuales fueron generados para evaluar la captura de los híbridos ARN-ADN formados por medio de dos tipos de perlas electromagnéticas con estreptavidina.

En Hyb I se evaluó la funcionalidad de las perlas *Dynabeads MyOne Streptavidin C1* de la compañía *Invitrogen*[®] o perlas C1, ya que el fabricante las recomienda para ensayos con ácidos nucleicos. Para evaluar su funcionalidad, se procedió a tomar alícuotas después de cada lavado en la captura y después de la digestión de las sondas de ARN, estas alícuotas fueron los controles 1 al 9. Para analizar las bibliotecas capturadas y purificadas se tomó una alícuota de éstas, que fue el control 10.

En el Control 1 y 2, se esperaba observar las bibliotecas no capturadas, es decir fragmentos con baja concentración y con tamaño cercano a 700 bp. Estos datos corresponden a la biblioteca amplificada de M2 que inicialmente se colocó en la hibridación. Al observar la Figura 12 Control 1, se apreció que el comportamiento no fue el esperado, ya que no se observaron fragmentos ni marcadores control. En el caso del Control 2 tampoco se observó el comportamiento esperado presentando un pico invertido.

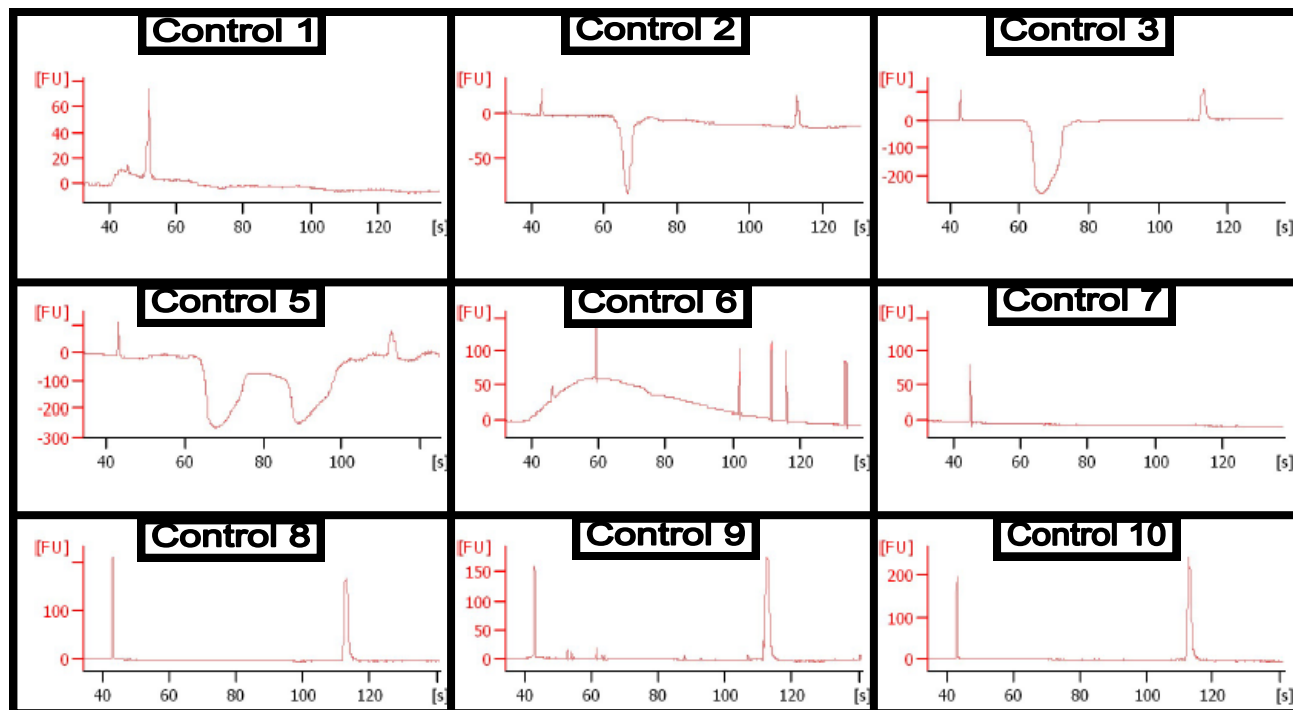


Figura 12. Evaluación de la calidad de los controles obtenidos en Hyb I. Los controles 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a lavados después de la captura de ADN. El control 6 corresponde a las bibliotecas de ADN capturadas (híbridos de ADN-ARN). Los controles 7, 8 y 9 corresponden a lavados después de la digestión de las sondas de ARN. El control 10 corresponde a las bibliotecas de ADN capturadas y purificadas. Los marcadores control son los picos de 43 s y 115 s, en las imágenes Control 2, Control 3, Control 8, Control 9 y Control 10.

Para el caso de los controles 3, 4 y 5 se esperaba observar picos o fragmentos con tamaño cercano a 200 bp, que fue el tamaño correspondiente a las sondas de ARN; sin embargo, los resultados observados en la Figura 12 Control 3 y Control 5 mostraron que el comportamiento observado fue diferente, presentando picos invertidos.

Al considerar que las sondas de ARN son sensibles a la temperatura, se tomó en cuenta que un mal manejo durante la parte experimental podría ocasionar su degradación prematura y un comportamiento diferente al esperado, como el observado en la evaluación de la calidad de los controles. Por lo cual se consultó el comportamiento de los controles 1, 2, 3 y 5 en los manuales del fabricante *Agilent*[®] del equipo *Bioanalyzer 2100*[®], los cuales mencionaban que una muestra en un medio rico en sales afectaba el funcionamiento de la electroforesis en "chip",

de igual forma se analizaron las especificaciones del protocolo *Agilent High Sensitivity DNA Kit Quick Start Guide*[®], los cuales indicaban que la concentración máxima para un buen funcionamiento de la electroforesis en "chip" es de 10 mM para disolución amortiguadora Tris y 1 mM de EDTA. Al no contar con los datos específicos de los reactivos que utiliza el sistema *SureSelect*[®] se asumió que estos reactivos sobrepasaron estas concentraciones, por lo cual el análisis de éstos controles no se logró evaluar.

En el caso del control 6 se esperaban observar las bibliotecas capturadas como un pico definido o fragmentos con tamaño cercano a 700 bp con baja concentración, esto se confirmó al observar la Figura 12 Control 6, debido a que fue el único control que presentó varios picos y uno de ellos definido.

El comportamiento de los controles 7, 8 y 9 se observa en la Figura 12, donde no figuran fragmentos o picos de interés, esto concordó con lo esperado ya que los fragmentos no capturados fueron eliminados anteriormente como consecuencia de los últimos lavados realizados.

El control 10 corresponde a las bibliotecas capturadas y purificadas, donde se esperaba que la concentración de estas bibliotecas fuera baja y que probablemente no se detectaran en la electroforesis en "chip". Los resultados de este control también se observan en la Figura 12, los cuales concuerdan con lo esperado; sin embargo, no indicaron si la captura se presentó o no, ya que la concentración de fragmentos se conoció hasta después de su amplificación.

Con base en el análisis de los controles 1 al 10, se concluyó que no se logró evaluar la funcionalidad de la captura de las perlas C1 hasta este punto, por lo cual se buscó obtener resultados satisfactorios al realizar otra hibridación (Hyb II), esta vez al evaluar la funcionalidad de las perlas *Dynabeads MyOne Streptavidin T1* o perlas T1 de la compañía *Invitrogen*[®].

La diferencia que presentan las perlas T1 respecto a las perlas C1 es el medio en el que se encuentran, ya que las perlas C1 tienen una carga negativa hidrofílica en 1 μm de perlas, mientras que las perlas T1 tienen una superficie hidrofóbica con una baja carga para capturar por medio de la tosilactivación (Invitrogen Dynal AS, 2006).

De la misma forma que en Hyb I, se generaron los controles del 1 al 10 correspondientes a Hyb II (ANEXO IV Figura A.6), donde se observó el mismo comportamiento, por lo cual se concluyó que hasta este punto no era posible conocer si la captura de las bibliotecas de ADN fue la adecuada.

Para comprobar la repetibilidad del ensayo Hyb II, se realizó una última hibridación (Hyb III); en este ensayo se ocupó el duplicado de la biblioteca amplificada de M2 y las perlas *Dynabeads MyOne Streptavidin T1* o perlas T1 de la compañía *Invitrogen*[®] pero no se evaluó la calidad de los controles 1 al 10 debido a que se asumió que no era posible obtener información destacada de ellos.

Una vez realizados los tres ensayos, y al no contar con evidencia contundente del proceso de hibridación realizado, se decidió continuar el estudio con el material generado y evaluar el proceso de hibridación realizado en la siguiente etapa (ANEXO I).

VIII.3.3 Amplificación de bibliotecas capturadas.

Se procedió a realizar la amplificación de las bibliotecas capturadas con el objetivo de incrementar la concentración de los fragmentos capturados y obtener así bibliotecas representativas de los eventos GM capturados. Un objetivo adicional de esta amplificación fue evaluar la funcionalidad de captura de las perlas C1 y T1, ya que con los controles generados en la etapa anterior no fue posible llegar a una conclusión verídica de esta evaluación.

Esta etapa se inició con la amplificación de las bibliotecas capturadas en Hyb I (usando perlas C1), evaluando 12 y 14 ciclos de amplificación. Los resultados se

muestran en la Figura 13, donde se observó que 12 ciclos no fueron suficientes para alcanzar la concentración mínima para ser detectados en la electroforesis en “chip” de alta sensibilidad.

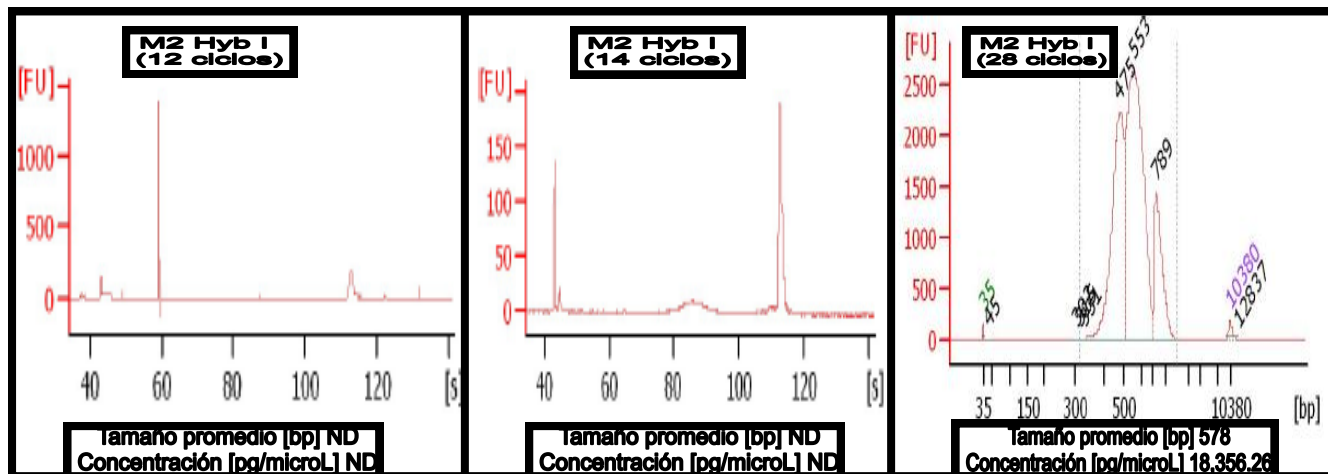


Figura 13. Evaluación de la calidad de las amplificaciones prueba de las bibliotecas capturadas en Hyb I. Se muestran los resultados de la amplificación con 12 ciclos (izquierda), 14 ciclos (centro) y 28 ciclos (derecha) de las bibliotecas de la matriz 2 capturadas en la hibridación I. Los marcadores control son los picos de 43 s y 115 s (imagen izquierda e imagen central) y los picos de 35 bp y 10380 bp (imagen derecha). ND, no determinado.

En el caso de la amplificación con 14 ciclos se observó un ligero aumento en la concentración, por lo cual se decidió realizar una reamplificación de esta muestra al evaluar 14 ciclos más, es decir, 28 ciclos de amplificación. En la reamplificación se alcanzó la concentración y tamaño deseados (mayor a 50 FU y con un tamaño cercano a 700 bp); sin embargo, los tamaños presentaron variación desde 300 hasta 700 bp, siendo en 500 bp los de mayor concentración, lo cual no fue adecuado debido a que, en el ensayo de secuenciación, una variación en el tamaño de los fragmentos puede generar lecturas de baja calidad, inclusive si la amplificación cumple con los parámetros de concentración y tamaño establecidos. Por lo anterior se descartaron las bibliotecas capturadas y amplificadas en Hyb I y se determinó que la captura con las perlas C1, no fue adecuada.

Una vez obtenidos los resultados anteriores, se procedió a realizar la amplificación de las bibliotecas capturadas en Hyb II (usando perlas T1) evaluando para este caso 14 y 28 ciclos de amplificación (Figura 14).

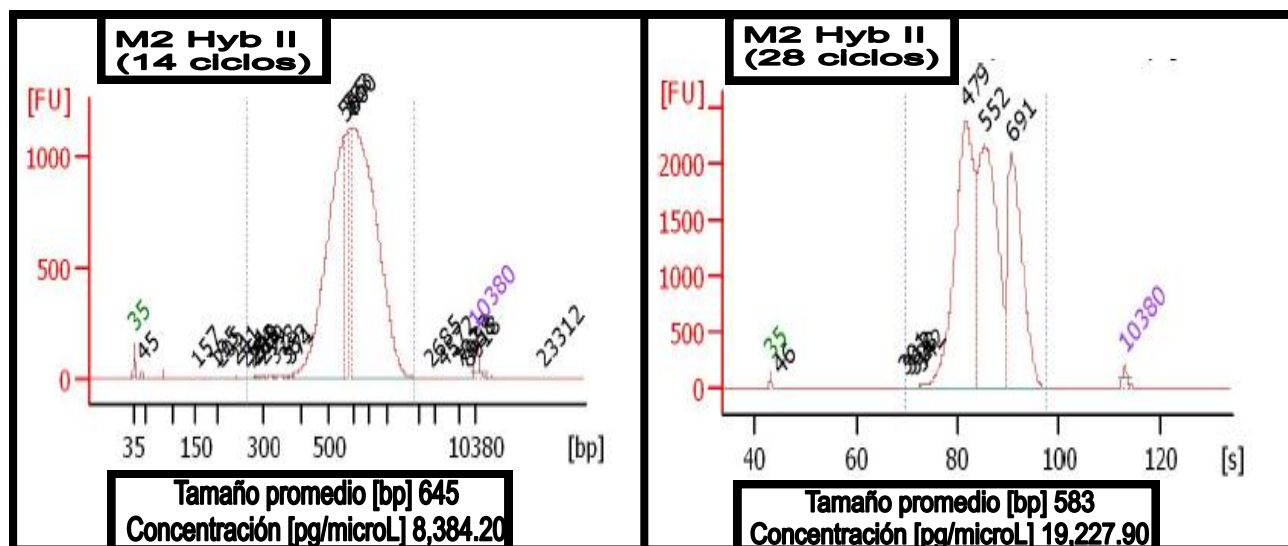


Figura 14. Evaluación de la calidad de las amplificaciones prueba de las bibliotecas capturadas en Hyb II. Se muestran los resultados de la amplificación con 14 ciclos (izquierda) y 28 ciclos (derecha) de las bibliotecas de la matriz 2 capturadas en la hibridación II. En todas las imágenes los marcadores control son los picos de de 35 bp y 10380 bp.

Se observó que con 14 ciclos, se obtienen fragmentos de bibliotecas capturadas en Hyb II con tamaño similar (un solo pico definido), mientras que con 28 ciclos se observó que se obtienen fragmentos con una variación en el tamaño (tres picos). Este último comportamiento podría deberse a que con 28 ciclos de amplificación la enzima pierde funcionalidad y no alcanza a replicar todo el fragmento, produciendo fragmentos de diferentes tamaños, por ello se descartó esta amplificación y se determinó que 14 ciclos de amplificación son los mejores para alcanzar la amplificación deseada. Al observar estos resultados se determinó que las perlas T1 presentaron una mejor captura que las perlas C1 ya que, la concentración de las bibliotecas capturadas es inversamente proporcional al número de ciclos de amplificación.

Una vez determinado el número de ciclos de amplificación, se procedió a amplificar las bibliotecas capturadas en Hyb III, esto con el fin de confirmar que 14 ciclos son adecuados para obtener la amplificación deseada (ANEXO IV Figura A.7), se observó que la amplificación de las bibliotecas capturadas en Hyb II e Hyb III son similares, además de observar un claro aumento en la concentración y un tamaño promedio entre 600 y 700 bp, lo cual indicó que la amplificación con 14 ciclos es repetible.

Finalmente y con el objetivo de corroborar que los reactivos usados no presentaron alguna contaminación, se adicionó un control negativo en cada amplificación de las bibliotecas capturadas. (ANEXO IV Figura A.8), donde no se observaron fragmentos, lo que indicó que los reactivos utilizados no se encontraron contaminados.

Con los resultados obtenidos en la amplificación de bibliotecas, se concluyó que las hibridaciones Hyb I, II y III lograron capturar diferentes concentraciones de híbridos ARN-ADN; sin embargo, se observó que Hyb II y III capturaron una cantidad mayor, por lo que se determinó que las perlas T1 presentaron una mejor funcionalidad que las perlas C1 y se procedió a cuantificar sólo las bibliotecas capturadas y amplificadas de Hyb II y III (ANEXO I).

VIII.4 Cuantificación.

Con el tamaño promedio de los fragmentos de las bibliotecas capturadas y amplificadas de Hyb II y III obtenidos de la electroforesis en "chip" de alta sensibilidad, se procedió a su cuantificación por medio de una Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qPCR).

Este método utilizó seis estándares con concentraciones específicas, estos se amplificaron y, por medio de un reportero que produjo una cantidad de fluorescencia en proporción a la cantidad de ADN replicada cada ciclo, se obtuvo un valor C_p que es el ciclo de amplificación en el que las copias de ADN aumentan

de manera significativa. Este C_p se le asignó a cada estándar y con sus concentraciones se construyó una curva de calibración en la cual se interpolaron los C_p obtenidos en cada muestra para obtener su concentración. Para aceptar la curva de calibración para la cuantificación se tomaron en cuenta tres criterios. El primer criterio fue la eficiencia, la cual se debió encontrar entre 90 y 110 %, el segundo fue que el error debió ser menor o igual a 0.02 y el tercero fue que las muestras amplificaran dentro de la curva de calibración. Estos criterios aseguraron que no se sobreestimarán o subestimarán las concentraciones de las muestras.

En la cuantificación realizada para las bibliotecas de Hyb II, la eficiencia de la curva fue de 94 % (Figura 15), y para la cuantificación realizada para las bibliotecas de Hyb III fue de 93.4 % (ANEXO IV Figura A.9), lo cual permitió aceptar ambas curvas de calibración de acuerdo con el primer criterio de aceptación.

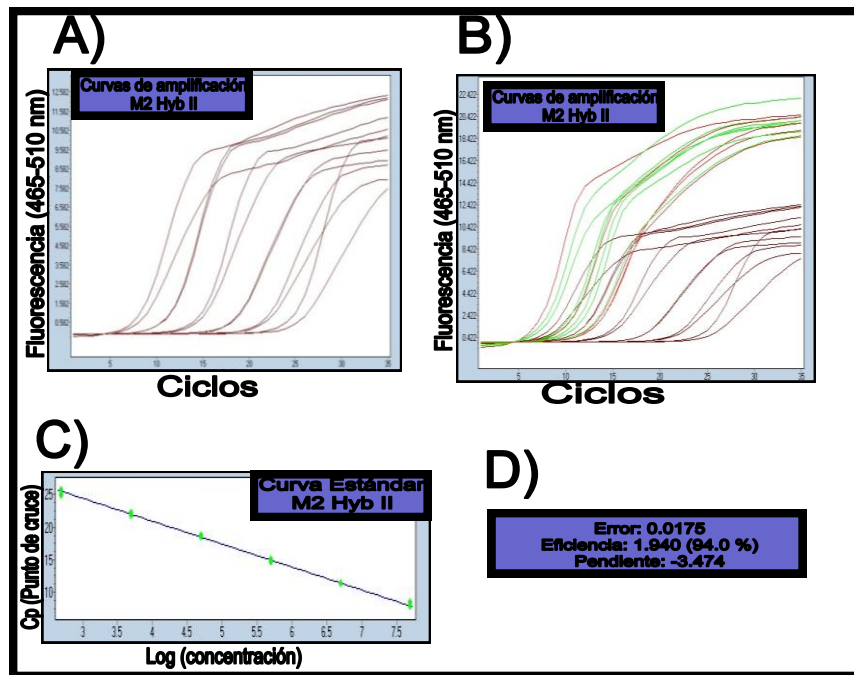


Figura 15. Curva de calibración para cuantificar bibliotecas capturadas y amplificadas en Hyb II mediante qPCR. En la imagen A se observa la curva de calibración generada a partir de las curvas de amplificación detectadas por la fluorescencia emitida por los estándares. En la imagen B se observan las curvas de amplificación de los estándares y las muestras. En la imagen C se observa la curva de calibración generada a partir del logaritmo de la concentración y el C_p (ciclo de amplificación donde la fluorescencia cambia significativamente) de los estándares. En la imagen D se observan los valores de la curva: error, eficiencia y pendiente.

De acuerdo con el segundo criterio, la cuantificación realizada para las bibliotecas de Hyb II presentó un error de 0.0175 (Figura 15), y para las bibliotecas de Hyb III de 0.00685 (ANEXO IV Figura A.9). Estos valores indicaron que dentro de la curva existe repetibilidad de los resultados y al encontrarse en un valor menor o igual a 0.02 se aceptaron ambas curvas de calibración.

El tercer criterio no es cuantitativo, por lo que se debió observar las gráficas de amplificación (Figura 15 imagen B y ANEXO IV Figura A.9 imagen B), donde las muestras (líneas en color verde y/o rojo) se debían encontrar dentro de la curva generada con los estándares utilizados (líneas en color café).

En la imagen B de la Figura 15 se observó que las diferentes diluciones de la muestra se encuentran entre los estándares 1 y 2, con excepción de la dilución 1:500. Los datos obtenidos de la dilución 1:500 fueron descartados para la cuantificación ya que se encontraron fuera de los estándares, es decir, no cumplieron con el tercer criterio. Por lo anterior sólo se tomaron en cuenta solo los datos obtenidos de las diluciones 1:1000, 1:2000 y 1:4000 para obtener la concentración final de las bibliotecas capturadas y amplificadas de Hyb II.

En el caso de la cuantificación de las bibliotecas capturadas y amplificadas de Hyb III, se encontró que el tercer criterio se cumplió al observar que las muestras (líneas rojas) se encuentran entre los estándares 1 y 3. (ANEXO IV Figura A.9 imagen C).

Una vez que se determinó si las curvas generadas fueron adecuadas para cuantificación se procedió a la realización de los cálculos indicados en el apartado VII.4 de Materiales y Métodos para conocer las concentraciones de las bibliotecas capturadas y amplificadas (ANEXO IV, Tabla A.12) y se consideró el valor más alto como la concentración real de las bibliotecas capturadas y amplificadas. Las bibliotecas capturadas y amplificadas de Hyb II y III presentaron una concentración de 2.64×10^{11} copias/ μL y 4.31×10^9 copias/ μL , respectivamente. Con estas concentraciones se procedió a continuar con el estudio (ANEXO I).

VIII.5 Emulsión pequeña (emPCR SV) de bibliotecas capturadas y amplificadas.

En este paso se debió evaluar el desempeño de diferentes números de cpb o copias de ADN por perla para colocar sólo una biblioteca en una perla, a esto se le llamó titulación por emPCR. Esta evaluación se realizó primero en pequeña escala (emPCR SV) para obtener un valor adecuado de cpb que se utilizó en una escala mayor (emPCR LV) con la cual se trabajó en la corrida de secuenciación.

La emPCR SV consistió en que un fragmento de biblioteca se acoplara a una perla, por medio de la PCR en emulsión se generaron clonas del fragmento inicial (fragmentos iguales al inicial y acoplados a la misma perla), estas perlas se recuperaron al romper la emulsión generada y las perlas con ADN o perlas enriquecidas se titularon o valoraron.

La emPCR SV se realizó sólo con las bibliotecas capturadas y amplificadas obtenidas de Hyb II, debido a que primero se determinó el cpb adecuado para generar las perlas enriquecidas que se utilizaron en la corrida de secuenciación.

Como inicio se procedió a realizar una Solución de Trabajo o *Working Solution* o WS, de concentración entre 1×10^5 moléculas/ μL . Para ello se utilizaron las concentraciones obtenidas de la cuantificación de las bibliotecas capturadas (ANEXO IV Tabla A.13). Con esta WS se realizó la titulación por emPCR al evaluar los cpb 0.15, 0.4, 0.5, 0.6, 0.62, 1.23, 1.85 y 2.47 y por medio de las perlas recuperadas (% recuperación) y el porcentaje de perlas enriquecidas (% enriquecimiento).

Los porcentajes de recuperación de cada cpb evaluado indican la calidad de la recuperación de las perlas después de romper la emPCR SV, un porcentaje menor o igual a 50 % representa una baja calidad en la recuperación. De los cpb evaluados en la emPCR SV se obtuvo el porcentaje de las perlas recuperadas de

cada uno (ANEXO IV Figura A.10), donde se observó que sólo el cpb de 0.15 evaluado no cumple con el criterio requerido y por lo cual este fue descartado.

Posterior a la evaluación de la recuperación de perlas se obtuvo el porcentaje de enriquecimiento para aquellos cpb que cumplieron con el rango establecido. Los porcentajes de enriquecimiento de cada cpb evaluado indicaron la cantidad de perlas que contienen clonas de las bibliotecas. Un porcentaje entre 3 y 20 % representó un cpb adecuado para preparar la emulsión grande (emPCR LV). Los resultados obtenidos del enriquecimiento se muestran en la Figura 16, donde se observó que, en todos los casos, el porcentaje de las perlas enriquecidas obtenido no era adecuado ya que todos se encontraron por arriba del rango establecido (3-20 %).

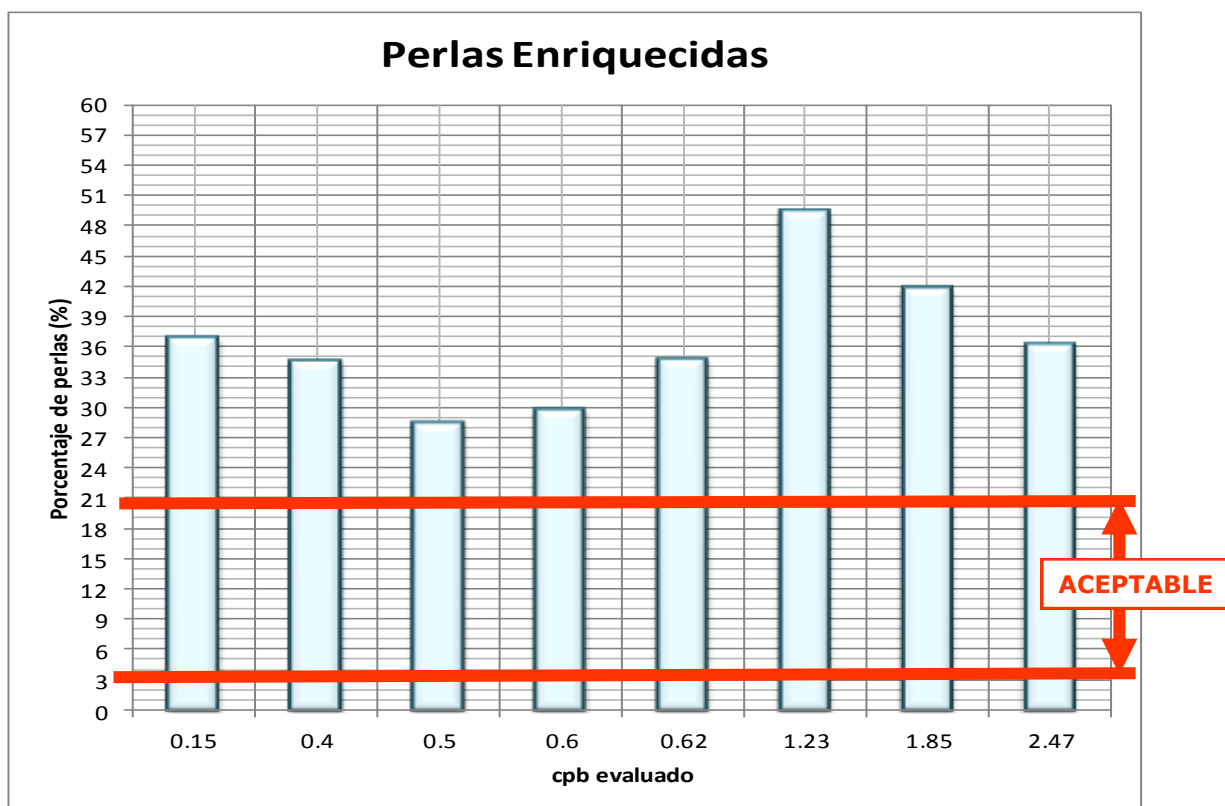


Figura 16. Titulación por emPCR SV de perlas enriquecidas con bibliotecas capturadas y amplificadas de Hyb II. Se valoraron diferentes cpb para conocer la cantidad de perlas con bibliotecas capturadas y amplificadas obtenidas en Hyb II usando una solución de trabajo (WS) de concentración 1×10^5 moléculas/ μL .

Los resultados anteriores mostraron que el enriquecimiento obtenido no se encontró dentro del rango recomendado; sin embargo, en evaluaciones previas en el CNRDOGM se observó que no todos los valores de cpb presentan el mismo comportamiento en una escala mayor y que pueden entrar en el rango adecuado al momento de realizar la emPCR LV, por lo cual se decidió evaluar el cpb con el enriquecimiento más cercano al rango buscado, es decir, 0.5.

Para asegurar y tener una alternativa de cpb se decidió seleccionar otro cpb para generar las perlas que se utilizarán en la secuenciación. El método *emPCR Method Manual -Lib-L SV* indica que los valores de cpb con mejores resultados son mayores a 1; de esta forma se seleccionó el cpb mayor a 1 que presentó el enriquecimiento más cercano al rango establecido, es decir 2.47.

Una vez elegidos los valores de cpb de trabajo (0.5 y 2.47) con el porcentaje más bajo de enriquecimiento, se prosiguió con el estudio (ANEXO I).

VIII.6 Emulsión grande (emPCR LV) de bibliotecas capturadas y amplificadas.

Una vez estimados los valores de cpb por medio de la titulación de emPCR SV se procedió a realizar las emulsiones grandes (emPCR LV) con los cpb de 0.5 y 2.47 a partir de las bibliotecas capturadas y amplificadas en Hyb II y en Hyb III. El objetivo de la emPCR LV es utilizar los cpb de trabajo determinados en la emPCR SV para generar perlas enriquecidas con el ADN adecuado, estas perlas se cargarán en la picoplaca de la corrida de secuenciación.

En el caso de las emPCR LV se prepararon WS con una concentración de 1×10^7 moléculas/ μL , (ANEXO IV Tabla A.14), con ellas se realizaron los ensayos para evaluar los cpb de 0.5 y 2.47. Las perlas recuperadas obtenidas de las emulsiones valoradas de la Hyb II fueron mayores a 70 % mientras que las perlas recuperadas de Hyb III fueron mayores a 80 % (ANEXO IV Figura A.11),

comprobando que el proceso de recuperación fue adecuado y que ambos ensayos fueron repetibles.

Enseguida se determinó el porcentaje de enriquecimiento; un porcentaje de enriquecimiento adecuado para realizar la corrida de secuenciación, se encuentra entre 3 y 20 %, siendo el óptimo 8 %. Los resultados se muestran en la Figura 17, donde se observó que en Hyb II el porcentaje de enriquecimiento para el cpb de 0.5 y 2.47 fue de 7.2 % y 10.41 %, respectivamente. Lo anterior corroboró que los cpb de trabajo cumplieron con el criterio al encontrarse en el rango entre 3 y 20 % y se acercaron al óptimo de 8 %. No obstante, con el fin de evaluar la repetibilidad de este ensayo, se evaluaron una vez más los mismos cpb en Hyb III, observando esta vez que el cpb de 2.47 sobrepasó el rango de aceptación por lo cual las perlas obtenidas a partir de este cpb se descartaron para realizar la corrida de secuenciación. Estos resultados se muestran también en la Figura 17.

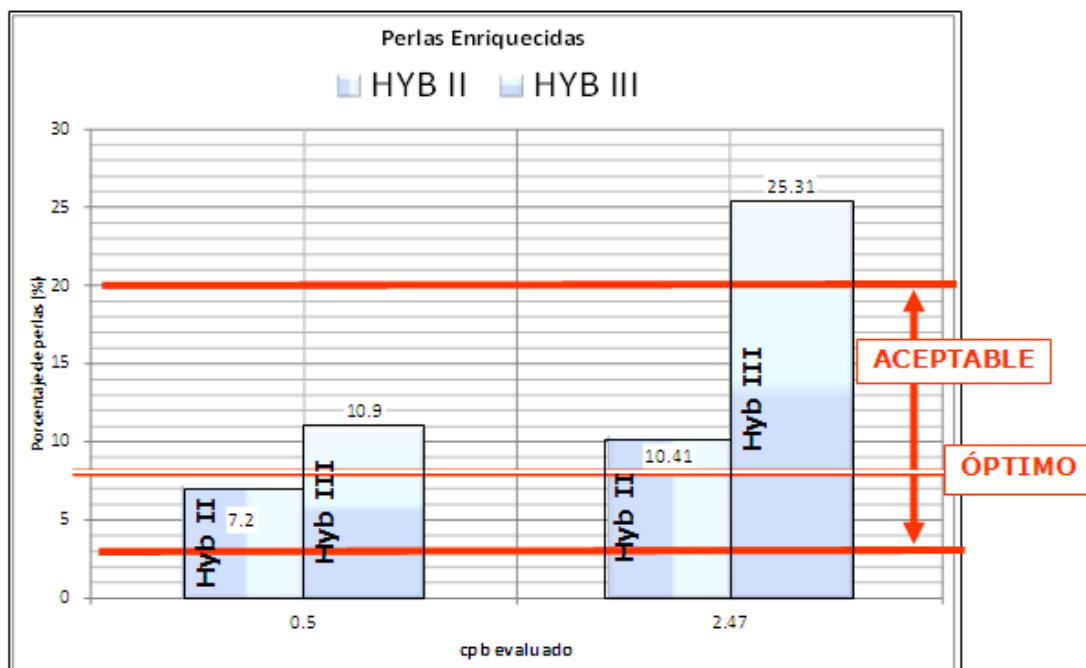


Figura 17. Titulación por emPCR LV de perlas enriquecidas con bibliotecas capturadas y amplificadas de Hyb II e Hyb III. Los cpb de trabajo fueron 0.5 y 2.47 para la reacción en cadena de la polimerasa en emulsión grande (emPCR LV), usando una solución de trabajo (WS) de concentración 1×10^7 moléculas/ μ L.

Al evaluar los cpb de 0.5 y 2.47 con las bibliotecas de Hyb II, ambas perlas enriquecidas obtenidas cumplieron con el criterio establecido y fueron seleccionadas para continuar con la corrida de secuenciación, mientras que al evaluar los cpb de 0.5 y 2.47 con las bibliotecas de Hyb III, sólo las perlas enriquecidas obtenidas del cpb de 0.5 fueron seleccionadas para continuar con la corrida de secuenciación (ANEXO I).

VIII.7 Corrida de secuenciación.

Con los resultados obtenidos de la emPCR LV se determinó que las perlas enriquecidas con una WS de 1×10^7 moléculas/ μL de las bibliotecas capturadas y amplificadas resultantes de la Hyb II y III de M2 cuentan con la calidad y parámetros adecuados para realizar la corrida de secuenciación.

Se realizaron dos corridas de secuenciación en las cuales se buscó obtener lecturas de alta confianza, las perlas enriquecidas se cargaron en una pico placa (*PTP*) con dos regiones, cada región correspondió a las perlas enriquecidas con un cpb. La corrida 1 (Cor 1) se realizó con las perlas enriquecidas con cpb de 0.5 en una región y con las perlas enriquecidas con cpb de 2.47 en otra región. La corrida 2 (Cor 2) se realizó con las perlas enriquecidas con cpb de 0.5 en ambas regiones.

Una vez terminadas las corridas de secuenciación y obtenidas las secuencias por medio de flujogramas, se analizaron estas secuencias por medio del Software del equipo *454 GS FLX* de la compañía ROCHE® y el Software *CLC Genomics Workbench 5.5.2*® de la compañía *CLC bio*® donde se evaluaron los parámetros de calidad de las secuencias obtenidas.

Las lecturas obtenidas de Cor 1 fueron cercanas a 900 000, mientras que las lecturas de Cor 2 fueron mayores a 1 millón, esto nos indica que, de los 2 millones de pozos de la placa, cerca del 50 % de los pozos fueron cargados adecuadamente y de acuerdo con otras corridas obtenidas en la experiencia del CNRDOGGM y de acuerdo con el fabricante, se sabe que una corrida de *454 GS FLX* genera cerca de

1 millón de lecturas con un tamaño promedio de 400 bases, y al comparar esto con los resultados de la Tabla 2, se corroboró que el cargado y la preparación de la corrida de secuenciación fueron adecuados.

Tabla 2. Lecturas obtenidas de las corridas de secuenciación obtenidas con el sistema SeqGMOCap.

Corrida	Cor 1	Cor 2
Número de lecturas en REGIÓN 1.	412 356	578 247
Número de lecturas en REGIÓN 2.	552 366	503 297
Número total de lecturas obtenidas	964 722	1 081 544

La Cor 2 se realizó con el objetivo principal de corroborar los resultados obtenidos en Cor 1 y para evaluar la repetibilidad del ensayo. Al observar que las lecturas obtenidas en Cor 2 fueron similares al número de las obtenidas en Cor 1 se determinó que el cargado de la *PTP* fue repetible.

Otro parámetro que se tomó en cuenta para saber la confiabilidad de las lecturas obtenidas, fue la distribución de tamaño de los fragmentos (Figura 18), la cual indicó el tamaño promedio de las secuencias obtenidas y donde se observó que en Cor 1 y Cor 2 la mayoría de las secuencias obtenidas tuvieron tamaño promedio entre 400 y 600 bases, lo cual indicó que su tamaño se encontró dentro del promedio de acuerdo con el fabricante.

En la Figura 18 también se observó que en ambas corridas de secuenciación (Cor 1 y 2), existen secuencias con un tamaño menor al esperado menor a 400 bases, lo cual puede ser debido a que durante la preparación de las bibliotecas y posterior captura y amplificación, no se logró eliminar por completo las bibliotecas con tamaño menor al promedio. Otros factores que pudieron producir estas lecturas cortas fueron la actividad de la enzima polimerasa, la presencia de inhibidores de la polimerización y la calidad del secuenciador durante la corrida de secuenciación,

no obstante como el mayor porcentaje de lecturas tienen un tamaño esperado se consideró que las secuencias obtenidas son de tamaño adecuado y corresponden al esperado, por lo que las lecturas con tamaño menor no representaron algún error importante.

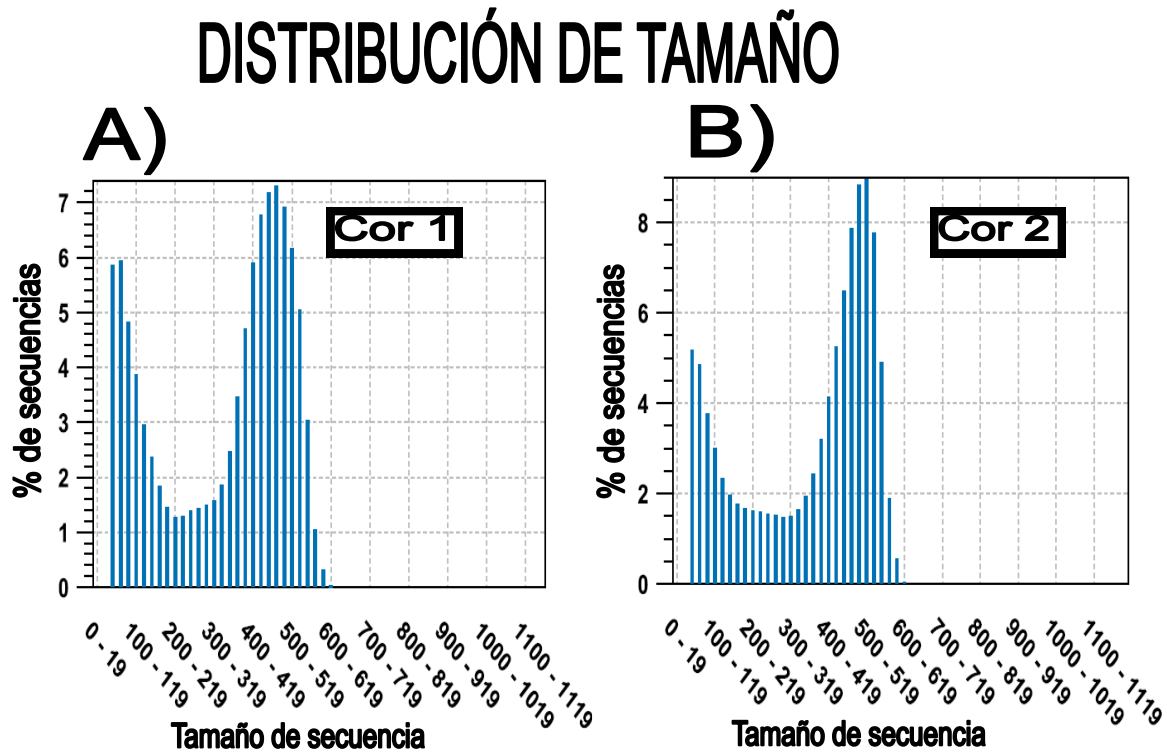


Figura 18. Tamaño de las lecturas obtenidas en la corrida 1 y 2. En el Eje X los tamaños de las secuencias y en el Eje Y el porcentaje de secuencias. En la imagen A se observan las secuencias obtenidas en la corrida 1, mientras que en la imagen B se observan las secuencias obtenidas en la corrida 2.

Como ya se ha mencionado, la Cor 2 sólo se realizó para observar la repetibilidad de este ensayo y con base en que la distribución de tamaño de las corridas se observaron semejantes se concluyó que son repetibles.

Para continuar con el análisis de las corridas realizadas se debe mencionar que existen distintas proporciones de los cuatro nucleótidos (adenina A, guanina G, citocina C y timina T). En los organismos, estas proporciones sirven para deducir la estructura de doble hebra del ADN; sin embargo, la relación más conocida es la

composición de G y C (o contenido G-C), la cual indica que las secuencias son confiables cuando el contenido de guaninas es igual al contenido de citosinas ya que son complementarias. El contenido G-C para las secuencias obtenidas se muestra en la Figura 19 donde se observó que hay dos picos con mayor porcentaje de secuencias, uno en 40 % y otro en 60 % del contenido G-C, lo cual indicó que la proporción entre G y C no fue 50 / 50 %, sino que resultó de 40 / 60 %, lo cual sólo corroboró que la matriz contiene más de una especie en este caso (algodón, maíz, trigo, soya y papa, así como diferentes elementos transgénicos), variando así el contenido G-C de la matriz.

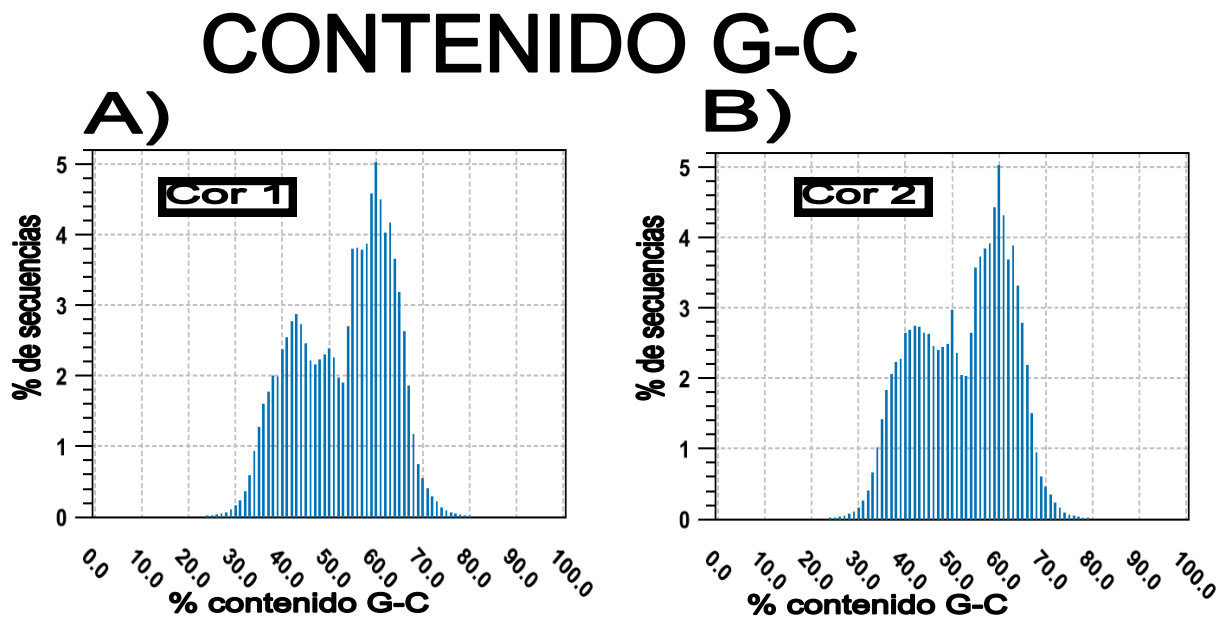


Figura 19. Contenido G-C de las lecturas obtenidas en la corrida 1 y 2. En el Eje X el porcentaje del contenido GC y en el Eje Y el porcentaje de secuencias. En la imagen A se observan los resultados de las secuencias obtenidas en la corrida 1, mientras que en la imagen B se observan los obtenidos en la corrida 2.

Por otro lado, en una secuencia de ADN se pueden encontrar máximo 4 nucleótidos (adenina, timina, guanina y citosina) y por ello se busca que en las secuencias obtenidas la contribución de cada nucleótido se encuentre entre 20 y 25 % de la secuencia. Con el valor de contribución definido se puede conocer si las secuencias obtenidas tienen un equilibrio nucleotídico o si esas secuencias no son confiables al presentar una contribución mayor de algún nucleótido. Los resultados

de la contribución de nucleótidos se muestran en la Figura 20, donde se observó que las secuencias obtenidas de Cor 1 y Cor 2 presentaron cerca de 25 % de contribución por cada nucleótido, lo cual es adecuado para continuar con el análisis de las secuencias sin descartar ninguna de ellas.

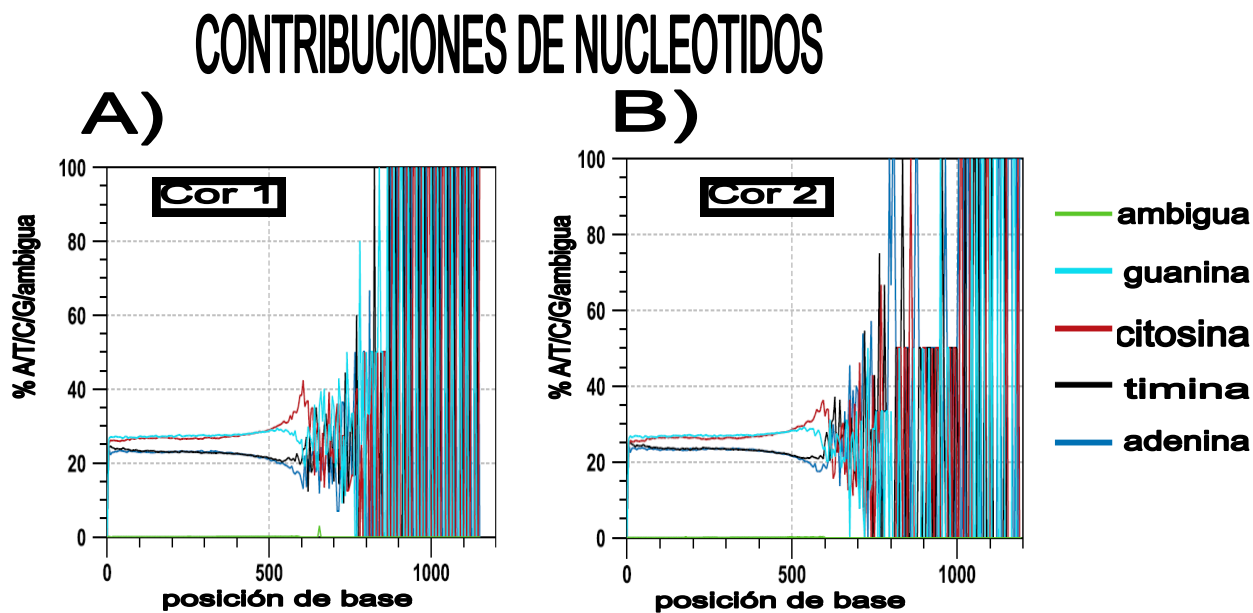


Figura 20. Contribución de nucleótidos de las lecturas obtenidas en la corrida 1 y 2. En el Eje X la posición en bases y en el Eje Y el porcentaje de nucleótidos (A, T, G, C, ambigua). En la imagen A se observan los resultados para las secuencias obtenidas en la corrida 1, mientras que en la imagen B se observan los obtenidos en la corrida 2.

De esta forma y contando con los parámetros de distribución de tamaño de las secuencias, el contenido G-C de la matriz y la contribución por nucleótidos, se podría concluir que las secuencias son confiables. Adicionalmente se conoce que en una corrida de secuenciación existen bases no determinadas o ambiguas, éstas corresponde a las bases N y son aquellas bases que no se lograron determinar debido a que, durante la elaboración del flujograma, no cumplen con la característica que toma en cuenta el secuenciador (fluorescencia igual o mayor a la emitida por las bases llave). Las bases ambiguas influyen de manera significativa en la calidad de las lecturas obtenidas ya que pueden provocar mutaciones puntuales, deleciones, inserciones y mutaciones de marco de lectura.

Al colocar las bases N, el secuenciador 454 GS FLX asegura que las secuencias obtenidas son las reales, evitando así las mutaciones mencionadas. Éstas bases N sólo se podrán determinar con certeza en una segunda corrida de secuenciación.

De las secuencias obtenidas en Cor 1 se obtuvieron menos del 5 % de lecturas ambiguas, es decir, menos del 5 % de las lecturas obtenidas corresponden a bases no conocidas. En el caso de las secuencias obtenidas en Cor 2, también se observó que menos del 5 % correspondieron a bases ambiguas (Figura 21). Este bajo porcentaje de bases ambiguas indicó que las secuencias obtenidas contienen la mayoría de las bases determinadas por lo cual, se podrá asegurar que siguen siendo de confianza, descartando algún tipo de mutación presente en las secuencias obtenidas.

Como en ambas corridas Cor 1 y 2 se observó el mismo porcentaje de bases ambiguas se logró confirmar la repetibilidad del ensayo respecto a este parámetro.

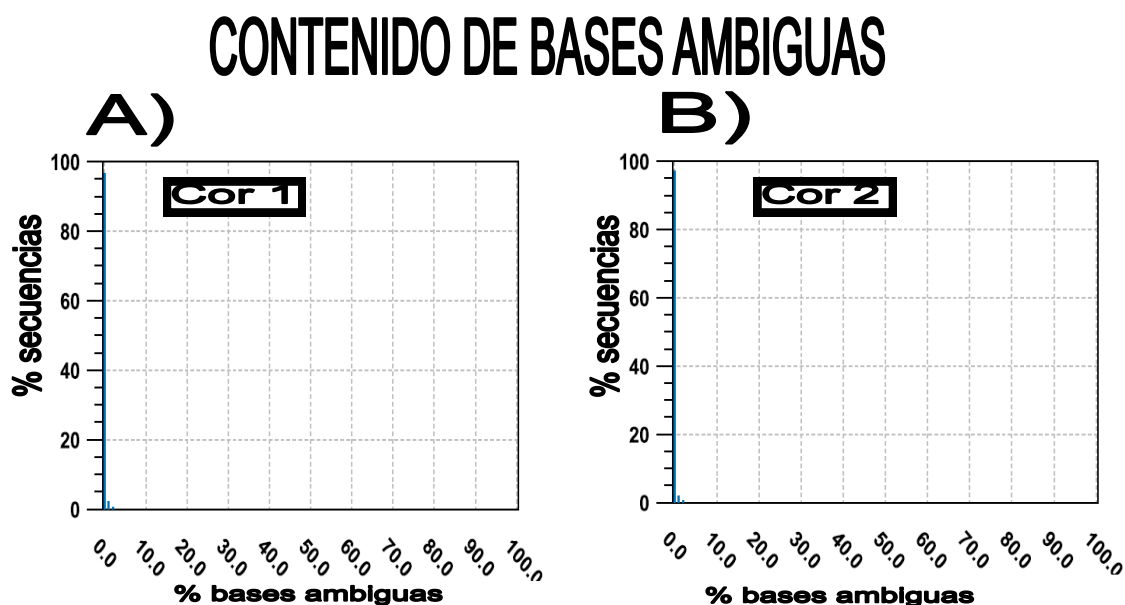


Figura 21. Bases ambiguas de las lecturas obtenidas en la corrida 1 y 2. En el Eje X el porcentaje de bases ambiguas y en el Eje Y el porcentaje de secuencias. En la imagen A se observan los resultados para las secuencias obtenidas en la corrida 1, mientras que en la imagen B se observan los obtenidos en la corrida 2.

Con el fin de conocer si las lecturas obtenidas son iguales entre sí, se analizó el nivel de duplicación de las lecturas, el cual indicó si la muestra a secuenciar contiene los mismos fragmentos. Los resultados del nivel de duplicación (Figura 22) para las secuencias obtenidas de Cor 1 y Cor 2 mostraron que la mayoría de las secuencias (cerca de 80 conteos de las secuencias relativas), presentaron bajos conteos duplicados (menores a 10), lo cual indicó que existen secuencias o fragmentos que se repiten en la mayoría de las lecturas obtenidas. Estas lecturas duplicadas se debieron a que en las bibliotecas generadas existieron fragmentos pequeños, los que influyeron en la corrida de secuenciación generando estos niveles de duplicidad; no obstante al observar que los conteos duplicados son bajos (cercanos a cero), se consideró que estas duplicaciones se podrían descartar con un análisis bioinformático.

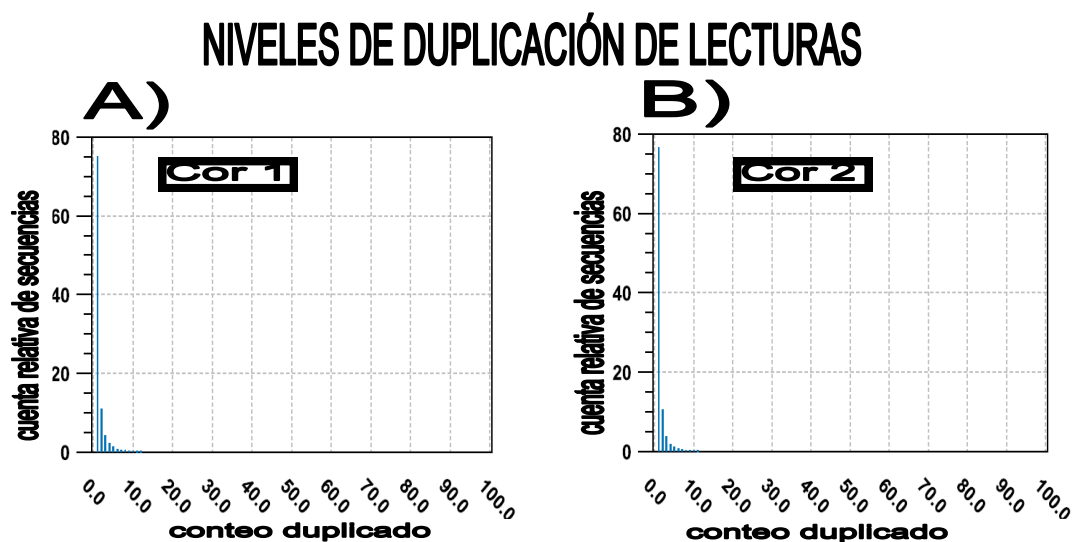


Figura 22. Nivel de duplicación de las lecturas obtenidas en la corrida 1 y 2. En el eje X el conteo de duplicación y en el Eje Y la cuenta relativa de las secuencias. En la imagen A se observan los resultados para las secuencias obtenidas en la corrida 1, mientras que en la imagen B se observan los obtenidos en la corrida 2.

Otro parámetro de gran importancia para el análisis de las secuencias obtenidas, no solo con el equipo 454 GS FLX, sino con cualquier otro secuenciador es la calidad de las lecturas. Esta calidad se expresa en la mayoría de los *Software* en una escala llamada tipo PHRED (valores de 0 a 50), la cual indica la probabilidad

de que cada base obtenida sea incorrecta. La escala tipo PHRED se muestra en la Tabla 3, donde se observa que un valor tipo PHRED menor corresponde a una menor precisión en la base obtenida como parte de la secuencia, mientras que un valor tipo PHRED superior corresponde a una base con mayor precisión.

Tabla 3. Escala tipo PHRED para determinación de la calidad de las bases obtenidas en una corrida de secuenciación.

Valor tipo PHRED de calidad	Probabilidad de que el ajuste de la base sea incorrecta	Precisión del ajuste de la base
10	1 en 10	90 %
20	1 en 100	99 %
30	1 en 1,000	99.9 %
40	1 en 10,000	99.99 %
50	1 en 100,000	99.999 %

Por lo anterior y conociendo todas las calidades de las bases obtenidas en Cor 1, y utilizando el *software* CLC, se realizó un agrupamiento por valor promedio tipo PHRED, este agrupamiento o distribución de calidad se observó como una gráfica (Figura 23), en donde los valores tipo PHRED de calidad para Cor 1 y Cor 2 se encuentran entre 20 y 40, lo cual indicó que la precisión de las bases obtenidas se encuentra entre 99 y 99.99 %, asegurando la confianza de las secuencias obtenidas.

Con lo observado en el caso de las secuencias obtenidas de Cor 2, se determinó que las secuencias obtenidas tienen la misma calidad que las secuencias obtenidas de Co1, lo cual corroboró la repetibilidad del ensayo de la corrida de secuenciación y comprobó que el sistema de captura fue repetible.

Con base en los resultados anteriores se concluyó que las secuencias obtenidas de Cor 1 y Cor 2 son confiables para realizar análisis bioinformáticos más detallados como ensamblajes y mapeos (ANEXO I).

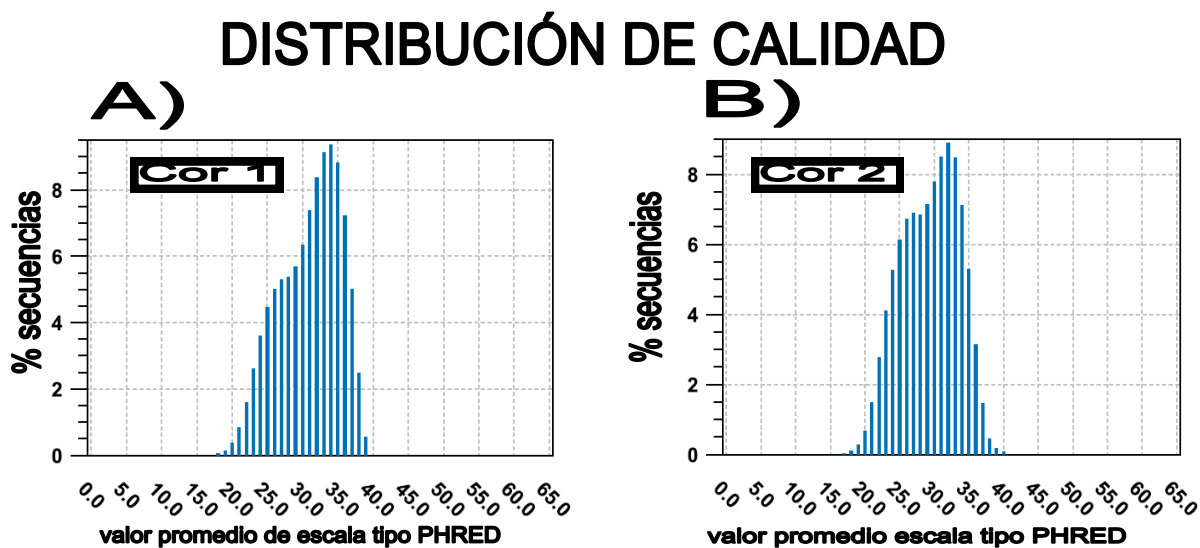


Figura 23. Calidad de las lecturas obtenidas en la corrida 1 y 2. En el eje X el valor promedio de la escala tipo PHRED y en el eje Y el porcentaje de las secuencias. En la imagen A se observan los resultados para las secuencias obtenidas en la corrida 1, mientras que en la imagen B se observan los obtenidos en la corrida 2.

VIII.8 Evaluación de las lecturas capturadas.

Los pasos experimentales realizados para la implementación del *SeqGMOCap* fueron siete: diseño y elaboración del *SeqGMOCap* (Romero, 2012), diseño y elaboración de bibliotecas de matrices, hibridación, cuantificación, emPCR SV, emPCR LV y corrida de secuenciación, los cuales se optimizaron y se comprobó que el proceso experimental fue adecuado (ANEXO I); sin embargo para corroborar que las secuencias capturadas correspondieron a los elementos transgénicos, se realizó un análisis bioinformático preliminar en el cual se determinó la identidad de las secuencias capturadas (Tabla 4). Los resultados preliminares obedecen a que, paralelo al presente estudio se cuenta con un convenio de colaboración con Unidad Universitaria de Apoyo Bioinformático de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), para el desarrollo de nuevas herramientas de análisis bioinformático que permitirán fortalecer los análisis que se produzcan a partir de la implementación del sistema de *SeqGMOCap* de forma rutinaria en el CNRDOGM.

Los resultados mostrados a continuación proceden del primer mapeo de secuencias generados en ambas corridas. En la Tabla 4 se muestra que de los 61 elementos transgénicos contenidos en la matriz elaborada (ANEXO III Tabla A.6) fueron capturados 38 en ambas corridas, es decir, la captura fue de 62 % para ambos ensayos, sin tomar en cuenta los elementos que sólo se capturaron en alguna corrida de secuenciación. Al contar todos los elementos que se lograron capturar (47), se obtuvo una captura del 77 %.

Tabla 4. Resultados preliminares del análisis bioinformático de los ensayos realizados

Promotor	Transgen	Terminador	Otros
e35S	NptII	orf25	Intron-hsp70-leader
Ract	cry1A.105	tahsp 17	Ori322
35S	maize epsps	E9-pea	Ori-pUC
cab1ab-upstream	pmi	tr7	Intron-ubi
FMV	cry3A-mod	nos	rbcS-transfer peptide
Peroxidase	DREB1A	35S	Intron-H3.III-a.thaliana
MTL	uidA	H4-a.thaliana	CTP2
ubi-Zm	cp4-epsps	beta-conglycinin	Ract1
FMV/TSF1	bar	T-pinII	CTP4
tsf-1	Cry2Ae		
35S/ACT8	aad		
5' leader of chlorophyll a/b-binding protein	PAT		
H4-a.thaliana	granule bound starch synthase		
Nos	lacZ		
modified-FMV	cry38b1		
antisense-granule bound starch synthase	bla		
Ract1	cry1F		
4AS1	cry34Ab1		
rd29	cry35Ab1		
mas2	cry1Ab		
enhancer-4OCS	vip3A		
	cry1AC		

ACOTACIÓN:

capturado en Cor 1 y Cor 2
capturado sólo en Cor 1
capturado sólo en Cor 2
no capturado

Sin embargo, los resultados del análisis bioinformático realizado hasta el momento muestran que cuatro promotores, seis transgenes, dos terminadores y otros dos elementos transgénicos no se lograron capturar en ningún ensayo, lo cual se puede atribuir a que no todos los eventos transgénicos tienen el mismo tamaño y por lo tanto, la construcción no se logró amplificar completamente después de la captura, o bien la cantidad de lecturas producidas es baja y por lo cual no se logra observar su captura.

Los elementos transgénicos capturados en los ensayos indicaron que las condiciones experimentales influyeron en la captura, ya que se observó que en el primer ensayo (Cor 1), se capturaron diferentes elementos transgénicos (Tabla 4) a los capturados en el segundo ensayo (Cor 2); evidenciando de esta manera que los factores de tamaño del elemento transgénico, proporción del elemento en el genoma y cpb pueden afectar los ensayos experimentales.

Al comparar el rendimiento en la captura de secuencias obtenida utilizando el sistema implementado en el presente estudio (*SeqGMOCap*) contra los sistemas de captura comerciales, se observó que con el sistema *SeqGMOCap* capturó un menor porcentaje (77 %), mientras que con los rendimientos de los sistemas comerciales para exoma de humano y ratón se logra capturar más del 90 % de los genes analizados (Agilent Technologies Inc., 2011). No obstante, es importante señalar que el sistema de captura fue diseñado en el CNRDOGM al incluir secuencias de diversas especies en un mismo sistema, lo cual hasta el momento no se había explorado. El porcentaje de captura, así como el número de elementos transgénicos capturados se pueden incrementar al disminuir el número de elementos transgénicos presentes en la muestra, como se espera que ocurra en los ensayos de rutina en el CNRDOGM, ya que en este estudio se analizaron 30 eventos GM en una misma muestra (matriz), es decir se reto el sistema para capturar el máximo de secuencias posibles. Sin embargo, al encontrarse con un número menor de eventos GM se espera que la captura sea mayor ya que se aumenta la probabilidad de capturar toda la construcción, se reduce la

competencia en la hibridación y disminuye la influencia de los factores experimentales mencionados.

IX. CONCLUSIONES

- ✓ Se diseñó y elaboró la matriz M2 con la presencia de 30 eventos GM de cinco diferentes especies (algodón, maíz, soya, trigo y papa), a partir de la cual se logró generar una biblioteca con calidad adecuada para el desarrollo del estudio.
- ✓ Los ciclos óptimos para la amplificación de la biblioteca fueron 17 para antes de la hibridación y 14 para después de ella.
- ✓ Se logró evaluar el comportamiento de diferentes concentraciones por perla (cpb) de las bibliotecas capturadas y amplificadas por medio de su titulación en emPCR SV y se obtuvo que un cpb de 0.5 es el estándar ya que resultó ser adecuado y repetible para la emPCR LV.
- ✓ Los parámetros de cantidad de lecturas obtenidas, distribución de tamaño, contenido G-C, contribución por nucleótido, contenido de bases ambiguas, nivel de duplicación de las lecturas y calidad de las lecturas indicaron que las secuencias obtenidas son confiables y adecuadas.
- ✓ Con base en los hallazgos encontrados, se concluyó que el proceso experimental del sistema de captura de ADN de OGM (*SeqGMOCap*) para el sistema de pirosecuenciación en la plataforma *454 GS FLX* fue adecuado debido a que se logró observar la captura de los elementos transgénicos esperados.

X. PERSPECTIVAS

- Con los resultados del presente estudio se contará con un protocolo optimizado y con sólo adicionar las secuencias de otros eventos GM de interés se logrará ampliar la capacidad de análisis de OGM. Estos resultados también servirán en el trabajo de la caracterización de los diferentes eventos GM que el CNRDOGM analiza
- Con la metodología obtenida, el CNRDOGM contará con una herramienta más en el análisis de OGM para coadyuvar en la toma de decisiones en materia de Bioseguridad.
- Para conocer la eficiencia y sensibilidad del SeqGMOCap primero se deberá determinar la proporción de los eventos GM en el genoma del OGM a analizar.

XI. REFERENCIAS

- ♣ Agilent Technologies Inc., 2011. SureSelect TARGET ENRICHMENT from sample to analysis. [En línea] (Actualizado al 30 de Julio de 2011). Disponible en: <http://www.youdobio.com/wp-content/uploads/2011/08/SureSelect-Brochure-5990-8747EN.pdf> [Último acceso Mayo 2013]
- ♣ Agilent Technologies Genomics, 2012. *Agilent SureSelect Target Enrichment*. [En línea] (Actualizado al 2012). Disponible en: <http://www.genomics.agilent.com> [Último acceso el 11 de enero de 2013]
- ♣ AgroBIO, 2012. Marco Regulatorio de los Organismos Genéticamente Modificados (OGM) destinados a la agricultura. [En línea] (Actualizado al 2012). Disponible en: http://www.agrobiomexico.org.mx/publicaciones/Marco_Regulatorio.pdf [Último acceso el 23 de enero de 2013]
- ♣ AgroBIO México, 2012. *ABC de la Biotecnología Agrícola*. [En línea] (Actualizado al 2012). Disponible en: www.agrobiomexico.org.mx/publicaciones/ABC_Biotecnologia.pdf [Último acceso el 23 de enero de 2013]
- ♣ Alfonsín, P., Abuín, M., Fernández-López, J., 2004. Caracterización de la variabilidad genética de una población de mejora de *Juglans regia* L. *Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria: Sistema de Recursos Forestales*, 13(3), pp. 518-526.
- ♣ Álvarez L., Gloria M., 2012. *Taller Intersecretarial sobre Investigación en Bioseguridad y Desarrollo en Biotecnología con OGMs autorizados por el Gobierno Federal. "Legislación y Políticas Públicas en Biotecnología y Bioseguridad en México"*. [Material en línea]. Disponible en: <http://www.cibiogem.gob.mx/Eventos/Documents/Taller-Intersecretarial/CIBIOGEMGMAL3ago2012a.pdf> [Último acceso el 22 de enero de 2013]
- ♣ Bustin, S., 2009. *The PCR Revolution. Basic Technologies and Applications*. Cambridge: Cambridge University Press.
- ♣ Brown, T., 2007. *Genomes 3*. Nueva York: Garland Science.
- ♣ Castelán, H. G., 2011. *Búsqueda de cuasiespecies virales en el gen na del virus de influenza por medio de pirosecuenciación masiva paralela*. TESIS Licenciatura. Cuautitlán Izcalli: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- ♣ Cheliak, W. M., 1993. Clone identification. En: *Clonal Forestry I. Genetics and Biotechnology*. Ed. By M. R. Ahuja and W. J. Libby. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 107-164.
- ♣ CIBIOGEM Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados, 2011. *Informe Anual de la Situación General sobre la Bioseguridad en México*. [En línea] (Actualizado al 2011). Disponible en: <http://www.cibiogem.gob.mx/Sistema->

- Nacional/Documents/Informe-anual-sobre-la-bioseguridad-2011.pdf [Último acceso el 22 de enero de 2013]
- ♣ CIBIOGEM Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados, 2012. *Registro Nacional de Organismos Genéticamente Modificados*. [En línea] (Actualizado al 15 de octubre de 2012). Disponible en: <http://www.cibiogem.gob.mx/OGMs/Paginas/default.aspx> [Último acceso el 28 de noviembre de 2012]
 - ♣ CLCbio, 2013. CLC SEQUENCE VIEWER. [En línea] (Actualizado al 2013). Disponible en: <http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer/> [Último acceso el 4 de febrero de 2013]
 - ♣ Council Directive, 2001. EU Directive 2001/18/EEC on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. Official Journal of the European Communities. No. L. 106El-Kassaby, Y. A., 2000. Effect of forest tree domestication on gene pools. En: *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice*. Ed. Young, A., D, Boshier and T. Boyle. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization (CSIRO). CSIRO Publishing-CABI Publishing, Canberra, Australia 13, pp. 197-213.
 - ♣ Ernani, F. & LeProust, E., 2009. Agilent's SureSelect Target Enrichment System: Bringing Cost and Process Efficiency to Next-Generation Sequencing. *Agilent Technologies*, Marzo 16, 5990-3532EN, pp 1-8.
 - ♣ FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 2002. *Enfoques / 2001. Cultivos genéticamente modificados*. [En línea] (Actualizado a marzo de 2005). Disponible en: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0111sp.htm> [Último acceso 28 de noviembre de 2012]
 - ♣ Garrido, M., Vivas, A., Orjuela, M., 2007. *Búsqueda, identificación, compilación y estructuración de la información de tres especies de uso agrícola: algodón (Gossypium hirsutum L.), maíz (Zea mays L.) y papa (Solanum tuberosum L.) y de sus parientes silvestres para la evaluación de riesgo por introducción, uso o liberación al ambiente de organismos vivos modificados-OVM*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt.
 - ♣ Genotypic Technology PVT LTD, 2009. On-Array DNA Capture. Services using Agilent's SureSelect™ technology Any Organism, Any Next Gen Sequencing platform. *Genotypic genomics simplified*, F001, pp 4-6.
 - ♣ Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., M. LeProust, E., Brockman, W., Fennerll, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., Gabriel, S., Jaffe, D., Lander, E. & Nusbaum, C., 2009.

- Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nature America Inc. Nature Biotechnology*, 27(2), pp. 182-189.
- ♣ Griffiths, K., et al., 2003. *Review of Technologies for Detecting Genetically Modified Materials in Commodities and Food*. Australia: Australian Government Analytical Laboratories (AGAL).
 - ♣ H. Cámara de Diputados, 2012. *Leyes Federales Vigentes*. [En línea] (Actualizado a enero de 2013). Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/index.htm> [Último acceso 23 de enero de 2013]
 - ♣ Hernández, D., 2004. Cámara CCD y Señal de video. **En:** D. Hernández. ed. *Tesis Análisis de la Señal de Video para Interpretar la Ruta de un Robot Rastrero para obtener título de Licenciatura en Ingeniería en Electrónica y Computadoras*. Cholula: Universidad de las Américas Puebla, pp 1-79.
 - ♣ Herrera, D. A., 2012. *GENETICA MODERNA: Técnicas de análisis de ADN*. [En línea]. Disponible en: <http://biologiaytuadn.blogspot.mx/p/tecnicas-de-analisis-de-adn.html> [Último acceso 4 de noviembre de 2012]
 - ♣ Holst, A., et al., 2012. Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials. *Biotechnology Advances*. 30 (2012) Pp. 1318-1335.
 - ♣ Hübner, P., et al., 1999. Detection of genetically modified organisms in food: critical points for quality assurance. *Accreditation and Quality Assurance*, 4 (7), pp 292-298.
 - ♣ Illumina, 2010. *Illumina Sequencing Technology*. [En línea] (Actualizado al 11 de octubre de 2010). Disponible en: http://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf [Último acceso 4 de noviembre de 2012]
 - ♣ JRC:Querci, M. & Jermini, M. & Van den Eede, G., 2007. *Manual del Participante*. Luxemburgo: Comunidades Europeas.
 - ♣ LDBOGM, Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados, diario oficial de la federación, 18 marzo 2005, Ley DOF 18-03-2005. [En línea] (Actualizado al 9 de enero de 2013). Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf> [Último acceso el 11 Enero 2013]
 - ♣ Lennon, N., et al., 2010. A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready barcoded libraries for 454. *Genome Biology*, 11(R15), pp. 1-9.
 - ♣ LifeTechnologies, 2012. *The SOLiD System: Next-Generation Sequencing*. [En línea] (Actualizado a 2012). Disponible en: <http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/solid->

- next-generation-sequencing/de-novo-sequencing.html [Último acceso 4 de noviembre de 2012]
- ♣ LifeTechnologies Corporation, 2012. *How does Semiconductor Sequencing Work?* [En línea] (Actualizado al 2012). Disponible en: <http://es-mx.invitrogen.com/site/mx/es/home/Products-and-Services/Applications/Sequencing/Semiconductor-Sequencing/Semiconductor-Sequencing-Technology/Ion-Torrent-Technology-How-Does-It-Work.html> [Último acceso 4 de noviembre de 2012]
 - ♣ López, M., 2012. *Validación de la metodología para el análisis de algodón genéticamente modificado por medio de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR)*. TESIS Licenciatura. México: Facultad de Química, UNAM.
 - ♣ Luque, J. & Herráez, A., 2006. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud. Madrid: Elsevier-Harcourt. Pp.163-170.
 - ♣ Lübeck, M., 2001. *Detection of genetically modified plants-methods to sample and analyze GMO content in plants and plant products*. [En línea]. Disponible en: http://www.sns.dk/erhvogadm/biotek/REPORT_rev_maj.pdf [Último acceso 23 de enero de 2013]
 - ♣ Maldonado, C., Álvarez, E. y Castellanos, J., (comp.) 2007. *Manual de procedimientos de laboratorio para detección de organismos genéticamente modificados (OGM)*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt.
 - ♣ Mardis, E., 2008. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics*, 24 (3), pp 133-141.
 - ♣ Miesfeld, R., 1999. *Applied Molecular Genetics*. Nueva York: Wiley-Liss.
 - ♣ Mussin, V. 2006. *Organismos Genéticamente Modificados (OGM): Usos Alimentarios*. Buenos Aires: Biblioteca del Congreso de la Nación.
 - ♣ NMX-EC-17025-IMNC, 2000. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración.
 - ♣ Reglamento de la LBOGM, 2009. *Reglamento de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados*. [En línea] (Última reforma publicada DOF 06-03-2009). Disponible en: http://www.cibiogem.gob.mx/Norm_leyes/Documents/Reglamento_LBOGM.pdf [Último acceso 22 de enero de 2013]

- ♣ Reis-Filho, J., 2009. Short communication. Next-generation sequencing. *Breast Cancer Research*, 11 (3). Disponible en: <http://breast-cancer-research.com/supplements/11/S3/S12>
- ♣ Roche, 2008. *Protocolo de Secuenciación*. [En línea] (Actualización al 2008). Disponible en: <http://www.lifesequencing.com/pages/protocolo-de-secuenciacion> [Último acceso 4 de noviembre de 2012].
- ♣ ROCHE, 2013. *Roche Applied Science*. [En línea] (Actualizado al 2013). Disponible en: <http://www.roche-applied-science.com> [Último acceso 4 de febrero de 2013]
- ♣ Roche NimbleGen, Inc., 2013. *SeqCap EZ Library*. [En línea] (Actualizado al 2013). Disponible en: <http://www.nimblegen.com/seqcapez/> [Último acceso 24 de enero de 2013].
- ♣ Romero, S., 2012. *Application of integrated bioinformatic and Next-Gen DNA sequencing methodologies for the analysis and characterization of genetically modified organisms*. TESIS Licenciatura. Cuernavaca: Instituto de Biotecnología IBT, UNAM.
- ♣ Ronaghi, M., 2011. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research*. 1, pp 3-11.
- ♣ SENASICA, 2012. *CNRDOGM*. [En línea] (Actualizado al 23 de noviembre de 2012). Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=2411> [Último acceso 22 de enero de 2013]
- ♣ SENASICA, 2013. *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria*. [En línea] (Actualizado al 2013). Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=1170> [Último acceso 22 de enero de 2013]
- ♣ Tamasi, O., Sammartino, R., Roisinblit, D., Acosta, N., Velich, T., 2003. *Alimentos obtenidos a partir de organismos genéticamente modificados (OGM)*. [En línea] (Actualizado al 2003). Disponible en: <http://www.itescam.edu.mx/principal/sylabus/fpdb/recursos/r72255.PDF> [Último acceso 3 de noviembre de 2012]
- ♣ Tiessen, A., 2009. *Fundamentos y Metodologías Innovadoras para el Mejoramiento Genético de Maíz*. Irapuato: Fundación Ciencia Activa.
- ♣ Vierstraete, A., 1999. Principle of the PCR. [En línea] (Actualizado al 8 de noviembre de 1999). Disponible en: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> [Último acceso 3 de marzo de 2013]
- ♣ Viljoen, G., et al., 2005. *Molecular Diagnostic PCR Handbook*. New York: Springer.
- ♣ Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), 2010. *Definición y usos. ¿Qué es un material de referencia?* [En línea] (Actualizado a noviembre 2010). Disponible en: <http://www.cenam.mx/materiales/defyusos.aspx> [Último acceso 3 de noviembre de 2012]

ANEXO I: RESUMEN DE RESULTADOS

Tabla A.1. Resumen de resultados obtenidos durante el estudio de la implementación del sistema SeqGMOcap.

PASOS EXPERIMENTALES																			
MATRICES	LIBRERÍAS			HIBRIDACIÓN				CUANTIFICACIÓN		emPCR SV	emPCR LV	SECUENCIACIÓN							
	Nebulizado	Nebulizado Purificado	Librerías	Amplificación	Hibridación	Amplificación de captura		qPCR											
M1	√	√	√	X	-	-	-	-	-	-	-	-							
M2	√	√	√	√	Hyb I	X	Hyb I	-	Hyb I	-	Hyb I	-	Hyb I	-	Hyb I	-			
M3	√	√	√	X	-	-	-	-	-	-	-	-							
M4	√	√	√	X	-	-	-	-	-	-	-	-							

(√) Pasa al siguiente paso experimental porque cumple con los parámetros o porque se desea conocer su comportamiento.

(X) No pasa al siguiente paso experimental porque no cumple con los parámetros.

(-) No se realizó el paso experimental con la muestra.

ANEXO II: MARCO LEGAL DE OGM

Los Estados Unidos Mexicanos se rigen por una jerarquía del orden jurídico, Figura A.1. El documento más importante de esta jerarquía es la Constitución Política y con base en ella se dan diferentes acuerdos internacionales para la comercialización de productos y servicios, estos acuerdos son llamados Tratados Internacionales. Para que estos tratados sean adoptados por todo el país, es necesario elaborar leyes que dictaminen las acciones necesarias para cumplir con ellos (Álvarez y Gloria, 2012).



Figura A.1. Jerarquía del Orden Jurídico en México.

Fuente: Álvarez y Gloria, 2012.

Conociendo lo anterior, se tiene en cuenta que la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos indica las garantías individuales así como establece los derechos y obligaciones de todos los mexicanos. En sus Artículos 3 y 4, hace mención del derecho al apoyo a la investigación científica y tecnológica, el derecho a una alimentación nutritiva, suficiente y de calidad, el derecho a proteger la salud y a un medio ambiente sano, esto junto con el desarrollo de la biotecnología moderna, dio lugar a que México adoptara el Protocolo de Cartagena sobre la Seguridad de la Biotecnología o Protocolo de Bioseguridad en 2003. Este Protocolo es un acuerdo internacional en el marco del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Una consecuencia de la adopción de este Protocolo fue la expedición de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados o LBOGM (Álvarez y Gloria, 2012).

Un año más tarde a la expedición de la LBOGM se elaboró el Reglamento de esta Ley para llevar al cumplimiento de las disposiciones de la LBOGM, estableciendo los requisitos y procedimientos a seguir para la solicitud de permisos y autorizaciones para OGM. Cabe destacar que dentro de este Reglamento existe un Régimen de Protección Especial del Maíz, el cual establece disposiciones jurídicas relativas a la bioseguridad para resolver la liberación de maíces GM, evitar la experimentación o liberación de maíces GM con características que impidan o limiten su uso o consumo humano o

animal y ayudar a la conservación de los maíces mexicanos nativos y de especies relacionadas como los “teocintles” (AgroBIO, 2012).

Para cumplir con lo establecido en la Ley de Bioseguridad es necesario establecer un régimen de permisos para la realización de actividades de liberación experimental, programa piloto y comercial de OGM incluyendo la importación de éstos; éste régimen de permisos involucra una serie de análisis y trámites dentro de los cuales se involucra a diversas secretarías de estado como la Secretarías de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), la Secretaría de Salud (SSALUD) y la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad de los Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM).

La CIBIOGEM es un órgano del Poder Ejecutivo Federal que se encarga de establecer las políticas relativas a la seguridad de la biotecnología respecto al uso de los OGM. Este órgano se integra por diferentes secretarías (SAGARPA, SEMARNAT, SSALUD, SEP, SHCP, SE) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y tiene diferentes funciones, entre las cuales destaca promover el establecimiento de un banco de datos sobre la presencia y distribución de especies relacionadas con los OGM que se pudieran liberar, monitorear y evaluar impacto al ambiente y salud humana y animal y notificar las solicitudes de permiso de liberación al ambiente de OGM.

Con la información que presentó en 2012, se conoce que 52, 12 y 33 solicitudes fueron recibidas para cultivos experimentales, comerciales y pruebas piloto de OGM respectivamente, y que, en el 2011 se autorizaron las liberaciones de 79, 4 y 20 de dichos cultivos en diferentes estados del territorio nacional, Figura A.2.

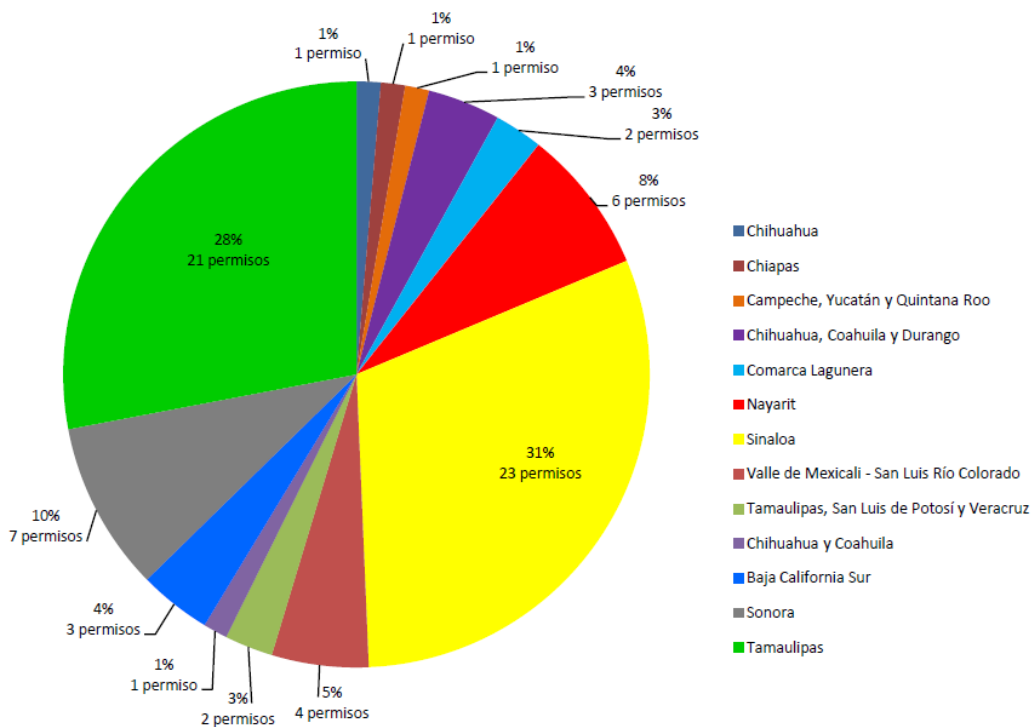


Figura A.2. Porcentaje de permisos otorgados para diferentes cultivos GM por la SAGARPA durante el año 2011.

Fuente: CIBIOGEM, 2011.

La información presentada por la CIBIOGEM indica que los OGM con mayor número de cultivos aprobados para su liberación en el periodo 1988-2005 son algodón, soya y maíz (Tabla A.1).

Tabla A.2. Liberación al ambiente de organismos genéticamente modificados en México de 1988 a 2005, por cultivo durante este periodo.

ORGANISMO	TOTAL	PORCENTAJE
Algodón	141	42.72%
Soya	53	16%
Maíz	34	10.30%
Tomate	26	7.87%
Calabacita	19	5.75%
Melón	7	2.12%
Plátano	7	2.12%
Papa	6	1.81%
Trigo	6	1.81%
Papaya	5	1.51%
Alfalfa	3	0.90%
Jitomate	3	0.90%
Cártamo	2	0.60%
arroz	1	0.30%
canola	1	0.30%
chile	1	0.30%
clavel	1	0.30%
limón	1	0.30%
piña	1	0.30%

Fuente: CIBIOGEM, 2012.

La SAGARPA cuenta con un órgano desconcentrado orientado a realizar acciones de orden sanitario, este es el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y calidad Agroalimentaria (SENASICA), el cual tiene como misión regular, administrar y fomentar las actividades de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria, reduciendo los riesgos inherentes en materia agrícola, pecuaria, acuícola y pesquera, en beneficio de los productores, consumidores e industria; mientras que su visión es ser un servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria transformado, moderno, con un marco jurídico que proporcione seguridad sanitaria y facilite el comercio, con una plataforma técnico-científica consolidada, que de certeza con reconocimiento nacional e internacional (SENASICA, 2013). Así mismo el SENASICA cuenta con el Centro Nacional de Referencia en Detección de Organismos Genéticamente Modificados (CNRDOGM), el cual se instauró debido al aumento en la demanda de análisis para la detección, identificación y cuantificación de OGM por efecto de la última modificación del Reglamento de la LBOGM, en la cual entró en vigor el régimen de protección al maíz y con esto se ordenó el desarrollo de laboratorios para la detección, identificación y cuantificación del maíz GM (Reglamento de LBOGM, 2009).

El CNRDOGM tiene la misión de conducir actividades para detectar, identificar y cuantificar, así como secuenciar OGM de especies vegetales, animales, acuícolas y microorganismos, relacionadas con la utilización confinada, liberación al ambiente en etapa experimental, programa piloto y comercial. Su visión es ser un Centro Nacional de Referencia en Detección de OGM con personal técnico altamente calificado con un programa permanente de calidad y con posicionamiento como una entidad acreditada y certificada nacional e internacionalmente ante los organismos competentes (SENASICA,2012).

Este Centro cuenta con personal técnico altamente calificado y equipo especializado para la detección, identificación y cuantificación de secuencias GM mediante las técnicas de PCR en tiempo real (qPCR) y PCR digital (dPCR), así como para realizar actividades de secuenciación de nueva generación (NGS).

Actualmente el CNRDOGM realiza análisis de OGM en semillas, hojas y granos de algodón, soya y maíz a fin de detectar, identificar, cuantificar y secuenciar la presencia de características como la resistencia a plagas, tolerancia a herbicidas o resistencia a sequía en muestras de cultivos de interés agroalimentario.

El CNRDOGM se encuentra bajo el Sistema de Gestión de Calidad NMX-EC-17025-INMC-2006 (ISO/IEC 17025:2005) desde el 12 de diciembre de 2011; esta acreditación es otorgada por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA) para los laboratorios que cumplen los “Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración” con los cuales se asegura que los resultados emitidos son competentes, imparciales y confiables.

La SAGARPA instauró al CNRDOGM como una entidad de referencia en el análisis de OGM que genera información técnica para coadyuvar con la toma de decisiones en materia de bioseguridad que esta Secretaría requiere para la aplicación de la LBOGM, su reglamento y el Régimen Especial de Protección al Maíz. Gracias a las políticas de calidad que el Centro maneja y en conjunto con la tecnología de vanguardia que posee y los procesos de validación que constantemente desarrolla, es capaz de llevar a cabo la detección de OGM para determinar si existe la presencia o no de un cultivo GM ilegal en el territorio nacional, la identificación del cultivo GM para establecer las medidas de bioseguridad que deberá implementar la SAGARPA para salvaguardar la sanidad e inocuidad de los alimentos y la secuenciación junto con el análisis bioinformático para coadyuvar con los actos de autoridad y las actividades de inspección y monitoreo para la búsqueda de cultivos GM ilegales que la SAGARPA realiza en el campo. Cabe resaltar la importancia de estos análisis genéticos, gracias a ellos se han implementado un total de 6 dispositivos de bioseguridad en diferentes estados del país.

ANEXO III: INFORMACIÓN ADICIONAL PARA LA METODOLOGÍA

Ecuación 1: $C_2 = \frac{C_1 \cdot V_1}{V_2}$

Donde C_1 es la concentración de ADN de cada MR en [ng/ μ L],
 V_1 es el volumen que se toma del ADN de cada MR para realizar la dilución 1:25, se ocupó 1 μ L para fines prácticos,
 C_2 es la concentración a determinar de la dilución 1:25 de cada MR en [ng/ μ L],
 V_2 es el volumen final de la dilución 1:25, se ocupó 25 μ L para fines prácticos.

Ecuación 2: $V_A = \frac{17 \text{ ng} \cdot E}{C_2}$

Donde V_A es el volumen correspondiente a 17 ng de ADN por evento del MR evaluado en [μ L],
 E es el número de eventos que contiene el MR evaluado,
 C_2 es la concentración determinada con la ecuación 1 de la dilución 1:25 del MR evaluado en [ng/ μ L],

Ecuación 3: $V_B = \frac{34 \text{ ng} \cdot E}{C_2}$

Donde V_B es el volumen en [μ L] correspondiente a 34 ng de ADN por evento del MR evaluado,
 E es el número de eventos que contiene el MR evaluado,
 C_2 es la concentración [ng/ μ L] determinada con la ecuación 1 de la dilución 1:25 del MR evaluado.

Ecuación 4: $V_1 = \frac{C_2 \cdot V_2}{C_1}$

Donde C_1 es la concentración de la biblioteca capturada y amplificada cuantificada por PCR en tiempo real (qPCR),
 V_1 corresponde al volumen en μ L de la biblioteca capturada y amplificada,
 C_2 es la concentración de la WS, $1 \cdot 10^5$ copias/ μ L y
 V_2 corresponde al volumen total en μ L de la WS que se desea preparar.

Ecuación 5: $\text{Volumen de WS } (\mu\text{L}) = \frac{(\text{cpb}) \cdot (2.4 \cdot 10^6 \text{ perlas})}{(\text{concentración de WS en } \frac{\text{copias}}{\mu\text{L}})}$

Ecuación 6: $\text{Perlas recuperadas} = \frac{(\text{Promedio de partículas}) \cdot (\text{Masa en mg})}{1000}$

Donde $\text{Perlas recuperadas}$ corresponde al número de perlas recuperadas experimentalmente,
 $\text{Promedio de partículas}$ corresponde al promedio de los dos conteos de partículas de las perlas recuperadas obtenidos del contador de partículas,
 Masa en mg corresponde a la masa multiplicada por 1000 de los tubos con las perlas recuperadas y
 1000 corresponde al factor para obtener las perlas recuperadas experimentalmente.

Ecuación 7: $\% \text{ recuperación} = \frac{\text{Perlas recuperadas}}{\text{Perlas iniciales}} \cdot 100$

Donde % recuperación corresponde al porcentaje de las perlas recuperadas respecto a las perlas iniciales,
 $\text{Perlas recuperadas}$ corresponde al número de perlas recuperadas experimentalmente,
 Perlas iniciales corresponde al número de perlas que, teóricamente, fueron las iniciales en emPCR SV fue de 2.4×10^6 perlas y en emPCR LV fue de 35×10^6 perlas y
 100 corresponde al factor para obtener en porcentaje las perlas recuperadas experimentalmente.

$$\text{Ecuación 8: } \text{Perlas enriquecidas} = \frac{(\text{Promedio de partículas}) \times (\text{Masa en mg})}{1000}$$

Donde *Perlas recuperadas* corresponde al número de perlas recuperadas experimentalmente,
Promedio de partículas corresponde al promedio de los dos conteos de partículas de las perlas recuperadas obtenidos del contador de partículas,
Masa en mg corresponde a la masa multiplicada por 1000 de los tubos con las perlas recuperadas y 1000 corresponde al factor para obtener las perlas recuperadas experimentalmente.

$$\text{Ecuación 9: } \% \text{ enriquecimiento} = \frac{\text{Perlas enriquecidas}}{\text{Perlas iniciales}} * 100$$

Donde *% enriquecimiento* corresponde al porcentaje de las perlas enriquecidas respecto a las perlas iniciales,
Perlas enriquecidas corresponde al número de perlas enriquecidas experimentalmente,
Perlas iniciales corresponde al número de perlas que, teóricamente, fueron las iniciales en emPCR SV fue de 2.4×10^6 perlas y en emPCR LV fue de 35×10^6 perlas y
 100 corresponde al factor para obtener en porcentaje las perlas enriquecidas experimentalmente.

$$\text{Ecuación 10: } \text{Volumen de WS } (\mu\text{L}) = \frac{(\text{cpb}) \times (35 \times 10^6 \text{ perlas})}{(\text{concentración de WS en } \frac{\text{copias}}{\mu\text{L}})}$$

$$\text{Ecuación 11: } \text{Volumen a tomar} = \frac{2'000,000}{\text{Total de perlas enriquecidas}}$$

Donde *Volumen a tomar* corresponde al volumen que se tomará de las perlas enriquecidas obtenidas en emPCR LV,
 2'000,000 corresponde al número de pozos que se pretende llenar en la placa de secuenciación y
Total de perlas enriquecidas corresponde al número de perlas que, experimentalmente, fueron las enriquecidas y que se obtuvieron de la emPCR LV.

Tabla A.3. Cálculos para determinar la concentración de la biblioteca de una muestra por medio de qPCR.

Dilución de biblioteca	Concentración calculada (copias/ μL)			Promedio (copias/ μL)	Tamaño ajustado (copias/ μL)	Concentración de la biblioteca no diluida (copias/ μL)
1:500	A1	A2	A3	A	$A * \frac{460}{\text{Tamaño promedio}} = W$	$W * 500$
1:1000	B1	B2	B3	B	$B * \frac{460}{\text{Tamaño promedio}} = X$	$X * 1000$
1:2000	C1	C2	C3	C	$C * \frac{460}{\text{Tamaño promedio}} = Y$	$Y * 2000$
1:4000	D1	D2	D3	D	$D * \frac{460}{\text{Tamaño promedio}} = Z$	$Z * 4000$

Tabla A.4. Descripción de los eventos GM usados para la elaboración de las matrices 1, 2, 3 y 4.

Especie	Evento GM	Descripción del evento GM:
<i>Zea mays</i>	MON-00603-6	Resistente o tolerante al herbicida glifosato
	DAS-01507-1	Resistente a insectos lepidópteros
	MON-87460-4	Resistente a la sequía
	MON-88017-3	Tolerancia a herbicida glifosato y resistencia al gusano de raíz de maíz
	MON-89034-3	Resistencia a lepidópteros y coleópteros
	DAS-59122-7	Tolerancia a ciertos coleópteros y a herbicida glifosato de amonio
	MON-0021-9	Resistencia a herbicida glifosato
	SYN-BT011-1	Tolerancia a herbicida glufosinato-amonio y tolerancia a insectos (lepidópteros)
	SYN-IR162-4	Resistente a plagas de lepidópteros
	SYN-IR604-5	Resistente a insectos coleópteros y protección contra gusano de raíz
	MON-00810-6	Resistencia a larvas de lepidópteros
MON-00863-5	Protección contra gusano de raíz	
<i>Triticum aestivum</i>	rd29a-DREB1A	Tolerancia a congelamiento, sal y sequía
	lip9-DREB1A	Resistencia al frío y sequía
	osnac6-DREB1A	Resistencia a sequía, frío y alta concentración de sal
	ubi-DREB1A	Resistencia a sequía
	ubi-SnRK2C	Resistencia a sequía
	ubi-AtGol52	Resistencia a sequía
	osnac6-osnac6	Resistencia a sequía
<i>Gossypium hirsutum</i>	MON-15985-7	Protección contra insectos / Resistencia a insectos (lepidópteros)
	MON-88913-8	Tolerancia a herbicidas (glifosato)
	BCS-GH004-7	(T304-40) Resistencia a insectos (¿Tolerancia a herbicidas?)
	BCS-GH005-8	(GHB119) Tolerancia a herbicidas, glifosato (¿resistencia a insectos?)
	BCS-GH002-5	(GHB614) Tolerancia a herbicidas, glufosinato de amonio
	MON-531-6	Resistencia a larvas de lepidópteros y protección contra insectos / Resistencia a insectos (lepidópteros) y a kanamicina
	MON-1445-2	Tolerancia a herbicidas (glifosato)
	DAS-24236-5	Tolerancia a herbicida glifosato-amonio y protección contra insectos / Resistencia a insectos (lepidópteros) y tolerancia a herbicida (glufosinato de amonio)
	DAS-21023-5	Tolerancia a herbicida glifosato-amonio y protección contra insectos / Resistencia a insectos (lepidópteros) y tolerancia a herbicida (glufosinato de amonio) / Resistencia a insectos (lepidópteros) y tolerancia a herbicidas (glufosinato de amonio)
<i>Glycine max</i>	MON-04032-6	Tolerancia a herbicida glifosato
<i>Solanum tuberosum</i>	EH92-527-1	Aumento de amilopectina en fécula

Tabla A.5. Eventos GM que contiene cada material de referencia usado para la elaboración de las matrices 1, 2, 3 y 4.

Especie	No. de material de referencia	Evento
<i>Zea mays</i> (maíz)	167	MON-00603-6
	149	DAS-01507-1
	46	MON-87460-4
	51	MON-88017-3 X MON-89034-3
	164	DAS-59122-7
	118	MON-0021-9
	121	SYN-BT011-1
	122	SYN-IR162-4
	125	SYN-IR604-5
	130	MON-00810-6
	269	MON-00863-5
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	126	rd29a-DREB1A
	155	lip9-DREB1A
	156	osnac6-DREB1A
	157	ubi-DREB1A
	158	ubi-SnRK2C
	159	ubi-AtGol52
	160	osnac6-osnac6
<i>Gossypium hirsutum</i> (algodón)	134	MON-15985-7 X MON-88913-8
	135	BCS-GH004-7 X BCS-GH005-8 X BCS-GH002-5
	181	MON-531-6
	183	MON-1445-2
	279	DAS-24236-5 X DAS-21023-5
<i>Glycine max</i> (soya)	258	MON-04032-6
<i>Solanum tuberosum</i> (papa)	282	EH92-527-1

X: evento apilado.

Tabla A.6. Elementos transgénicos por evento GM que contiene cada material de referencia usado para la elaboración de las matrices 1, 2, 3 y 4.

Especie	MR	Identificador único del OGM	Evento de transformación	promotor	transgen	teminador	otros	Referencias
maíz (<i>Zea mays</i>)	167	MON-00603-6	NK603	Rice actin 1 gene p / CaMV enhanced 35S p	5-enolpyruvylshikimate-3- phosphate synthase (proteína CP4 EPSPS)	Nopaline Synthase Gene t	Rice actin 1, intron / Hsp70 intron / chloroplast transit peptide 2	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14776
	149	DAS-01507-1	TC1507	Ubiquitin gene p / CaMV 35S p	Cry1F / phosphinothricin N- acetyltransferase gene	ORF25 PolyA t sequence / CaMV 35S t	NE	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14841
	46	MON-87460-4	MON 87460	Rice actin 1 gene p / CaMV 35S p	Cold shock protein gene / Neomycin phosphotransferase II	Nopaline Synthase Gene t	transcript 7 gene 3' untranslated region / Ti plasmid left border repeat/ Ti plasmid right border repeat / lonxP recombination site / Rice actin 1, intron /	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=103066
	51	MON-89034-3 X MON-88017-6	MON89034 X MON88017	Rice actin 1 gene p / CaMV Enhanced 35S p / FMV 35S p	5-enolpyruvylshikimate-3- phosphate synthase / Cry3Bb1 / Cry1A.105 / Cry2Ab2	Nopaline Synthase Gene t / t of the wheat heat shock protein 17.3	5' untranslated leader from chlorophyll a/b-binding protein / Rice actin 1, intron / Hsp70 intron / chloroplast transit peptide 2 / Transit peptide and first intron of Rubisco SSU	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=46299
	164	DAS-59122-7	59122	Ubiquitin gene p / Peroxidase gene p / CaMV 35S p	Cry34Ab1 / Cry35Ab1 / Phosphinothricin N- acetyltransferase gene	Proteinase inhibitor II gene t / CaMV 35S t	NE	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=15165
	118	MON-0021-9	GA21 (G21)	Rice actin 1 gene p	5-enolpyruvylshikimate-3- phosphate synthase	Nopaline Synthase Gene t	Rice actin 1, intron / Optimized Transit Peptide	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14794
	121	SYN-BT011-1	Bt 11 (X4334CBR, X4734CBR)	CaMV 35S p	Cry1Ab / Phosphinothricin N- acetyltransferase gene	Nopaline Synthase Gene t	Alcohol Dehydrogenase 1, intron 6 y 2	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14797
	122	SYN-IR162-4	MIR162	Ubiquitin gene p	Vegetative insecticidal protein 3Aa20 / Phosphomannose Isomerase gene	CaMV 35S t / Nopaline Synthase gene t	Phosphoenolpyruvate carboxylase, intron 9	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=100885
	125	SYN-IR604-5	MIR604	Metallothionein-like gene p / Ubiquitin gene p	mCry3A / Phosphomannose Isomerase gene	Nopaline Synthase Gene t	Ubiquitin Intron 1	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=15105
	130	MON-00810-6	MON810	CaMV Enhanced 35S p	Cry1Ab	NE	Hsp70 intron	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14750
	269	MON-00863-5	MON863	CaMV 35S p / CaMV 35S p plus four repeats pf activating sequence	Neomycin Phosphotransferase II / Cry3Bb1	Nopaline Synthase Gene t / t of the wheat heat shock protein 17.3	Rice actin 1, intron / 5' untranslated leader from chlorophyll a/b-binding protein (entre p e intron)	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=14778

Tabla A.6 (continuación). Elementos transgénicos por evento GM que contiene cada material de referencia usado para la elaboración de las matrices 1, 2, 3 y 4.

Especie	MR	Identificador único del OGM	Evento de transformación	promotor	transgen	terminador	otros	Referencias
<i>trigo</i> (<i>Triticum aestivum</i>)	126	rd29a-DREB1A	NE	CaMV 35S p	DREB1A: dehydration responsive element binding	NE	NE	http://pcp.oxfordjournals.org/content/45/3/346.full
	155	lip9-DREB1A	NE	CaMV 35S p	DREB1A	NE	NE	http://pcp.oxfordjournals.org/content/45/3/346.full
	156	osnac6-DREB1A	NE	CaMV 35S p	DREB1A	NE	NE	http://pcp.oxfordjournals.org/content/45/3/346.full
	157	ubi-DREB1A	NE	CaMV 35S p	DREB1A	NE	NE	http://pcp.oxfordjournals.org/content/45/3/346.full
	158	ubi-SnRK2C	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	159	ubi-AtGol52	NE	NE	NE	NE	NE	NE
	160	osnac6-osnac6	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<i>algodón</i> (<i>Gossypium hirsutum</i>)	134	MON-88913-8 X MON-15985-7	88913 X 15985 (MON88913 X MON 15985)	FMV 35S p / Elongation factor EF-1alpha p/ Actin 8 promoter/ CaMV Enhanced 35S p	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 0.00 kb / Cry2Ab2 0.00 kb / Cry1Ac 0.00 kb / Neomycin Phosphotransferase II 0.00 kb / Beta-glucuronidasa 0.00 kb	rbcS-E9 gene t / Nopaline Synthase Gene t / a' subunit of beta-conglycinin gene t	Elongation factor EF-1alpha Leader / Actin 8 Leader / HSP 70 5' untranslated leader sequence/ Elongation factor EF-1alpha Intron 1 / Actin 8 Intron 1 / Chloroplast transit peptide 2	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=1521 5
	135	BCS-GH002-5 X BCS-GH004-7 X BCS-GH005-8	GHB614 X T304-40 X GHB119	Histone H4 gene p / 5' e1 p / CaMV 35S p / XYZ gene p / CaMV 35S p	Double Mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 1.34 kb / Cry1Ab 1.85 kb, Ps7s7 1.04 kb / Bialaphos resistance gene 0.55 kb / Cry2Ae 1.90 kb	Nopaline Synthase Gene t / CaMV 35S t	Histone H4 gene 3'UTR / 3'UTR and terminator of NADP-malic enzyme 1 gene / 5'untranslated leader of chlorophyll a/b-binding protein / Histone H3 Gene II intron 1 / optimized transit peptide / rbcS Transit Peptide	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=1046 49
	181	MON-00531-6	531	CaMV Enhanced 35S p / CaMV 35S p	Cry1Ac 3.50 kb / Neomycin Phosphotransferase II 0.79 kb	a'subunit of beta-conglycinin gene t / Nopaline Synthase Gene t	NE	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=1477 5
	183	MON-01445-2	1445 (MON1445)	FMV 35S p / CaMV 35S p	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase 1.36 kb / Neomycin Phosphotransferase II 0.79 kb	rbcS-E9 gene t / Nopaline Synthase Gene t	Chloroplast transit peptide 2	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=1488 0
	279	DAS-24236-5 X DAS-21023-5	281-24-236 X 3006-210-23	Ubiquitin gene p, 4ocsAMas2'promoter / 4ocsAMas2' promoter, Ubiquitin gene p	Phosphinothricin N-acetyltransferase gene 0.00 kb, Cry1F 0.00 kb / Cry1Ac 0.00 kb / Phosphinothricin N-acetyltransferase gene 0.00 kb, Cry1Ac	ORF25 PolyA t sequence / ORF25 PolyA t sequence	Ubiquitin Intron 1	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=1510 7

Tabla A.6 (continuación 2). Elementos transgénicos por evento GM que contiene cada material de referencia usado para la elaboración de las matrices 1, 2, 3 y 4.

Especie	MR	Identificador único del OGM	Evento de transformación	promotor	transgen	terminador	otros	Referencias
<i>soya</i> (<i>Glycine max</i>)	258	MON-04032-6	GTS 40-3-2 (40-3-2)	CaMV Enhanced 35S p	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate syntase 1.36 kb	Nopaline Synthase Gene t	Chloroplast Transit Peptide 4	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=1479 6
<i>papa</i> (<i>Solanum tuberosum</i>)	282	BPS-25271-9	EH92-527-1	Granule bound starch synthase gene p	Neomycin Phosphotransferase II	NE	NE	http://bch.cbd.int/database/record.shtml?documentid=1510 0

NE: No Especificado

ANEXO IV: RESULTADOS SUPLEMENTARIOS

Tabla A.7. Descripción del material genéticamente modificado utilizado en la elaboración de las diferentes matrices.

Especie	No. de eventos	Evento	No. de material de referencia	Concentración de ADN de extracción A (ng/μL)	Concentración de ADN de extracción B (ng/μL)
<i>Zea mays</i> (maíz)	12	MON-00603-6	167	96.90	-
		DAS-01507-1	149	129.0	-
		MON-87460-4	46	100.5	88.80
		* MON-88017-3 X MON-89034-3	51	62.50	-
		DAS-59122-7	164	97.50	-
		MON-0021-9	118	91.10	-
		SYN-BT011-1	121	96.00	-
		SYN-IR162-4	122	43.50	-
		SYN-IR604-5	125	118.6	-
		MON-00810-6	130	23.60	-
		MON-00863-5	269	41.50	36.70
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	7	rd29a-DREB1A	126	68.80	98.40
		lip9-DREB1A	155	124.1	133.0
		osnac6-DREB1A	156	110.7	102.6
		ubi-DREB1A	157	117.2	108.3
		ubi-SnRK2C	158	188.2	149.6
		ubi-AtGol52	159	139.7	150.6
		osnac6-osnac6	160	60.60	58.80
<i>Gossypium hirsutum</i> (algodón)	9	* MON-15985-7 X MON-88913-8	134	137.1	142.0
		* BCS-GH004-7 X BCS-GH005-8 X BCS-GH002-5	135	157.8	270.1
		MON-531-6	181	241.7	208.4
		MON-1445-2	183	237.8	231.6
		* DAS-24236-5 X DAS-21023-5	279	54.30	74.60
<i>Glycine max</i> (soya)	1	MON-04032-6	258	54.20	60.00
<i>Solanum tuberosum</i> (papa)	1	EH92-527-1	282	41.50	81.70

(*) Evento GM apilado.

Tabla A.8. Datos para la elaboración de la matriz 1 (M1).

No. de MR	Concentración de ADN (ng/ μ L)	Concentración de ADN en dilución 1:25 (ng/ μ L)	Masa de ADN (ng)	Volumen para obtener masa de ADN (μ L)
167	96.90	3.88	17	4.39
149	129.0	5.16	17	3.29
46	100.5	4.02	17	4.23
51*	62.50	2.50	34	13.60
164	97.50	3.90	17	4.36
118	91.10	3.64	17	4.67
121	96.00	3.84	17	4.43
122	43.50	1.74	17	9.77
125	118.6	4.74	17	3.58
130	23.60	0.94	17	18.01
269	41.50	1.66	17	10.24
126	68.80	2.75	17	6.18
155	124.1	4.96	17	3.42
156	110.7	4.43	17	3.84
157	117.2	4.69	17	3.63
158	188.2	7.53	17	2.26
159	139.7	5.59	17	3.04
160	60.60	2.42	17	7.01
134*	137.1	5.48	34	6.20
135*	157.8	6.31	51	8.08
181	241.7	9.67	17	1.76
183	237.8	9.51	17	1.79
279*	54.30	2.17	34	15.65
258	54.20	2.17	17	7.84
282	41.50	1.66	17	10.24
TOTAL			510	161.51

(*) Material de Referencia con eventos GM apilados.

Tabla A.9. Datos para la elaboración de la matriz 2 (M2).

No. de MR	Concentración de ADN (ng/μL)	Concentración de ADN en dilución 1:25 (ng/μL)	Masa de ADN (ng)	Volumen para obtener masa de ADN (μL)
167	96.90	3.88	34	8.77
149	129.0	5.16	34	6.59
46	100.5	4.02	34	8.46
51*	62.50	2.50	68	27.20
164	97.50	3.90	34	8.72
118	91.10	3.64	34	9.33
121	96.00	3.84	34	8.85
122	43.50	1.74	34	19.54
125	118.6	4.74	34	7.17
130	23.60	0.94	34	36.02
269	41.50	1.66	34	20.48
126	68.80	2.75	34	12.35
155	124.1	4.96	34	6.85
156	110.7	4.43	34	7.68
157	117.2	4.69	34	7.25
158	188.2	7.53	34	4.52
159	139.7	5.59	34	6.08
160	60.60	2.42	34	14.03
134*	137.1	5.48	68	12.40
135*	157.8	6.31	102	16.16
181	241.7	9.67	34	3.52
183	237.8	9.51	34	3.57
279*	54.30	2.17	68	31.31
258	54.20	2.17	34	15.68
282	41.50	1.66	34	20.48
TOTAL			1020	323.02

(*) Material de Referencia con eventos GM apilados.

Tabla A.10. Valores de concentración de ADN de las matrices M1, M2, M3 y M4.

Matriz	Concentración de ADN extraído (ng/μL)	Masa total de ADN (ng)	Volumen (μL)
M1	Ver Tabla A.7	510	161.51
M2	Ver Tabla A.8	1020	323.02
M3	52.1	551	10.0
M4	48.1	734	15.0

Tabla A.11. Resumen de la evaluación de los puntos control obtenidos durante la preparación de bibliotecas.

Matriz	NEBULIZADO		NEBULIZADO PURIFICADO		BIBLIOTECA	
	Tamaño promedio (bp)	Concentración (pg/ μ L)	Tamaño promedio (bp)	Concentración (pg/ μ L)	Tamaño promedio (bp)	Concentración (pg/ μ L)
M1	572	331.51	701	9296.68	887	1362.02
M2	569	761	662	10740.4	854	2408.93
M2-R	514	46689.1	517	9104.76	922	3473.17
M3	548	402.85	545	5492.43	826	800.24
M4	no determinado	no determinado	816	5699.52	834	1294.76

(R) duplicado de M2.

(ND) no determinado.

Tabla A.12. Cuantificación de bibliotecas capturadas y amplificadas por medio de qPCR.

Muestra	Cuantificación de dilución 1 en	Concentración promedio (moléculas/ μ L)	Tamaño ajustado (moléculas/ μ L)	Concentración biblioteca (moléculas/ μ L)
Hyb II	1000	3.70×10^8	2.64×10^8	2.64×10^{11}
	2000	9.95×10^7	7.09×10^7	1.42×10^{11}
	4000	6.61×10^7	4.71×10^7	1.88×10^{11}
Hyb III	500	1.38×10^7	8.62×10^6	4.31×10^9
	1000	4.79×10^6	3.00×10^6	3.00×10^9
	2000	2.22×10^6	1.39×10^6	2.77×10^9
	4000	1.45×10^6	9.10×10^5	3.64×10^9

Tabla A.13. Diluciones previas a la preparación de Solución de Trabajo para emPCR SV.

Bibliotecas capturadas y amplificadas	Hyb II
Concentración inicial (moléculas/μL)	2.64×10^{11}
Dilución para preparar WS	1:500
Concentración de dilución (moléculas/μL)	7.82×10^7
Datos para preparar dilución	1 μ L de bibliotecas de Hyb II 99 μ L de disolución amortiguadora TE
Concentración de WS (moléculas/μL)	1×10^5
Datos para preparar WS	1.5 μ L de dilución 1:500 999.5 μ L de disolución amortiguadora TE

Tabla A.14. Diluciones previas a la preparación de Solución de Trabajo para emPCR LV.

Bibliotecas capturadas y amplificadas	Hyb II	Hyb III
Concentración inicial (moléculas/μL)	2.64×10^{11}	4.31×10^9
Dilución para preparar WS	1:500	1:50
Concentración de dilución (moléculas/μL)	7.82×10^7	8.62×10^7
Datos para preparar dilución	1 μ L de bibliotecas de Hyb II 499 μ L de disolución amortiguadora TE	1 μ L de bibliotecas de Hyb II 49 μ L de disolución amortiguadora TE
Concentración de WS (moléculas/μL)	1×10^7	1×10^7
Datos para preparar WS	97 μ L de dilución 1:500 503 μ L de disolución amortiguadora TE	69.6 μ L de dilución 1:500 530.4 μ L de disolución amortiguadora TE

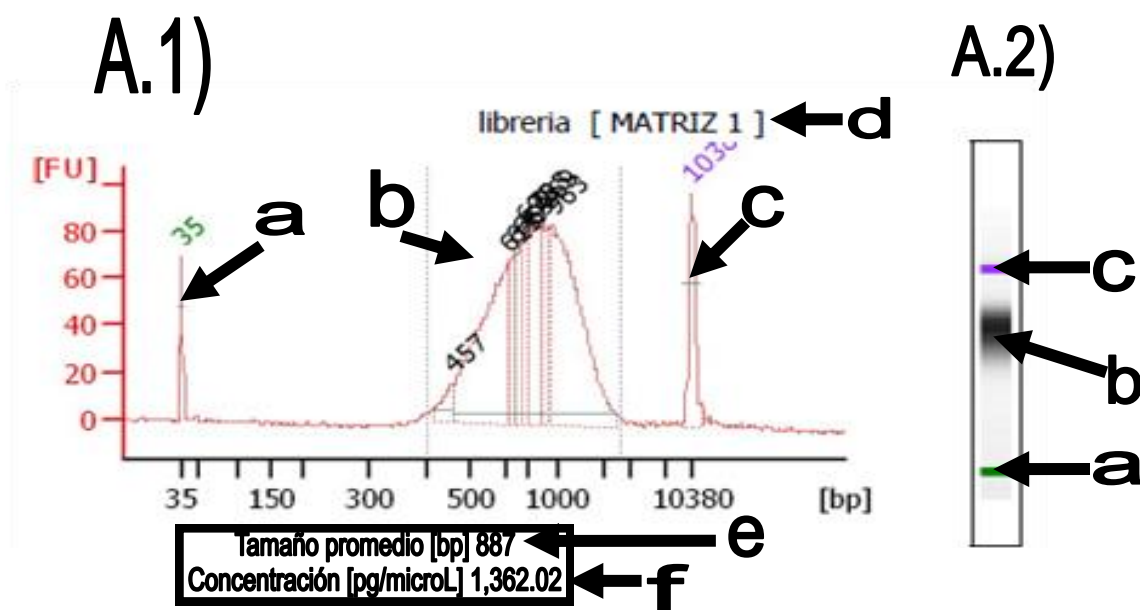


Figura A.3. Ejemplo de resultados de una electroforesis en "chip" arrojados por el equipo Bioanalyzer2100®. Se obtienen dos esquemas: IMAGEN

A.1.muestra una gráfica en la cual se relaciona la cantidad de fluorescencia emitida por la muestra en unidades de fluorescencia (FU) en el eje Y con el tamaño de fragmentos en bp en el eje X. IMAGEN A.2 muestra una electroforesis en "chip" semejante al revelado de un gel electroforético. Los puntos marcados son: [A] que corresponde al marcador control inferior o límite inferior de la detección de fragmentos, en la imagen A.1 se representa como el pico de menor tamaño (35 bp) o el pico que se detecta primero (40-50 s), y en la imagen A.2 se representa como una banda de color verde o la banda inferior definida; [B] que corresponde a la muestra o la zona donde se deberán observar los fragmentos a analizar, en A.1 como uno o varios picos y en A.2 como una o múltiples bandas; [C] que corresponde al marcador control superior o límite superior de la detección de fragmentos, en A.1 se observa como el pico de mayor tamaño (10380bp) o el pico que se detecta al final del análisis (110-120 s), y en A.2 como una banda de color morado o la banda superior; [D] que corresponde al nombre asignado a la muestra; [E] que corresponde al tamaño promedio de los fragmentos de la muestra en pares de bases (bp); [F] que corresponde a la concentración promedio de los fragmentos de la muestra en pg/ μ L. [A] y [C] delimitan la zona de detección de los fragmentos de la muestra, así como son referencia para la medición del tamaño y concentración de los fragmentos; [E] y [F] son los datos principales que se obtienen de estos análisis e indican la calidad y cantidad aproximada de los fragmentos de la muestra, respectivamente.

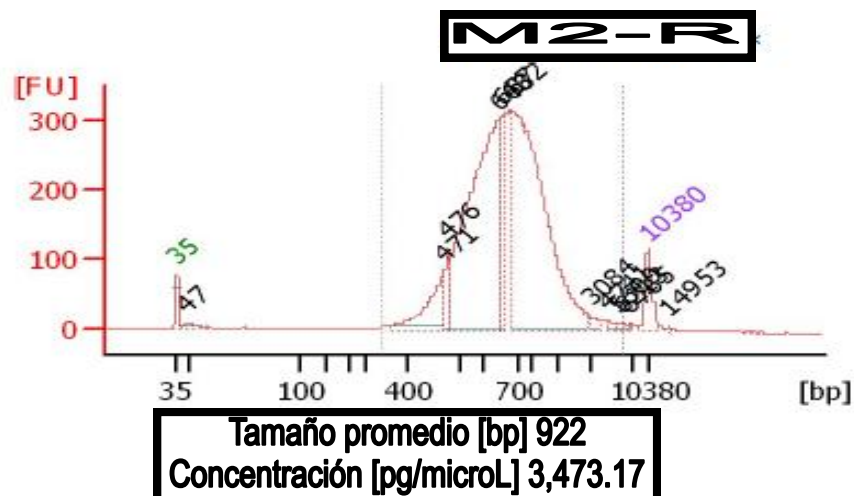


Figura A.4. Evaluación de la calidad del duplicado de la biblioteca de la matriz M2. Se muestran los tamaños promedio de los fragmentos de las bibliotecas obtenidas en pares de bases ([bp]) y la concentración promedio de las bibliotecas en pg/ μ L ([pg/ μ L]). Los marcadores control son los picos de 35 y 10380 bp.

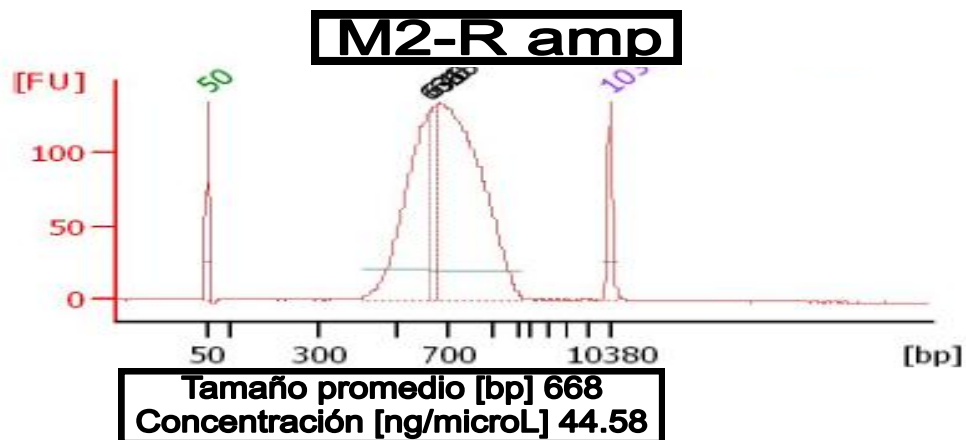


Figura A.5. Evaluación de la calidad de la amplificación del duplicado de la biblioteca de M2. Los marcadores control son los picos de 50 bp y 10380 bp.

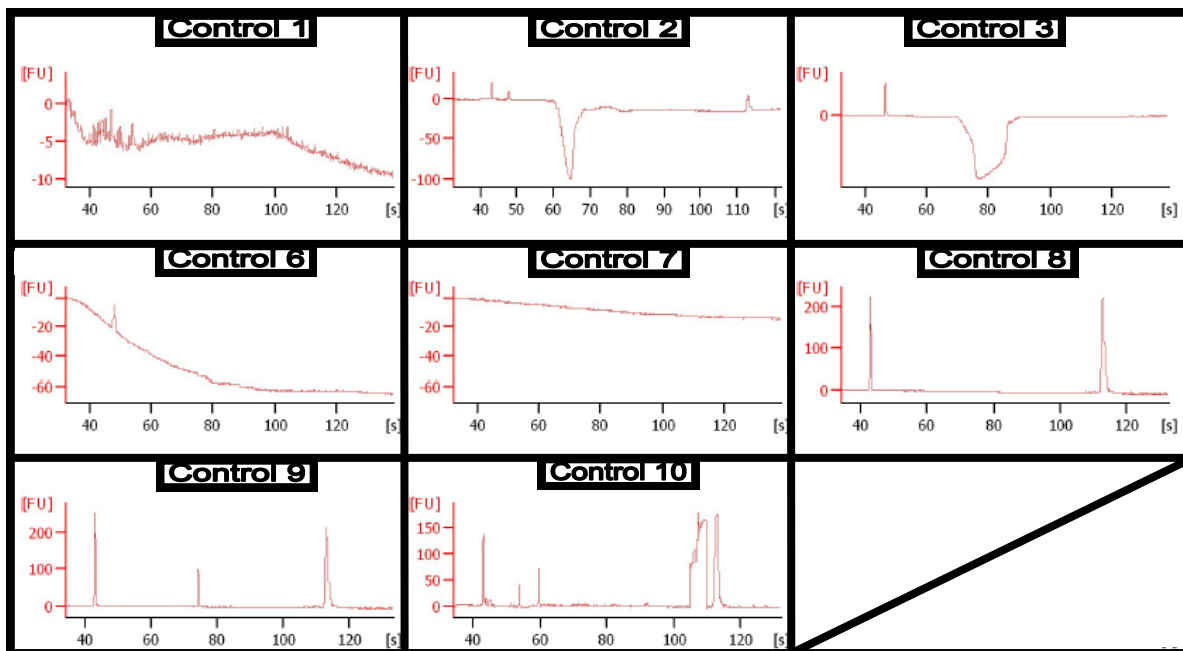


Figura A.6. Evaluación de la calidad de los controles obtenidos en Hyb II. Los marcadores control son los picos de 43 s y 115 s, en las imágenes Control 2, Control 8, Control 9 y Control 10.

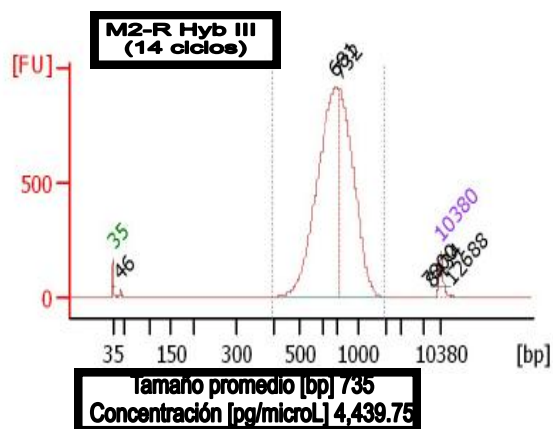


Figura A.7. Evaluación de la calidad de la amplificación de las bibliotecas capturadas obtenidas en Hyb III. Los marcadores control son los picos de 35 bp y 10380 bp. Esta amplificación se realizó con 14 ciclos.

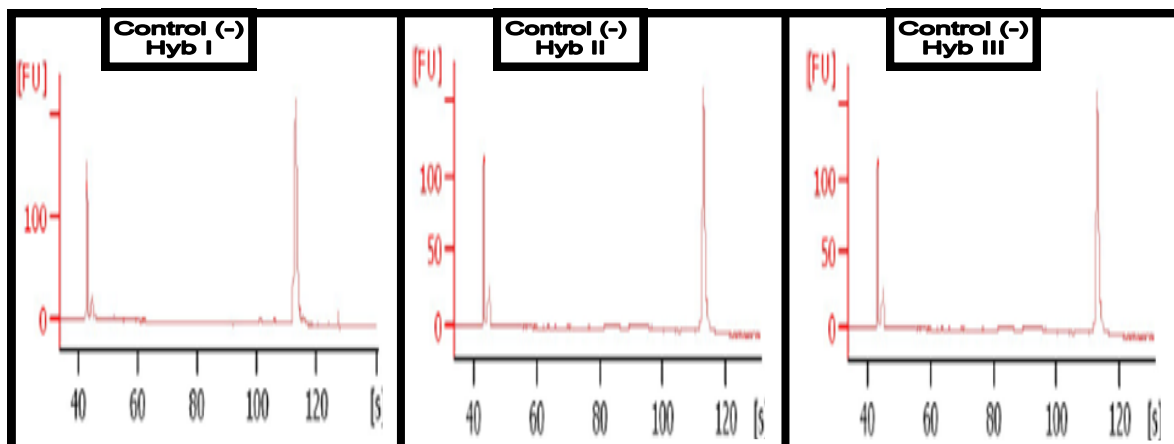


Figura A.8. Evaluación de la calidad de los controles negativos de la amplificación de las bibliotecas capturadas en Hyb I, II y III.

Los marcadores control son los picos de 43 s y 115 s.

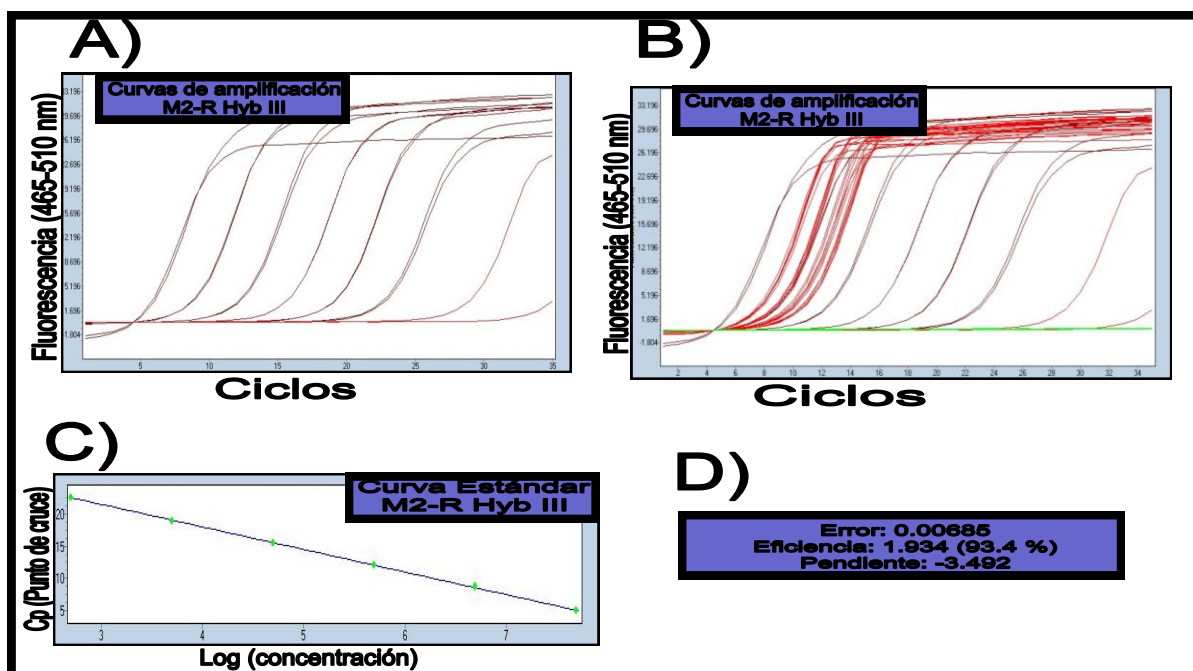


Figura A.9. Curva de calibración para cuantificar bibliotecas capturadas y amplificadas en Hyb III mediante qPCR. En la imagen A se observa la curva de calibración generada a partir de las curvas de amplificación detectadas por la fluorescencia emitida por los estándares. En la imagen B se observa las curvas de amplificación de los estándares y las muestras. En la imagen C se observa la curva de calibración generada a partir del logaritmo de la concentración y el Cp (ciclo de amplificación donde la fluorescencia cambia significativamente) de los estándares. En la imagen D se observan los valores de la curva: error, eficiencia y la pendiente.

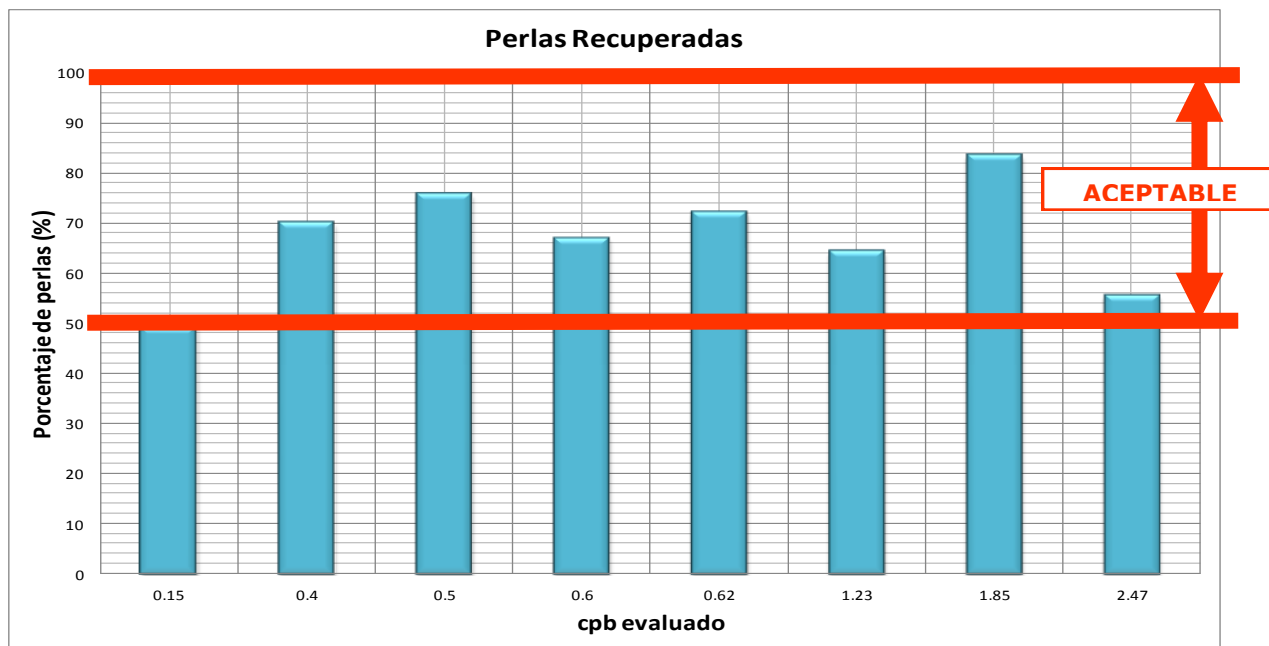


Figura A.10. Titulación por emPCR SV de perlas recuperadas con bibliotecas capturadas y amplificadas de Hyb II. Se valoraron diferentes cpb para conocer la calidad de recuperación usando una solución de trabajo (WS) de concentración 1×10^5 moléculas/ μL .

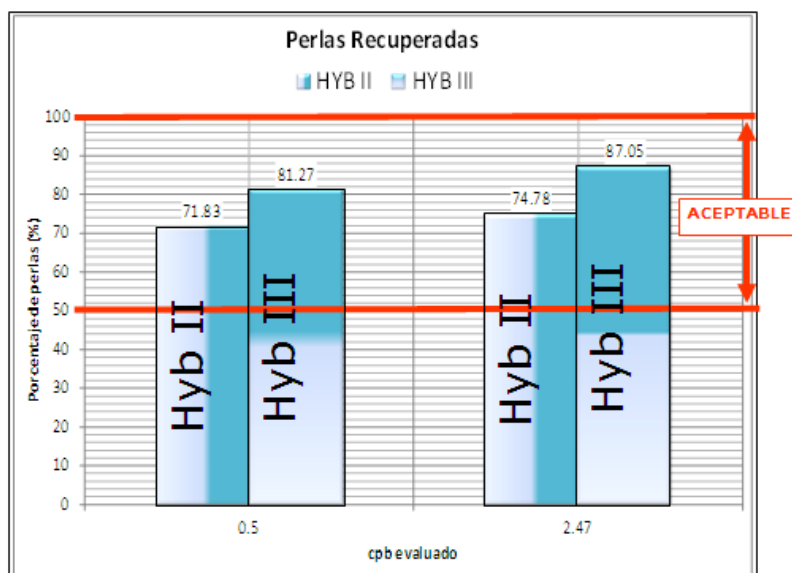


Figura A.11. Titulación por emPCR LV de perlas recuperadas con bibliotecas capturadas y amplificadas de Hyb II e Hyb III. Los cpb de trabajo fueron 0.5 y 2.47 para la reacción en cadena de la polimerasa en emulsión grande (emPCR LV), usando una solución de trabajo (WS) de concentración 1×10^7 moléculas/ μL .