



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SECUENCIAS TRANSGÉNICAS EN ALIMENTOS ELABORADOS  
CON MAÍZ. MÉXICO, UN CASO DE ESTUDIO.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**ELSA ANTONIETA GÓMEZ HERNÁNDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. EMMANUEL GONZÁLEZ ORTEGA**



**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:** Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra

**VOCAL:** Dr. José Pedraza Chaverri

**SECRETARIO:** Dr. Emmanuel González Ortega

**1er. SUPLENTE:** Dr. Oscar Hernández Meléndez

**2° SUPLENTE:** Dra. Carmina Montiel Pacheco

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE GENÉTICA MOLECULAR, DESARROLLO Y EVOLUCIÓN DE PLANTAS. INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.**

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Emmanuel González Ortega

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

Dra. Elena Álvarez-Buylla Roces

### **SUSTENTANTE (S):**

Elsa Antonieta Gómez Hernández

## AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

A ti mamá por estar siempre presente y cuidándome, espero algún día poder ser tan buena y generosa como tú, eres la mejor. A ti papá, por tu amor incondicional y todas tus enseñanzas, pero sobre todo por formarme como una mujer crítica y honesta, no pude desear un mejor papá. A ambos, por todo su apoyo, amor y comprensión y por hacerme la persona que soy ahora, los amo.

A mi abuelita Elsa por su eterno cariño y apoyo, te admiro y adoro por siempre. En especial a ti abuelito Raúl por todo tu amor y cuidados, porque junto con mi abuelita hiciste de mi infancia lo mejor que pudiera desear, te extraño mucho.

A mi hermana Bere y mi cuñado Jonathan, gracias por su apoyo constante y todo su cariño, por darme el regalo de ser tía de dos de mis personas favoritas Xime y Luis, los amo, son una gran parte de mi vida.

A Daniel Rosas, gracias por hacerme tan feliz, por motivarme, por tu gran compañía, por las horas de plática llenas de debate y de nuevos conocimientos, sé que lograremos grandes cosas juntos, te amo.

Esta tesis también se la dedico a mis queridos amigos: a Valeria Limón por ser la mejor compañera de carrera, pero también la mejor amiga, gracias por todo tu apoyo moral y por tantos momentos increíbles juntas. A Pablo Raña, hiciste de las horas de estudio y trabajo mucho más divertidas, nunca olvidaré tu ayuda incondicional y las horas de risas juntos. A mis mejores amigos Rafa y Valeria Calvo, son esenciales en mi vida, gracias por crecer conmigo. A Daniel García, gracias por iniciar conmigo esta etapa y brindarme todo tu apoyo y cariño todos esos años. A mis amigas de la secundaria, Alma, Fer, Monse, Jimena, gracias por las risas y compañía en cada etapa de mi vida.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Emmanuel González y a la Dra. Elena Álvarez-Buylla por creer en mí y confiarme este proyecto tan importante y significativo. A todos los compañeros del laboratorio, pero en especial a Eduardo, Pamela, Stefan y Rosario por su apoyo incondicional y excelente compañía.

A mi país y a la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma máter*, espero regresar un poco de lo mucho que me han brindado.

## **Agradecimientos Académicos**

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Emmanuel González Ortega, en el Laboratorio de Genética Molecular, Epigenética, Desarrollo y Evolución de Plantas del Instituto de Ecología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la coordinación académico-científica de las Dras. Elena Alvarez-Buylla Roces, Adriana Garay Arroyo, Berenice García Ponce de León y Ma. de la Paz Sánchez Jiménez, y la coordinación administrativa y logística de Diana Romo Ríos; así como el apoyo de Laura Rodríguez y la Dra. Teresa Romero, en la preparación de soluciones, medios, y materiales diversos importantes para realizar la investigación de esta tesis.

El financiamiento para insumos, secuenciación, trabajo de campo y otras actividades relevantes a esta investigación provino de proyectos de investigación:

CONACYT: 240180, 180380, 152649

UNAM-DGAPA-PAPIIT: IN 203214, IN203814, IN211516, IN203113.

Esta tesis se realizó gracias al apoyo de beca para tesis de licenciatura del proyecto CB-2012/180380.

## Contenido

Abreviaturas .....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	10
1.1 Planteamiento del problema .....	10
2. ANTECEDENTES .....	13
2.1 EL MAÍZ .....	13
2.1.1 Biología de la planta de maíz .....	13
2.1.2 Origen y diversificación del maíz .....	14
2.2 MAÍZ NATIVO .....	17
2.3 LA AGRICULTURA DEL MAÍZ EN MÉXICO .....	20
2.3.1 Producción y consumo de maíz en México .....	22
2.4 IMPORTANCIA Y USOS DEL MAÍZ .....	23
2.4.1 El maíz como elemento principal de la alimentación del mexicano .....	26
2.4.2 La tortilla .....	26
2.5 MAÍZ TRANSGÉNICO .....	28
2.5.1 Promotor CaMV 35S y T-NOS .....	30
2.6 MAÍZ TRANSGÉNICO TOLERANTE A HERBICIDAS .....	32
2.6.1 Glifosato .....	34
2.6.2 Uso de herbicidas desde la introducción de OGMs .....	35
2.6.3 Malezas resistentes a glifosato .....	40
2.6.4 Riesgos potenciales a la salud humana por la exposición y/o consumo de glifosato .....	42
2.6.5 Impactos ambientales del herbicida glifosato .....	49
2.7 MAÍZ TRANSGÉNICO RESISTENTE A INSECTOS .....	50
2.7.1 Generación de resistencia a los cultivos Bt .....	54
2.7.2 Potenciales daños a la salud por los cultivos con rasgo de resistencia a insectos (Cultivos Bt) .....	56
2.7.3 Efectos de los cultivos Bt sobre organismos no-blanco .....	58
2.8 APILAMIENTO ( <i>STACKING</i> ) DE EVENTOS TRANSGÉNICOS PARA RESISTENCIA A INSECTOS Y TOLERANCIA A HERBICIDAS .....	59
2.9 EL MAÍZ TRANSGÉNICO Y EL INCREMENTO EN EL RENDIMIENTO .....	62
2.10 ESTUDIOS DE MONITOREO Y DETECCIÓN DE MAÍZ TRANSGÉNICO EN MÉXICO Y EL MUNDO .....	64
2.11 FLUJO GÉNICO Y LAS IMPLICACIONES DE LA LIBERACIÓN DE MAÍZ GM DE FORMA MASIVA EN MÉXICO .....	68
2.12 LEGISLACIÓN SOBRE EL ETIQUETADO DE ALIMENTOS QUE CONTIENEN OGMs. ..	71
2.13 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE OGMs. ....	72
2.13.1 Métodos cualitativos de detección de OGMs por PCR .....	74

2.13.2 Estrategia de escrutinio ( <i>screening</i> ) de OGMs.....	75
2.13.3 Estrategia específica de gen.....	76
2.13.4 Estrategia específica de construcción.....	76
2.13.5 Estrategia evento específica.....	76
2.14 CUANTIFICACIÓN DE OGMs POR PCR EN TIEMPO REAL.....	77
2.14.1 Fundamento de la PCR en Tiempo Real.....	77
2.14.2 Sistema de detección por fluorescencia.....	79
2.14.3 Cuantificación de OGMs en alimentos.....	82
2.14.4 Materiales de Referencia Certificados.....	84
3. OBJETIVOS.....	86
3.1 Objetivo general.....	86
3.2 Objetivos particulares.....	86
4. HIPÓTESIS.....	86
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
5.1 Método.....	87
5.2 Muestras Alimentarias.....	89
5.3 Materiales de referencia.....	89
5.4 Extracción de ADN.....	90
5.5 Detección de gen endógeno de maíz <i>hmga</i> por PCR en Punto Final.....	90
5.6 Escrutinio de secuencias transgénicas en alimentos.....	91
5.7 Puesta a punto del escrutinio de OGMs por PCR en Tiempo Real (SYBR® Green).....	92
5.8 Análisis de datos.....	93
5.9 Especificidad y selectividad de los cebadores para el método de escrutinio.....	94
5.10 Sensibilidad y cálculo del Límite de Detección (LOD).....	94
5.11 Identificación de eventos específicos de maíz transgénico por PCR en Tiempo Real (SYBR® Green).....	95
5.12 Especificidad y selectividad de los cebadores evento-específicos.....	96
5.13 Sensibilidad y cálculo de Límite de Detección (LOD).....	96
5.14 Cuantificación de OGMs mediante qPCR (SYBR® Green).....	97
5.15 Cálculo del porcentaje de OGMs en muestras alimentarias.....	97
6. RESULTADOS.....	99
6.1 Especificidad de los cebadores CaMVp35S F/R y <i>Tnos</i> F/R utilizados en este estudio. 99	
6.2 Sensibilidad y Límite de detección (LOD).....	102
6.3 Identificación de eventos transgénicos específicos de maíz en muestras alimentarias mediante PCR en Tiempo Real.....	103
6.4 Escrutinio de OGMs en alimentos elaborados con maíz.....	107
6.5 Identificación de eventos transgénicos específicos en alimentos de maíz.....	120

6.6 Cuantificación de material transgénico presente en las muestras alimentarias (cuantificación de CaMV 35S).....	150
6.7 Determinación y cuantificación de glufosinato de amonio, glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) en alimentos de maíz. ....	153
7. DISCUSIÓN .....	156
7.1 El contexto socioeconómico del consumo de maíz en México. ....	162
7.2 Promesas, hechos y riesgos de los alimentos transgénicos.....	164
7.3 Regulación y etiquetado de los alimentos que contienen organismos transgénicos. ....	170
7.4 Alternativas a la tecnología transgénica. ....	173
8. CONCLUSIONES.....	177
Bibliografía .....	178
Anexo I. Protocolo modificado de Doyle & Doyle (1987) para extracción de ADN de alimentos de origen vegetal.....	200
Anexo II. Curvas de calibración, de amplificación y de disociación para la cuantificación de secuencias transgénicas. ....	201
Anexo III. Eventos transgénicos aprobados en México para consumo humano y animal. ....	204



## Abreviaturas

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AMPA:** Ácido aminometilfosfónico.

**ARN:** Ácido ribonucleico.

**ASERCA:** Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios.

**Bt:** *Bacillus thuringiensis*.

**CaMV:** Virus del mosaico de la coliflor.

**CaMV 35S:** Promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

**CERA:** Centro de Evaluación de Riesgos Ambientales (en inglés, Center for Environmental Risk Assessment) [www.cera-gmc.org](http://www.cera-gmc.org)

**CIBIOGEM:** CIBIOGEM; Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados del Poder Ejecutivo Federal.

**CIMMYT:** Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo.

**CINVESTAV:** Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

**CNBA:** Comisión Nacional de Bioseguridad Agrícola.

**COFEPRIS:** Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios del gobierno de México.

**CONABIO:** Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad del Gobierno de México.

**CONASUPO:** Compañía Nacional de Subsistencias Populares.

**Ct:** Ciclo umbral.

**CYPs:** Enzimas del citocromo P450.

**EFSA:** Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (en inglés, European Food Safety Authority).

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (en inglés, enzyme-linked immunosorbent assay).

**EPSPS:** Enzima 5-enolpiruvil shikimato-3 fosfato sintetasa.

**ERM:** European Reference Materials.

**FAO:** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (en inglés Food and Agricultural Organization of the United Nations).

**FDA:** (Agencia de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (en inglés, Food and Drug Administration).

**GM:** Genéticamente modificado.

**IARC:** Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (en inglés International Agency for Research on Cancer).

**IDA:** Ingesta diaria admisible (mg/kg p.c./día).

**INEGI:** Instituto Nacional de Estadística y Geografía de México.

**INIFAP:** Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.

**IRMM:** Instituto de Materiales y Medidas de Referencia (en inglés, Institute for Reference Materials and Measurements).

**ISAAA:** International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.

**LBOGM:** Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

**LMR:** Límite Máximo Residual.

**LOAEL:** Nivel de mínimo efecto tóxico observable. (en inglés, lowest-observed-adverse-effect level).

**Mn:** Manganese.

**MRC:** Materiales de referencia certificados.

**mRNA:** ARN mensajero.

**NOAEL:** Nivel sin efecto adverso observable (en inglés, no-observed-adverse-effect level).

**OGMs:** Organismos Genéticamente Modificados.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**ONGs:** Organizaciones no gubernamentales.

**ONU:** Organización de las Naciones Unidas.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, polymerase chain reaction).

**POEA:** Polioxietilenamina.

**RR:** Roundup Ready®

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

**SEMARNAT:** Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales.

**SIAP:** Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de México.

**TG:** Tolerantes a glifosato.

**TH:** Tolerante a herbicidas.

**TLCAN:** Tratado de Libre Comercio de América del Norte.

**Tm:** Temperatura de disociación o *melting*.

**T-NOS:** Terminador de la nopalina sintasa (nos) de *Agrobacterium tumefaciens*.

**UCS:** Union of Concerned Scientists, Estados Unidos.

**UE:** Unión Europea.

**UNESCO:** La Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (en inglés United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization).

**USDA:** Departamento de Agricultura de Estados Unidos (en inglés, United States Department of Agriculture).

**WSSA:** Sociedad Americana de Ciencia de las Malezas (en inglés, Weed Science Society of America).

## RESUMEN

México es el centro de origen y diversificación del maíz y este cultivo es la base alimentaria de la población. Sin embargo, México importa aproximadamente una tercera parte del maíz que consume, principalmente de Estados Unidos de América. El 93% del maíz que se siembra en EUA es transgénico y en México no se realizan análisis al maíz importado para determinar la presencia de secuencias recombinantes o de herbicidas, por lo que la hipótesis de este trabajo es que debido a que el maíz de importación no es segregado y se ha detectado maíz transgénico en el campo mexicano a pesar de la moratoria que prohíbe la siembra, se espera encontrar secuencias genéticamente modificadas en productos alimentarios elaborados a base de maíz.

Aquí se presentan los resultados de los análisis para determinar la presencia de maíz transgénico y glifosato en productos alimentarios elaborados con maíz (tortillas, tostadas, harinas, botanas y cereales). Las muestras se analizaron por PCR en tiempo real (RT-PCR), se determinó la presencia del promotor CaMV 35S y del terminador T-NOS, contenidos en la mayoría de los cultivos transgénicos. El 75.6% de las muestras contienen maíz transgénico. Adicionalmente se identificaron 6 diferentes eventos transgénicos (Bt176, Bt11, MON810, GA21, TC1507, NK603) de resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas o ambos. De un total de 156 muestras, 69.5% (n=82) resultaron positivas para la presencia de uno o más de los eventos transgénicos monitoreados. Se cuantificó el porcentaje de maíz transgénico presente en un subgrupo de alimentos (n=29), de estos, el 93.1% (n=27) presentaron más de 1% de contenido transgénico. Adicionalmente, se determinó la presencia del herbicida glifosato, de ácido aminometilfosfónico (AMPA), y glufosinato de amonio en muestras alimentarias positivas para eventos transgénicos de tolerancia a herbicidas. De 16 muestras analizadas, el 50% resultó positiva para la presencia del herbicida glifosato.

La presencia de maíz transgénico en productos alimentarios altamente consumidos por la población mexicana podría producir afectaciones a mediano plazo en la salud de los consumidores, ya que los alimentos industrializados pueden contener residuos de herbicidas a base de glifosato y proteínas transgénicas.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1 Planteamiento del problema.

México es considerado el centro mundial de origen y diversificación del maíz con miles de variedades locales agrupadas en 59 razas que aún se siembran a lo largo y ancho del país (Kato, 2009). Este cultivo es parte nodal del patrimonio biocultural de la nación y es eje articulador de la actividad campesina y agrícola de México (Álvarez-Buylla et al., 2013). El maíz es la base de la alimentación de la población mexicana: el consumo humano directo equivale a unos 300 g diarios *per cápita* en zonas rurales y 180 g diarios por persona en las zonas urbanas; es la principal fuente de energía, proteínas, almidones, fibra, hierro, y varias vitaminas en la dieta media aparente (Bourges, 2013).

En el año 2000, Ignacio Chapela y David Quist, investigadores de la Universidad de Berkeley, detectaron contaminación transgénica de maíces nativos en comunidades de la sierra de Oaxaca (Quist & Chapela, 2001). Los datos fueron confirmados por investigaciones posteriores y se encontró dicha contaminación en otros estados del país (Dyer *et al.*, 2009; Piñeyro-Nelson *et al.*, 2009; Serratos-Hernández *et al.*, 2007). Con ello se comprobó que los transgenes de las variedades genéticamente modificadas habían logrado penetrar a regiones remotas de las áreas de distribución de las variedades nativas, a pesar de la moratoria a la siembra y experimentación con granos transgénicos implementada por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) desde 1999 (Serratos-Hernández, 2009).

En otras partes del país se realizaron esfuerzos de biomonitorio, y en 2007 Serratos y colaboradores encontraron presencia de transgenes en maíces nativos sembrados en los suelos de conservación de la Ciudad de México (Serratos-Hernández et al., 2007). En 2009 se publicaron resultados de investigaciones realizadas en los estados de Guanajuato, Veracruz, Oaxaca y Yucatán, las cuales confirmaron la presencia de transgenes en comunidades puntuales de dichos estados (Dyer et al., 2009; Piñeyro-Nelson et al., 2009).

En los últimos años se han aprobado siembras a nivel piloto y experimental de maíz transgénico en varias zonas del país: En 2009, después de la publicación de la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) y la entrada en vigor del Régimen de Protección Especial del Maíz, se presentaron ante la SAGARPA las primeras solicitudes y permisos para siembra experimental de maíz transgénico (Martínez, 2015). De 2009 a noviembre de 2013 se otorgaron 169 permisos para liberar maíz transgénico a las empresas Monsanto, Syngenta Agro, Phi México, Dow Agrosiences y el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, CINVESTAV del Instituto Politécnico Nacional, los permisos permitían la siembra en 262 hectáreas en los estados de Baja California, Chihuahua, Coahuila, Durango, Nayarit, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas (Aristegui Noticias, 2014).

Sin embargo, la siembra efectiva de semillas modificadas se realizó sólo en 19 hectáreas, debido a que en el 2013, el colectivo denominado “Demanda Colectiva del Maíz” presentó una demanda en contra de la siembra de maíz transgénico, logrando que el Juez Federal XII de Distrito en Materia Civil de la Ciudad de México dictara una medida precautoria que ordenó detener el otorgamiento de permisos para liberación y siembra de maíces transgénicos por parte de dichas empresas (San Vicente, 2016). Después de numerosas impugnaciones contra la demanda colectiva, algunas promovidas por el gobierno federal, a través de SAGARPA y la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), y otras por las empresas biotecnológicas, la siembra de maíz transgénico a nivel comercial se encuentra suspendida provisionalmente en todo el país. Sin embargo, se ha levantado la suspensión al otorgamiento de permisos para siembras experimentales y en programa piloto, para fines de investigación científica (CNNExpansión, 2016). Actualmente la autoridad judicial se encuentra revisando si la suspensión provisional a la siembra de maíz transgénico para liberación comercial, debe alcanzar el nivel de suspensión definitiva (San Vicente, 2016).

A pesar de la moratoria de facto a la siembra de maíz transgénico, el país está importando grano para diversos procesos industriales y este podría estar contaminando a la cadena alimenticia de México. Parte de este grano de maíz importado, sobre todo de Estados Unidos de Norteamérica, podría venir contaminado con granos de variedades transgénicas. A lo largo de los años la importación de maíz en grano, así como de

alimentos procesados provenientes de Estados Unidos ha ido en aumento (Secretaría de Economía, 2013; Turrent, *et al.*, 2013). En dicho país se encuentran disponibles principalmente dos tipos de cultivos con tecnología transgénica: los que contienen el rasgo de resistencia a insectos, que expresan proteínas insecticidas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (cultivos Bt); y los que brindan tolerancia a herbicidas, que tiene como ingrediente activo principalmente al glifosato, aunque existen también otros herbicidas (González, 2012).

En México la normatividad para el manejo, utilización y comercialización de OGMs está contenida en la LBOGM. A pesar de que en dicha ley se resalta la necesidad de llevar a cabo vigilancia sanitaria y epidemiológica de los productos que contengan OGMs, hasta la fecha no se realizan programas de monitoreo; lo cual resulta problemático ya que la ley no exige el etiquetado de los productos alimentarios que los contengan (LBOGM, 2005). Así mismo, no se han publicado reportes gubernamentales oficiales sobre la cantidad de alimentos transgénicos disponibles en el mercado, o la proporción de alimentos hechos con maíz (p.ej. tortillas, totopos, tostadas, etc.), a pesar de que diversas variedades transgénicas tanto de maíz como de otros vegetales se encuentran autorizadas para alimentación humana y animal (COFEPRIS, 2015).

En esta tesis se desea evaluar la presencia de maíz genéticamente modificado en alimentos elaborados con maíz y la identificación de seis variedades específicas de maíz transgénico, que contienen al menos una de las siguientes características: tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos.

Este estudio es un esfuerzo científico útil para analizar críticamente el proceso regulatorio en torno a la presencia de transgenes y glifosato en los alimentos derivados de maíz en México. Una consecuencia posible de este estudio de encontrarse presencia de transgenes en estos alimentos, es que se establezca la obligatoriedad del etiquetado de alimentos que contengan OGMs. También es conveniente establecer estrategias de biomonitoreo de granos/semillas de maíz y de alimentos elaborados con maíz para un posterior análisis de los potenciales riesgos a la salud. Por otro lado, será importante establecer estrategias adecuadas de vigilancia aduanal durante la importación de semillas transgénicas que puedan poner en peligro la biodiversidad de las variedades de maíz nativo al ser sembradas en territorio mexicano.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 EL MAÍZ.**

#### **2.1.1 Biología de la planta de maíz.**

El maíz (*Zea mays*) es una planta de porte robusto y de hábito anual; el tallo es erecto y de elevada longitud, alcanzando alturas de uno a cinco metros, con pocas ramificaciones. Las hojas nacen en los nudos a lo largo del tallo con un patrón espiral (Bennetzen, 2009). Es una especie monoica, que presenta flores masculinas y femeninas bien diferenciadas en la misma planta: la inflorescencia masculina se conoce como panícula (o espiga), que es la que produce las flores masculinas en donde se diferencian los granos de polen. Las inflorescencias femeninas, que más tarde producirían las infrutescencias o mazorcas, son espigas de forma cilíndrica que consisten de un raquis central u olote con los granos en su superficie (Kato *et al.*, 2009).

La mazorca puede formar alrededor de 400 a 1000 granos arreglados en promedio de ocho a 24 hileras por mazorca (Kato *et al.*, 2009). Cada grano o semilla de la mazorca es un fruto independiente llamado cariósipide. Las estructuras que constituyen el grano del maíz (pericarpio, endospermo y embrión) le confieren propiedades físicas y químicas (color, textura, tamaño, etc.) que han sido importantes en la selección del grano como alimento (Kato *et al.*, 2009).

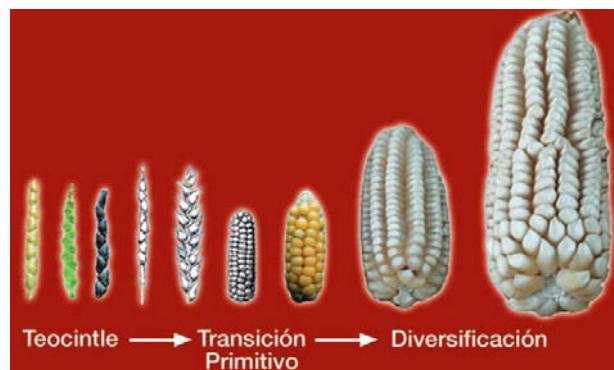
El maíz es una planta de polinización abierta (anemófila) con altas tasas de entrecruzamiento. Una planta de maíz puede producir alrededor de 25 millones de granos de polen capaces de viajar distancias de 100 a 1000 metros (Reyes, 1990; Jugenheimer, 1988), aunque la distancia más lejana hasta ahora registrada es de 4400 metros (Bannert, 2006).

El genoma de maíz se encuentra organizado en diez cromosomas ( $2n=20$ ) de aproximadamente  $2.4 \times 10^9$  pares de bases (Hanley *et al.*, 2000). Se considera que entre el 60 y el 85% del genoma de maíz está formado por transposones o elementos transponibles, que son secuencias de ADN que se mueven o “saltan” de un sitio a otro en el genoma (Fedoroff, 1993). Estos transposones pueden insertarse en secuencias

codificantes o entre secuencias regulatorias y provocar mutaciones en el genoma, lo que contribuye a la generación de diversidad del organismo, también son responsables de la expansión del genoma, ya que tienen la capacidad de duplicarse y distribuir sus copias a lo largo del mismo (Haberer *et al.*, 2005).

### 2.1.2 Origen y diversificación del maíz.

El maíz es un ejemplo excepcional de la interacción del humano con los recursos naturales, el proceso de domesticación se inició hace más de seis mil años sobre el pariente silvestre más cercano al maíz, el teocintle del género *Zea* (Beadle, 1980; Doebley, 1990; Doolittle, W.E., & Mabry, 2006; Matsuoka *et al.*, 2002) (Figura 1).



**Figura 1. Secuencia morfológica de la posible evolución de la mazorca del teocintle y el maíz. Tomado de (Serratos Hernández, 2009).**

En 1926 Nikolai Vavilov, uno de los más grandes genetistas del siglo XX, publicó sus teorías en un libro llamado *El Origen de las Plantas Cultivadas* (Vavilov, 1926), en el cual se dieron a conocer los centros de diversidad o simplemente centros de Vavilov (Tabla 1). Definió como “centro de origen” a una zona geográfica en donde se encuentra el máximo de diversidad de algún cultivo y en el que coexisten o coexistieron sus parientes silvestres. Para definir un centro de origen, Vavilov toma en cuenta varios aspectos, entre ellos: 1) son áreas geográficas en las que éstos se siguen cultivando; 2) se asocian a grandes extensiones de territorio y; 3) los focos primarios del origen de los cultivos se encuentran en las regiones montañosas (Vavilov, 1992).



**Tabla 1. Centros de Vavilov y sus plantas cultivadas (Vavilov, 1992) .**

Centros de Origen	Cultivos
Este de Asia	Alforfón, soya, durazno, cereza, cebolla
Tropical	Arroz, garbanzo, pepino, mango, naranja
Suroeste de Asia	Trigo, chícharo, lentejas, frijol mungo, alfalfa, centeno, heno griego
Mediterráneo	Trigo durum, col , lechuga, apio
Abisinia (región de Etiopía)	Cebada, mijo, lino, café, sésamo
América central (Mesoamérica, incluyendo México)	Maíz, frijol de lima, algodón, camote, pimientos
Andes	Fresa, papa, tomate, calabaza, pimientos

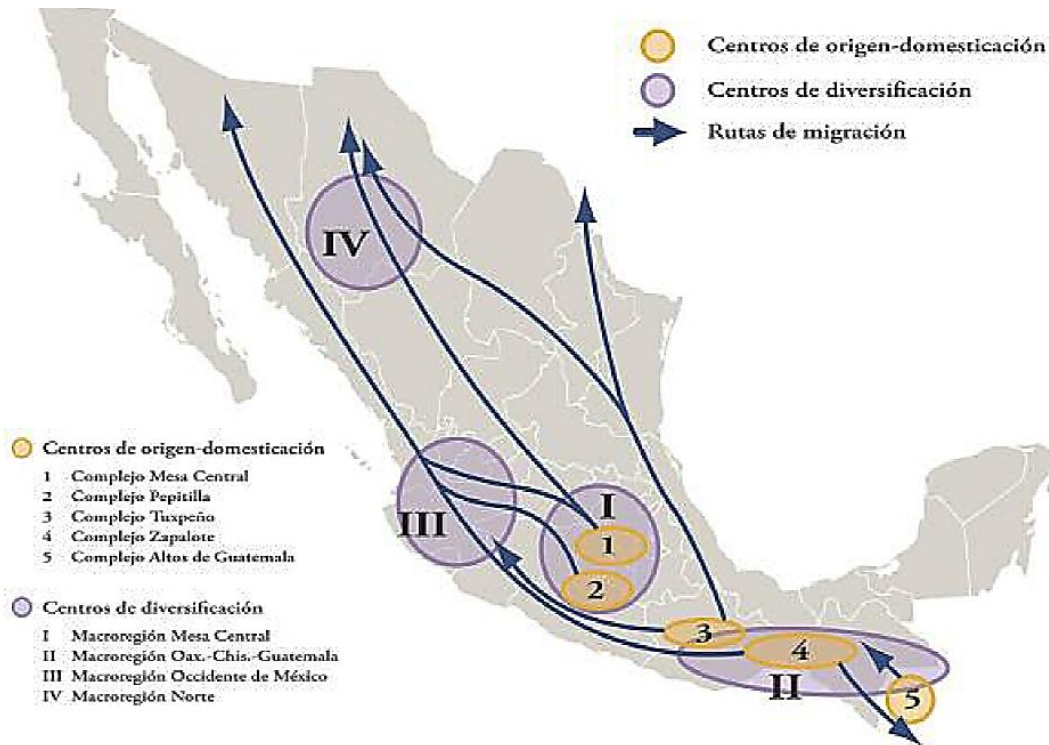
Por ser reservorios genéticos, los centros de origen y diversificación activos tienen gran relevancia, ya que el 90% del sistema alimentario mundial está constituido por menos de 120 especies de plantas vegetales, y dichos centros aportan más de la mitad de estas especies (Boege, 2009) y de su diversidad que es fundamental para el mejoramiento ante retos futuros.

México y la región mesoamericana se consideran el centro de origen y diversificación del maíz (Sánchez *et al.*, 2000). Aunque no se conocen el momento y lugar precisos en los cuales se originó el maíz en México, Kato y colaboradores han concluido que el maíz se originó simultáneamente en diversas regiones, siendo producto de varias poblaciones de teocintles y, como consecuencia se han determinado cuatro posibles centros de origen y domesticación del maíz que se extienden a lo largo de México y hasta Guatemala, estos son: Mesa Central, Oaxaca-Chiapas-Guatemala, Occidente de México y Norte (Sarukhán *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2009), cuyos productos agrícolas, por mediación de las migraciones humanas, hibridaciones y posterior selección dieron lugar a un gran número de nuevos tipos raciales y variedades (Kato *et al.*, 2009).

Se considera que hoy en día existen en América entre 220 y 300 razas de maíz (Brown, 1977). En México, según diferentes autores e instituciones se salvaguardan entre 41 (Ortega-Paczka *et al.*, 1991), 59 (Sánchez *et al.*, 2000) y 65 razas de maíz (LAMP, 1991) y miles de variedades, siendo uno de los centros de diversificación más importantes del

mundo. En la actualidad el maíz muestra un gran dinamismo que lo mueve constantemente de región en región en todo el territorio mexicano, de tal forma que aún se encuentra en un proceso de diversificación, que nunca ha dejado de estar activo desde que se dio la domesticación del cultivo (Kato *et al.*, 2013).

En la Figura 2 se muestran los centros de origen (círculos naranja) y diversificación del maíz (círculos morados) más importantes: I) Mesa Central, II) Oaxaca-Chiapas-Guatemala, III) Occidente de México y IV) Norte (Kato *et al.*, 2009).

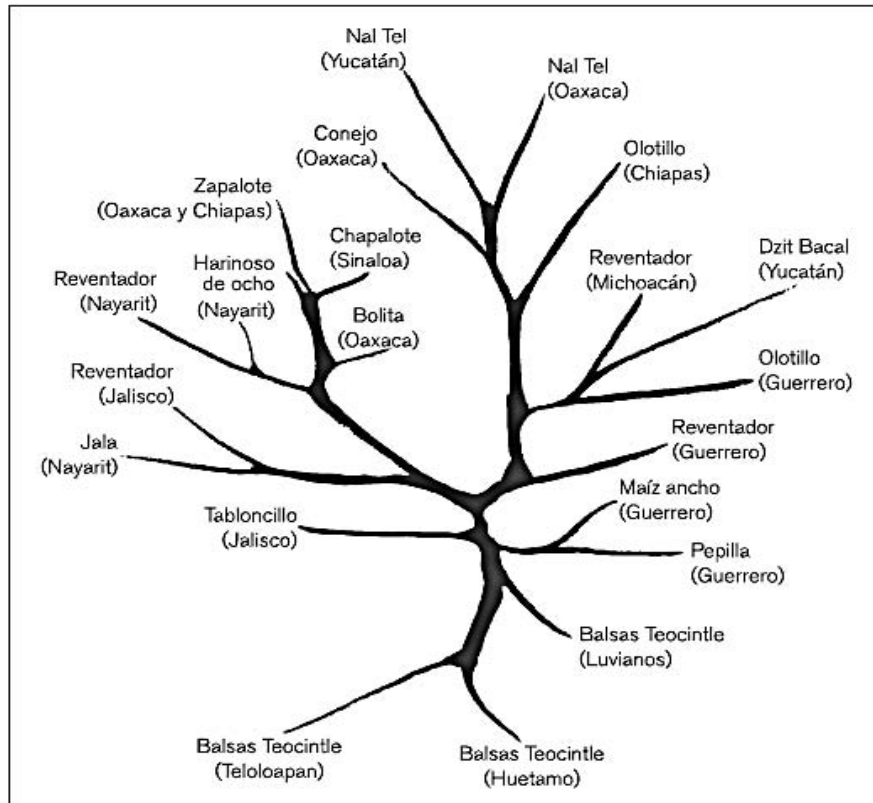


**Figura 2.** Mapa de México con las localizaciones de los centros de origen-domesticación y los centros de diversificación primaria del maíz, Tomado de Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. M., Serratos, J. A. and Bye, R. A. (2009) *Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica*.

El proceso de diversificación a lo largo y ancho del país, es un hecho que ha sido puesto en evidencia por los estudios filogenéticos basados en microfósiles (mazorcas, fragmentos de plantas, etc.) y microfósiles (polen). Estos estudios establecen un patrón de dispersión que va de la cuenca del Balsas a todos los confines del país (Blake, 2005).

En la Figura 3 se presenta el árbol filogenético del complejo mexicano de maíces elaborado con base en los nudos cromosómicos. Este árbol y distribución geográfica

muestra que la diversificación abarca prácticamente todos los estados mexicanos (Boege, 2009). La magnitud de este área geográfica implica que la dimensión de dichos centros es amplia y refleja la relación indisoluble del maíz con los grupos humanos prehistóricos, las comunidades indígenas y campesinas, que basaron su agricultura y una parte importante de su sustento en el cultivo de este cereal y esto han permanecido vigente en las poblaciones rurales e indígenas de nuestro país hasta nuestros días (Sánchez *et al.*, 2000).



**Figura 3. Árbol filogenético derivado de nudos cromosómicos que muestra el patrón de ramificación del complejo mexicano de maíz de mazorca estrecha. Modificado de Benz 1997, tomado de Boege, 2009.**

## 2.2 MAÍZ NATIVO.

En México, se han descrito 59 razas de maíz de acuerdo con la clasificación más reciente basada en características morfológicas e isoenzimáticas (Sanchez *et al.*, 2000). El término raza se ha utilizado en el maíz y en las plantas cultivadas para agrupar individuos o poblaciones que comparten características en común, de orden morfológico, ecológico,

genético y de historia de cultivo, que permiten diferenciarlas como grupo (Harlan, 1971). Las razas se agrupan a su vez en grupos o complejos raciales, los cuales se asocian a una distribución geográfica y climática más o menos definida y a una historia evolutiva común. Sin embargo, cada raza puede comprender numerosas variantes o variedades locales que se pueden diferenciar entre sí por sus formas de mazorca, color y textura de grano, adaptaciones y diversidad genética (Sanchez *et al.*, 2000).

Las razas se nombran a partir de distintas características fenotípicas (Cónico, por la forma de la mazorca), tipo de grano (Reventador, por la capacidad del grano para explotar y producir palomitas), por el lugar o región donde inicialmente fueron recolectadas o son relevantes (Tuxpeño de Tuxpan, Veracruz; Chalqueño, típico del Valle de Chalco) o por el nombre con que son conocidas por los grupos indígenas o mestizos que las cultivan (Zapalote Chico en el Istmo de Oaxaca o Apachito en la Sierra Tarahumara) (CONABIO, 2012).

En América Latina se han descrito cerca de 220 razas de maíz de las cuales 64 (29%) se han identificado, y descrito en su mayoría, para México. De estas 64 razas, 59 se pueden considerar nativas y cinco que también se han recolectado o reportado en el país pero que fueron descritas inicialmente en otras regiones (una raza del Caribe, y cuatro razas de Guatemala). Las razas de maíz de México se han agrupado, con base en caracteres morfológicos, de adaptación y genéticos (isoenzimas) en siete grupos o complejos raciales, contenidos en la Tabla 2 (Sanchez *et al.*, 2000).

**Tabla 2. Complejos raciales y razas de maíz en México. Elaboración propia específica para esta tesis, con base en datos publicados (Sanchez *et al.*, 2000) y disponibles en la página de CONABIO.**

Grupos o Complejos Raciales	Razas de maíz
Grupo Cónico	Arrocillo, Cacahuacintle, Cónico, Cónico Norteño, Chalqueño, Dulce, Elotes Cónicos, Mixteco, Mushito, Mushito de Michoacán, Negrito, Palomero de Jalisco, Palomero Toluqueño y Uruapeño.
Grupo Sierra de Chihuahua o razas de las partes altas del norte de México.	Cristalino de Chihuahua, Gordo, Azul, Apachito, Complejo Serrano de Jalisco y Mountain Yellow.
Grupo Ocho Hileras o razas del occidente de México	Blando de Sonora, Onaveño, Harinoso de Ocho, Tabloncillo, Tabloncillo Perla, Bofo, Elotes Occidentales, Tablilla de Ocho, Jala, Zamorano Amarillo, Ancho y Bolita
Grupo Chapalote	Chapalote, Reventador, Dulcillo del Noroeste y Elotero de Sinaloa.
Grupo Tropicales precoces	Nal-Tel, Zapalote Chico, Conejo y Ratón.
Grupo Dentados tropicales	Tuxpeño, Vandeño, Tuxpeño Norteño, Tepecintle, Zapalote Grande, Celaya, Pepitilla y Nal-Tel de Altura.
Grupo Maduración tardía	Olotillo, Dzit-Bacal, Comiteco, Motozinteco, Tehua, Olotón y Coscomatepec.

### 2.2.1 Composición fitoquímica y nutricional del maíz nativo de México.

En los últimos años, se han realizado diversas investigaciones que destacan características particulares de las variedades nativas, como el contenido de nutrientes y fitoquímicos de interés (Fernández-Suárez, Morales-Chávez, & Gálvez-Mariscal, 2013), el contenido de aceite de algunas variedades nativas (Torres-Morales *et al.*, 2010), el contenido de azúcares en maíces elotero (Estrada *et al.*, 2010) y la calidad proteínica de algunas razas nativas de maíz (Vera-Guzmán, 2012).

Las variedades nativas de maíces pigmentados contienen diversos fitoquímicos, tales como antocianinas, carotenoides, y compuestos fenólicos, los cuales son sintetizados en la planta mediante su metabolismo secundario. Estos compuestos confieren a los granos de los maíces nativos sus características y diversas tonalidades: negro, morado, azul, rojo, naranja, rosado, amarillo y blanco, o combinaciones de éstas (Salinas-Moreno *et al.*, 2012). A pesar de que estos compuestos se consideran no nutritivos, se han descrito una serie de actividades biológicas de los componentes de maíz, como el efecto antioxidante

y anti carcinogénico de los polifenoles del maíz blanco, como el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico, así como sus respectivos derivados (Rondini, 2002).

Los carotenoides responsables de la coloración naranja y amarilla del endospermo de maíz como el alfa y beta caroteno así como la beta criptoxantina, luteína y zeaxantina poseen una alta capacidad antioxidante, tienen actividad de provitamina A y se ha observado su posible papel en la prevención de cataratas y degeneración macular relacionada con la edad (Žilić *et al.*, 2012).

También se ha encontrado que las variedades de maíz con pigmentación morada, azul y roja inhiben carcinogénesis colorectal en ratas macho (Hagiwara *et al.*, 2001), posee actividad anti mutagénica (Yoshimoto, 1999) y antioxidante por medio de la eliminación de radicales (Lopez-Martinez *et al.*, 2009; Oki *et al.*, 2002). Estas actividades se han asociado a las antocianinas presentes en dichos cultivos.

Con respecto a los productos elaborados con maíz, se ha determinado la presencia y retención de componentes bioactivos después de los procesos de nixtamalización tradicional y nixtamalización por extrusión, ambos procesos promueven la pérdida parcial de compuestos fenólicos y antioxidantes. En la nixtamalización tradicional se retienen de 19 a 75.7% de los compuestos fenólicos totales durante el procesamiento, dependiendo de la variedad de maíz, pero se encuentran más biodisponibles que aquellos presentes en los productos elaborados por nixtamalización por extrusión, en los que se retienen entre 58 y 96.7% de los compuestos fenólicos totales (Mora-Rochin *et al.*, 2010). En tortillas elaboradas con maíz pigmentado se retienen hasta el 87.5% de los compuestos fenólicos totales, 65.4% de las antocianinas y hasta el 90.7% del contenido total de antioxidantes hidrofílicos presentes en los granos crudos, siendo los productos de maíz azul los que contienen una mayor cantidad de polifenoles y antioxidantes, seguido del maíz rojo, blanco y amarillo (Aguayo-Rojas *et al.*, 2012).

### **2.3 LA AGRICULTURA DEL MAÍZ EN MÉXICO**

En México existen principalmente dos modelos de producción de maíz: temporal y riego. El maíz producido bajo temporal, depende mayoritariamente de las lluvias; en esta práctica predomina el trabajo humano y animal y se llevan a cabo por pequeños

productores campesinos utilizando variedades de maíz nativo adaptadas localmente (Kato *et al.*, 2013).

El cultivo tradicional de maíz es principalmente de temporal, el cual representa en México el 57.9% de la producción y el 82.8% de la superficie sembrada (SIAP, 2015a). En 2014 se produjeron más de 13 millones de toneladas de maíz en sus diferentes variedades bajo condiciones de temporal, las cuales incluyen maíz grano blanco, maíz forrajero en verde, maíz grano amarillo, maíz grano de color, elote blanco y maíz grano pozolero (SIAP, 2015a). Los rendimientos bajo cultivo de temporal de maíz grano blanco, maíz grano amarillo y maíz grano de color son de 2.3, 3.4 y 1.4 toneladas por hectárea, respectivamente; y el valor de la producción representa el 59.1% del total del maíz en México (SIAP, 2015a).

El resto de la producción de maíz se lleva a cabo bajo un modelo tecnificado dependiente de riego. La agricultura de alto rendimiento en monocultivo, requiere de muchos insumos para sustituir la labor humana y animal, y para maximizar la captura y conversión de la radiación solar en la biomasa del cultivo. Dichos insumos incluyen: fertilizantes, herbicidas, insecticidas, semillas, combustible fósil y la maquinaria necesaria para las diferentes operaciones como el bombeo para la irrigación y el secado del grano (Grassini & Cassman, 2012).

Hoy en día el maíz cubre más de la mitad de la superficie cultivada del país y sólo el 17.18% del total cultivado se realiza bajo riego, en las áreas de mejor tierra, alta utilización de insumos industriales, altos rendimientos y destino comercial; el maíz cultivado bajo riego representa el 42.04% de la producción total nacional y los rendimientos para maíz grano blanco y maíz grano amarillo son de 10 y 7.6 (ton/ha), respectivamente; y el valor de la producción de maíz bajo riego corresponde al 40.93% del total nacional (SIAP, 2015a).

En 2014 se produjeron más de 9.8 millones de toneladas de maíz en sus diferentes variedades bajo condiciones de riego, las cuales corresponden a: maíz grano blanco, maíz grano amarillo, maíz forrajero en verde, maíz grano semilla, maíz grano de color, elote amarillo, maíz palomero y maíz grano pozolero (SIAP, 2015a). En el promedio anual del período 2008/2010 el consumo total de semilla en México fue de 160.2 miles de

toneladas, de las cuales 42.5% correspondió a variedades mejoradas o híbridas y el 57.5% a semillas nativas (García & Ramírez, 2014).

### **2.3.1 Producción y consumo de maíz en México.**

A nivel mundial la producción de maíz para grano alcanzó, en el período 2014-2015, aproximadamente 1008 millones de toneladas; los principales países productores de maíz son Estados Unidos que aporta el 35.6% de la producción mundial, seguido de China, Brasil y la Unión Europea, México ocupa el sexto lugar, contribuyendo con un 2.4% de la producción mundial (SAGARPA/ASERCA, 2015). En cuanto a la exportación de maíz en el mundo, Estados Unidos ocupa también el primer puesto, seguido de Brasil, Argentina y Ucrania. Por otro lado, los principales países importadores de maíz son la Unión Europea, Japón, México, Corea del Sur y Egipto.

El maíz es el cultivo más importante del país desde el punto de vista alimentario, económico, político, social y cultural (SIAP, 2015c). Participa con aproximadamente el 17.5% del valor de producción del sector agrícola (73 mil mdp en 2014) y concentra el 33% de la superficie sembrada en el territorio nacional que equivale a 7.5 millones de hectáreas (SIAP, 2015b). En 2014 el volumen de producción de maíz alcanzó 23.3 millones de toneladas; la superficie de temporal ocupa el 74% de la superficie y aporta únicamente el 40% del valor generado (SIAP, 2015b), las mayores superficies sembradas con maíz se encuentran en la zona sub-húmeda tropical y en la templada húmeda y subhúmeda (Mapes *et al.*, 2009).

Todas las entidades del país tienen algún nivel de producción de maíz, sin embargo, siete entidades concentran el 64.8% del volumen de producción nacional. Sinaloa es el principal productor al concentrar el 15.8% del total, le siguen en importancia Jalisco (14.8%), Michoacán (8.3%), Estado de México (8.0%), Guanajuato (6.1%), Chihuahua (5.9%) y Guerrero (5.7%) (SIAP, 2015d).

El rendimiento nacional alcanza en promedio las 3.3 ton/ha, siendo el rendimiento de temporal de 2.31 ton/ha y el de riego de 7.5 ton/ha. El promedio del consumo nacional aparente de maíz blanco en el período de octubre de 2014 a septiembre de 2015, ha sido



cercano a las 20.4 millones de toneladas, mientras que el de grano amarillo oscila las 13.1 millones de toneladas (SAGARPA, 2015a). La producción media de maíz blanco es de 22,3 millones de toneladas, mientras que de amarillo es de 3,04 (12% de la producción nacional). En 2014, México importó alrededor de 880 mil toneladas de maíz blanco en su totalidad desde Estados Unidos, y alrededor de 10 millones de toneladas de maíz amarillo, 99.68% provenientes de Estados Unidos y únicamente 0.32 % de Brasil (SAGARPA, 2015a).

En el período de 2014-2015, México exportó 747 mil toneladas de maíz blanco, de las cuales, 72.6% fueron exportadas a Venezuela, 10.6% a Sudáfrica, 7.5% a El Salvador, 6.4% a Honduras y 2.4% a Estados Unidos, mientras que sólo exportó 8 mil toneladas de maíz amarillo (SAGARPA, 2015b).

El consumo *per cápita* de maíz en México es aproximadamente 10 veces mayor que el de Estados Unidos (Serna-Saldívar, 2008). Sin embargo, en un período de doce años, el consumo de grano de maíz disminuyó en la población en general, sobre todo en las zonas rurales, mientras que en las urbanas aumentó. La misma situación se presenta con el consumo de harina de maíz: el consumo de masa se incrementó en las regiones rurales y urbanas; mientras que el consumo de tortilla disminuyó en las zonas urbanas (López, 2013). El consumo anual *per cápita* en México es de 123 kg, mientras que el promedio mundial es de 16.8 kg al año (Trejo, 2014).

## **2.4 IMPORTANCIA Y USOS DEL MAÍZ.**

El maíz, además de ser el alimento principal de la población, ha tenido otros usos en la cultura mexicana, desde la época mesoamericana prehispánica ya se efectuaba un aprovechamiento integral del maíz. Los granos, las hojas, los tallos y las espigas del maíz, se llevan utilizando para diferentes propósitos desde hace muchos años (Mera-Ovando, 2009).

Todas las partes de la planta, sirven como abono o combustible; la caña se utiliza en la construcción y el tallado de figuras artesanales. También tiene usos medicinales, como envoltura, combustible, bebida refrescante o embriagante (Esteva, 2003). La hoja se ha utilizado como envoltura para tamales, para fabricar objetos rituales o artesanales como

recipientes. El olote, se emplea como combustible y alimento para ganado, también como herramienta para pulir madera y piezas de alfarería, o como tapón de recipientes (Esteva, 2003).

El uso alimentario del maíz es sin duda el más destacable, ya que en el país se utilizan numerosas variedades de maíces nativos para elaborar una enorme cantidad de platillos tradicionales, lo que hace que el maíz sea uno de los elementos esenciales de la cocina mexicana (Fernández-Suárez *et al.*, 2013). México cuenta con más de 700 platillos elaborados con maíz, por lo que la cocina tradicional nacional es considerada por la UNESCO como Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad (UNESCO, 2010). Los maíces nativos son la base de estos platillos, ya que en la mayoría de los casos, los maíces híbridos o mejorados no reúnen las propiedades y calidad buscada por las comunidades para la preparación de la mayoría de los platillos específicos típicos (Ortega-Paczka, 2003). Entre las categorías de alimentos y preparaciones culinarias tradicionales preparadas con maíz se encuentran las tortillas, diversos antojitos, botanas, elotes, sopas, tamales, pinoles, dulces, repostería, atoles y diversas bebidas (CONABIO-INE-INIFAP, 2011).

El agricultor mexicano tradicional selecciona las semillas más aptas con base en las características que desean para los productos finales elaborados con cada una de las variedades de maíz nativo (sabor, color, textura, facilidad de cocción, entre otras). También pueden identificarse varios usos para una misma raza, así como también hay un gran número de razas asociadas con la elaboración de un producto, como la tortilla, que se puede elaborar casi con cualquier raza de maíz (Lazos, 2011).

En nuestro país predominan las razas de grano dentado y con dureza intermedia, debido a que son las más aptas para la elaboración de tortillas (Ortega-Paczka, 2003). A través de los reportes de CONABIO en 2011, los investigadores se han dado a la tarea de caracterizar los distintos usos que se les da a las razas de maíz para la elaboración de diversos productos (Tabla 3).

**Tabla 3. Usos comunes y razas de maíz nativas asociadas (Fernández-Suárez *et al.*, 2013).**

Uso	Razas
Tortillas y Relacionados	Ancho, Apachito, Arrocillo, Azul, Blando, Bofo, Bolita (tlayuda), Cacahuacintle, Chalqueño, Chapalote, Comiteco, Conejo, Cónico, Coscomatepec, Cristalino de Chihuahua, Dulcillo del Noroeste, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Elotes Occidentales, Gordo, Harinoso de Ocho, Jala, Mushito, Nal-Tel de Altura, Olotillo, Olotón, Onaveño, Palomero de Chihuahua, Palomero Toluqueño, Pepitilla, Reventador, Tabloncillo, Tepecintle, Tuxpeño, Tuxpeño Norteño, Vandefío, Zapalote Chico (totopo), Zapalote Grande.
Elotes	Ancho, Apachito, Blando de Sonora, Bofo, Cacahuacintle, Chapalote, Comiteco, Complejo Serrano de Jalisco, Conejo, Cónico, Coscomatepec, Dulce, Dulcillo del Noroeste, Elotero de Sinaloa, Elotes Cónicos, Elotes Occidentales, Gordo, Harinoso de Ocho, Jala, Nal-Tel, Olotón, Pepitilla, Tabloncillo, Tabloncillo Perla, Tepecintle, Tuxpeño, Zapalote Grande.
Galletas y dulces	Blando de Sonora (coricos), Bofo (galletas), Cacahuacintle (galletas), Chalqueño (burritos), Elotes Occidentales (chicales), Gordo (galletas, harinillas), Harinoso de Ocho (coricos), Reventador, Tepecintle.
Palomitas	Apachito, Arrocillo Amarillo, Chapalote, Nal-Tel, Palomero de Chihuahua, Palomero Toluqueño, Reventador.
Botanas	Apachito, Azul, Celaya, Chapalote, Comiteco, Complejo Serrano de Jalisco, Cónico, Cónico Norteño, Coscomatepec, Cristalino de Chihuahua, Dulce de Jalisco, Dzit Bacal, Elotes Occidentales, Jala, Onaveño, Tablilla de Ocho, Tabloncillo, Tabloncillo Perla, Tehua, Tuxpeño, Tuxpeño Norteño, Vandefío, Zamorano Amarillo, Zapalote Chico, Zapalote Grande.
Pozoles, sopas y Menudos	Ancho, Blando de Sonora, Bofo, Bolita, Cacahuacintle, Chalqueño, Cónico Norteño, Dulce, Dulcillo del Noroeste, Elotes Occidentales, Gordo, Harinoso de Ocho, Jala, Mushito, Tabloncillo, Tuxpeño, Vandefío.
Atoles	Apachito, Arrocillo, Azul, Blando de Sonora, Bofo, Cacahuacintle, Chalqueño, Comiteco, Conejo, Coscomatepec, Cristalino de Chihuahua, Elotes Cónicos, Elotes Occidentales, Harinoso de Ocho, Mushito, Nal-Tel, Olotón, Pepitilla, Tehua, Tepecintle, Tuxpeño, Tuxpeño Norteño, Zapalote Grande.
Pinoles	Apachito, Azul, Bofo, Cacahuacintle, Chalqueño (rojo-amarillo), Chapalote, Cónico, Dulce, Dulcillo del Noroeste, Elotes Cónicos, Gordo, Jala, Onaveño, Reventador, Tabloncillo, Tablilla de Ocho.
Harinas	Cacahuacintle, Celaya, Elotes Cónicos, Gordo, Harinoso de Ocho, Mushito, Olotón, Vandefío.
Bebidas	Apachito (tejuino, tesgüino), Azul (tesgüino), Bofo (huajatole, tesgüino), Bolita (tejate), Comiteco (pozol), Nal-Tel (pozol), Olotón (pozol), Tabloncillo (piznate), Tablilla de Ocho (tesgüino), Tepecintle (pozol), Tuxpeño (pozol), Zapalote Grande (pozol).

### **2.4.1 El maíz como elemento principal de la alimentación del mexicano.**

Aún después del mestizaje alimentario que vivió México en la época de la conquista española, el maíz sigue siendo el ingrediente fundamental en la dieta actual de los mexicanos. Este alimento es, además, una de las principales fuentes de energía y de muchos otros nutrientes en nuestra población (Fernández *et al.*, 2013). Al consumir maíz, un mexicano recibe diariamente en promedio 982 kcal y 25.3 g de proteína (FAOSTAT, 2011), si se toma como base una dieta de 2000 kcal y 56 g de proteína, el consumo de maíz en México equivale a casi el 50% de la ingesta diaria de una persona adulta (Serna-Saldívar & Amaya-Guerra, 2008). Sin embargo, se ha disminuido el consumo de platillos tradicionales basados en maíz y otros cultivos ricos en nutrimentos procedentes de la milpa (Gálvez & Bourges, 2012). Derivado del proceso de globalización, una transición nutricional hacia hábitos de alimentación que tienden a sustituir las preparaciones tradicionales por alimentos procesados ha ocurrido. Estos alimentos industrializados tienen una mucho mayor densidad energética, causando una epidemia de obesidad y enfermedades crónicas relacionadas con la dieta (Hawkes, Chopra, & Friel, 2009).

Además de los cambios en la alimentación del mexicano, la inestabilidad en los precios del maíz en los últimos años (ASERCA, 2015; FAO, 2011), el magro apoyo gubernamental a la actividad campesina (Banco Mundial, 2005), la presencia de variedades transgénicas de maíz implican una importante amenaza para los maíces nativos y el consumo de productos de maíz de alta calidad necesarios para mantener la dieta tradicional.

### **2.4.2 La tortilla.**

La tortilla es considerada la base de la alimentación del pueblo mexicano desde hace más de 3500 años (Paredes-López *et al.*, 2009). A pesar de ser el alimento más popular elaborado a base de maíz, desde 1980 hasta ahora se ha disminuido su consumo aproximadamente a la mitad (García-Urigüen, 2012).

Sin embargo, la tortilla sigue siendo un elemento predominante en la dieta mexicana, cerca del 82% de los hogares incluyen tortilla en su dieta, representa 6.4% del gasto total

en alimentos, aunque la población de menores ingresos destina más de 25% de su presupuesto para alimentación, en dicho producto (INEGI, 2010).

El consumo *per cápita* de tortilla es de 120 kg/año, es decir, 328 g al día (Trejo, 2014). En promedio cerca del 59% de la energía y 39% de las proteínas en la dieta provienen del grano de maíz consumido como tortilla (Moreno, 2014). Este alimento es una excelente fuente de calorías y calcio (Serna-Saldívar, 2008) y puede proporcionar de 32 a 62% de los requerimientos mínimos de hierro (Paredes-López *et al.*, 2009).

Los diferentes procesamientos del grano de maíz para elaborar las tortillas pueden contribuir a incrementar el valor nutricional de los alimentos preparados. Para el caso del maíz, el más importante es la nixtamalización del grano, el cual consiste en una cocción alcalina en agua con cal; este proceso es la operación más distintiva de la cocina mesoamericana que perdura hasta la actualidad (Rodríguez y Serna, 2008).

La nixtamalización aumenta significativamente el aporte de calcio en la alimentación (en un orden de 13 veces), el cual es biodisponible en su totalidad (Bressani, 2008), también aumenta la disponibilidad de fibra dietética soluble e incrementa la biodisponibilidad de la mayoría de los aminoácidos indispensables, incrementando el valor biológico de la proteína y, por lo tanto, el valor nutricional del maíz (Paredes-López *et al.*, 2009). También se ha descrito la degradación de aflatoxinas durante la nixtamalización y el proceso de elaboración de tortillas (Méndez-Albores *et al.*, 2004).

Durante la nixtamalización, la niacina se libera como ácido nicotínico lo que mejora sustancialmente la disponibilidad de esta vitamina. Por ello, los españoles que no nixtamalizaban el maíz, sufrían de pelagra, que es una enfermedad causada por deficiencia de la niacina y cuyas manifestaciones clínicas son debilidad, bajo peso y está caracterizada por “las tres D”: dermatitis, diarrea y demencia (FAO, 2002). Esta enfermedad no existe en los pueblos mesoamericanos que consumen maíz nixtamalizado (Serna, 2008).

Por otro lado, en México, la industria de las botanas ha crecido y diversificado su oferta de productos. Varios de ellos están elaborados con maíz, sobre todo con grano amarillo importado. Al analizar el comportamiento de su consumo se puede observar en la Tabla

4 que: en el año 2000 una persona consumía 1.8 gramos diarios de este tipo de botana, mientras que para 2012, aumentó a 11.0 gramos; es decir, se dio un crecimiento anual promedio del 16.1%. El incremento en el consumo de botanas es mayor en el medio rural, donde aumentó de 1.1 a 7.8 gramos al día (López, 2013). Esto se debe, probablemente a que este tipo de botanas son muy baratas.

**Tabla 4. Consumo diario *per cápita* de botanas \*. Tomada de López (2013).**

<b>Consumo de botanas (g/persona)</b>			
<b>Año</b>	General	Rural	Urbano
<b>2000</b>	1.8	1.1	2.1
<b>2012</b>	11.0	7.8	12.0
<b>Tasa de crecimiento</b>	16.1%	17.8%	15.7%
*Palomitas y frituras diversas, excepto papas fritas.			

## **2.5 MAÍZ TRANSGÉNICO.**

El maíz genéticamente modificado o maíz transgénico es aquel en el cual, mediante tecnología de ADN recombinante, se han insertado uno o varios genes o construcciones recombinantes que en conjunto expresan proteínas de interés biotecnológico, o afectan vías metabólicas para dar lugar a característica de interés agronómico, alimentario o industrial (Key, Ma, & Drake, 2008).

Existen variedades transgénicas de maíz modificadas para lograr “aumento” del rendimiento o crecimiento de la planta (p.ej. incremento en la biomasa de la mazorca) (ISAAA, 2015b), tolerancia a diferentes herbicidas (p.ej. glifosato, glufosinato de amonio), resistencia a varios tipos de insectos (p. ej. coleópteros y lepidópteros) , control de polinización (p.ej. esterilidad masculina, restauración de fertilidad), y producción aumentada de algún compuesto de interés (p.ej. aumento en la termoestabilidad de la enzima alfa-amilasa para su uso en la producción de bioetanol) (ISAAA, 2015b). Desde mediados de 2013 comenzaron a cultivarse en Estados Unidos, los primeros cultivos de maíz genéticamente modificado (GM) con tolerancia al estrés abiótico, específicamente con tolerancia a la sequía (ISAAA, 2015b).

En el mundo se encuentran disponibles comercialmente 143 eventos de maíz genéticamente modificado para diversos rasgos, la gran mayoría corresponden a maíz con tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos y se encuentran como eventos transgénicos apilados (ISAAA, 2015b).

Un evento transgénico se refiere a la recombinación única de ADN que se inserta en las células usadas en cultivo para dar lugar a una planta completa transgénica por medio de cultivo de tejidos (GMO Compass, 2015). Se utilizan marcadores genéticos para identificar las células transformadas; cada planta transgénica derivada de las células que incorporaron exitosamente el o los genes de interés y que resultan en la expresión óptima del transgén son considerados eventos “elite”; la línea transgénica derivada de dichas plantas, se identifica con una abreviación (p.ej. Bt176, NK603) (De Wolf *et al.*, 2010).

Los eventos de transformación difieren unos de otros en los elementos y genes insertados, en los sitios de inserción en el genoma de la planta, en el número de copias del inserto y en los patrones y niveles de expresión de las proteínas de interés. Los eventos además pueden acumularse por cruce convencional, dando como resultado una planta con varias características combinadas, lo que se conoce como eventos apilados (Watson & Preedy, 2015).

Para llevar a cabo una modificación genética en una célula, se utilizan vectores de transformación, los cuales incluyen una construcción quimérica o *cassette* de transformación que contiene por lo menos tres secuencias: secuencia promotora, gen de interés y secuencia terminadora (Kato *et al.*, 2013).

La secuencia promotora es la encargada de regular la expresión de un gen, el transgén de interés codifica para la proteína que se quiere producir en el maíz genéticamente modificado, y la secuencia terminadora delimita hasta dónde llega la ADN polimerasa para la transcripción del transgén (Álvarez-Buylla *et al.*, 2013).

### 2.5.1 Promotor CaMV 35S y T-NOS.

El virus del mosaico de la coliflor (CaMV) es un virus de ADN bicatenario que infecta a las plantas de los géneros *Cruciferae*, *Resedaceae* y *Solanaceae* (Holden et al., 2010). Para poder replicar su ADN y multiplicarse a sí mismo, el virus debe hacer que la maquinaria de la célula de la planta lo haga por él; para esto el virus contiene dos promotores (35S y 19S) al inicio de sus genes, y la planta al ser infectada usa estos promotores como si fueran propios (Steinbrecher, 2002). El promotor 35S de CaMV es el más utilizado en las construcciones transgénicas de los cultivos GM comercialmente disponibles, como el maíz, soya, algodón, canola y papaya, debido a que se expresa constitutivamente, anulando el sistema regulatorio de la planta, es decir, se enciende constantemente y no puede ser regulado o apagado por la planta (Steinbrecher, 2002).

El promotor es capaz de conferir altos niveles de expresión en la mayoría de las células, al ser transferidas a la planta; se han encontrado secuencias regulatorias clave que proveen dichos niveles de expresión. El promotor CaMV es una secuencia de cerca de 350 pares de bases río arriba del transcrito de 35S, cerca de 250 pares de bases que se superponen con la región 3' al final del gen (viral) VI, el último de seis largos marcos de lectura (Ho *et al.*, 1999). Los análisis de la secuencia del promotor han revelado la presencia de muchos elementos regulatorios que están dispersados a lo largo de todo el promotor; el promotor consiste en el núcleo promotor, que contiene la caja TATA y dos dominios principales A y B, con funciones potenciadoras o de *enhancers*, los cuales se han subdividido en muchos subdominios (Dutt *et al.*, 2014). La región o dominio A se requiere principalmente para la expresión en raíces, y la región B para la expresión en las hojas (Ho *et al.*, 1999).

Otros estudios identificaron elementos *cis* específicos en estos subdominios que confieren expresión en tejidos específicos en partes de la planta por arriba y por debajo del suelo. Diversas combinaciones de los elementos *cis* del promotor 35S pueden producir patrones de expresión de genes que no se observan sólo con el uso de dichos elementos, lo que sugiere una interacción entre los elementos *cis* para la expresión en distintas etapas del crecimiento y desarrollo de las plantas (Dutt et al., 2014). Aunque se considera que el promotor CaMV 35S dirige la expresión constitutiva, resultan efectos



variados en la expresión de su interacción con factores ambientales y por el estado del desarrollo de la planta, además que la expresión genética mediada por el promotor CaMV 35S parece ser especie-dependiente (Dutt *et al.*, 2014).

El promotor CaMV 35S puede funcionar tanto en plantas dicotiledóneas como en monocotiledóneas, líneas celulares de coníferas, algas verdes, bacterias como *Escherichia coli* y *Agrobacterium rhizogenes*, así como en células humanas (Álvarez-Buylla *et al.*, 2013).

El terminador T-NOS es el sitio de poliadenilación del ARN de la secuencia T-NOS del gen de la nopalina sintasa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*; es un elemento regulatorio para indicar el fin de la transcripción utilizado en muchas plantas transgénicas destinadas a la producción de alimentos (Holden *et al.*, 2010).

Existe evidencia que sugiere que la secuencia del terminador T-NOS es un sitio de alta recombinación, que en lugar de ser leído por la ADN polimerasa como una secuencia terminadora, continúa la transcripción y se generan nuevas moléculas de ARN, esta supresión genera marcos de lectura abiertos que podrían codificar para proteínas de fusión entre estas y las proteínas transgénicas (Rang, Linke, & Jansen, 2005).

### **2.5.2 Técnicas moleculares para la generación de OGMs. Biobalística y transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.**

La biobalística consiste en la unión del ADN recombinante a partículas muy pequeñas de oro o tungsteno que son posteriormente “disparadas” a alta presión dentro del tejido de la planta o de las células individuales de una planta; las partículas aceleradas penetran tanto la pared celular como las membranas, disminuyendo su velocidad conforme lo hacen, finalmente el ADN se separa de la partícula de metal y puede integrarse en el material genético dentro del núcleo de las células (Morin, 2008). Este método ha sido utilizado exitosamente en varios cultivos, especialmente en plantas monocotiledóneas como el trigo o el maíz; una desventaja de este procedimiento es el daño que se produce en el tejido celular (Sanford, 1990).

Otro de los métodos más utilizados es la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, esta bacteria del suelo es un patógeno vegetal que transfiere un segmento de su propio ADN dentro de las plantas hospederas, lo que produce una proliferación de células en las partes de la planta más cercanas al nivel del suelo (tumores del cuello o *Crown Gall disease*) (Tomlinson & Fuqua, 2009).

La información genética para el crecimiento tumoral está codificada en un fragmento móvil de ADN circular o plásmido, llamado plásmido-Ti (Ti= *tumor inducing*), cada extremo de la secuencia de T-DNA lleva señales genéticas especializadas para permitir la transferencia genética de forma natural; cuando *Agrobacterium* infecta una planta, transfiere el T-DNA en un sitio aleatorio del genoma de la planta (Escobar & Dandekar, 2003).

La habilidad natural de *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza en la ingeniería genética para transformar plantas a través de la transferencia de genes externos dentro de plantas, para lograr esto, el T-DNA (vector) se corta del plásmido bacteriano y se reemplaza con el gen externo deseado; la transferencia de genes con agrobacterias es un método que funciona especialmente bien para plantas dicotiledóneas como papas, tomates y tabaco. Sin embargo, en las últimas dos décadas se ha logrado adecuar para plantas monocotiledóneas como el maíz (Hiei *et al.*, 2014).

## **2.6 MAÍZ TRANSGÉNICO TOLERANTE A HERBICIDAS.**

Los cultivos transgénicos tolerantes a herbicidas son utilizados junto con un herbicida no selectivo que afecta a todas las plantas sensibles, mediante la interrupción de una vía metabólica esencial, y no a las plantas genéticamente modificadas. Los sistemas comerciales más utilizados de control de malezas, que incluyen una planta transgénica y el herbicida correspondiente, son: Roundup Ready® (ingrediente activo: glifostato) y Liberty Link (ingrediente activo: glufosinato) (Mulwa & Mwanza, 2006).

Mundialmente se encuentran disponibles 121 eventos transgénicos de maíz (simples y apilados) de resistencia a herbicidas (ISAAA, 2015b). En la siguiente tabla se observan los genes utilizados por la biotecnología para conferir tolerancia a herbicidas en los cultivos transgénicos aprobados para consumo en México.

**Tabla 5. Genes utilizados para conferir tolerancia a herbicidas en algunos de los eventos transgénicos disponibles comercialmente en el mundo (ISAAA, 2015).**

<b>Característica: Tolerancia al herbicida glufosinato</b>			
<b>Gen</b>	<b>Origen del gen</b>	<b>Producto</b>	<b>Función</b>
bar	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Enzima fosfinotricina N-acetiltransferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfinotricina) por acetilación
pat	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	Enzima fosfinotricina N-acetiltransferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfinotricina) por acetilación
pat (syn)	Forma sintética del gen pat derivado de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> cepa Tu 494	Enzima fosfinotricina N-acetiltransferasa (PAT)	Elimina la actividad herbicida del glufosinato (fosfinotricina) por acetilación
<b>Característica: Tolerancia al herbicida glifosato</b>			
<b>Gen</b>	<b>Origen del gen</b>	<b>Producto</b>	<b>Función</b>
2mepsps	<i>Zea mays</i>	Enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (version doble mutante)	Disminuye la afinidad de unión para el glifosato, aumentando así la tolerancia al herbicida
cp4 epsps (aroA:CP4)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa CP4	Forma tolerante al herbicida de 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS)	Disminuye la afinidad de unión para el glifosato, aumentando así la tolerancia al herbicida
epsps grg23ace5	Gen sintético; similar al gen epsps grg23 de la bacteria del suelo <i>Arthrobacter globiformis</i>	Enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) o proteína EPSPS ACE5	Confiere tolerancia a herbicidas con glifosato
goxv247	<i>Ochrobactrum anthropi</i> cepa LBAA	Glifosato oxidasa	Confiere tolerancia a herbicidas degradando el glifosato a ácido aminometilfosfónico y (AMPA) y glioxilato
mepsps	<i>Zea mays</i>	Enzima modificada 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS)	Confiere tolerancia a herbicidas con glifosato

### 2.6.1 Glifosato.

Se han desarrollado numerosas variedades de maíz transgénico tolerante a distintos herbicidas. Sin embargo, el glifosato es el herbicida más utilizado en los cultivos transgénicos y su uso ha aumentado exponencialmente en los últimos años a partir de la introducción de dichos cultivos (Marquez *et al.*, 2016).

El nombre común “glifosato” es utilizado indiscriminadamente en la literatura publicada, denominando a varios compuestos químicos que difieren substancialmente de la sal de isopropil amina de N-fosfonometil glicina o sal IPA de glifosato (en inglés, glyphosate-IPA salt), por ejemplo, el ácido de glifosato grado técnico (Cuhra *et al.*, 2016).

Se utilizan varios tipos de glifosato como ingrediente activo en los herbicidas, estos son principalmente las sales: isopropil amina de glifosato, glifosato de amonio, glifosato-sesquisodio y glifosato-trimesio. Debido a su solubilidad en agua, son estas sales de glifosato las que se utilizan en las formulaciones de herbicidas para la agricultura y, por lo tanto, son liberadas al ambiente y son la fuente de los residuos o metabolitos encontrados subsecuentemente en los alimentos (Cuhra *et al.*, 2016).

El glifosato se utiliza para el control de malezas como un herbicida complementario en conjunto con plantas genéticamente modificadas (marca comercial: Roundup®) (Monaco *et al.*, 2002). El glifosato se asperja en las hojas de los cultivos, en donde es absorbido y transportado a través de toda la planta, una vez dentro inhibe la enzima 5-enolpiruvatoshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), necesaria para la producción de aminoácidos aromáticos esenciales para la planta como: fenilalanina, tirosina y triptófano (Villalba, 2009). Si el glifosato previene que la planta produzca estos aminoácidos, esta dejará de crecer y morirá dentro de los siguientes tres a siete días; debido a su efecto tóxico en casi todas las plantas, ha sido utilizado como un herbicida de amplio espectro alrededor del mundo por más de 20 años (Funke *et al.*, 2006).

Los métodos para introducir resistencia a glifosato en plantas son principalmente dos: 1) la expresión de una forma insensible de la enzima EPSPS, 2) la detoxificación de la molécula de glifosato (Pollegioni *et al.*, 2011).

El método más común para conferir tolerancia al herbicida glifosato en las plantas, consiste en aislar un gen (cp4 epsps) de la cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* el cual es transferido a la planta, el gen codifica para la enzima CP4-EPSPS, la cual presenta una conformación alterada debido a cambios en la secuencia de aminoácidos fuera de su sitio activo, como resultado el herbicida no se une para inhibir la producción de aminoácidos esenciales y por tanto la planta GM puede ser tratada con glifosato sin que sufra ningún efecto nocivo en ella (Pollegioni et al., 2011).

A nivel mundial existen 121 eventos aprobados de maíz resistente a algún herbicida y México hasta ahora ha aprobado para su consumo 57 eventos transgénicos de este tipo, los cuales en su mayoría se encuentran como eventos apilados (ISAAA, 2015b).

### **2.6.2 Uso de herbicidas desde la introducción de OGMs.**

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) es la agencia especializada en cáncer de la Organización Mundial de la Salud. En 2015 dicha agencia realizó una evaluación sobre la carcinogenicidad de cinco pesticidas organofosforados, entre ellos el glifosato (IARC/WHO, 2015). El glifosato fue clasificado como probable carcinogénico (Grupo 2A). En la clasificación establecida por la IARC, que una sustancia sea categorizada en el grupo 2A significa que es probablemente carcinogénico en humanos. Dicha categoría es utilizada cuando hay evidencia limitada de carcinogenicidad en humanos y evidencia suficiente de carcinogenicidad en animales experimentales. Evidencia limitada significa que hay una asociación positiva que se ha observado entre la exposición al agente y el cáncer, pero que no se pueden descartar otras explicaciones para las observaciones (tales como el azar, sesgo, etc.); esta categoría también se utiliza cuando existen datos contundentes de cómo el agente causa cáncer (IARC/WHO, 2015).

Para el caso del glifosato, la IARC concluyó que existe suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales de laboratorio. Algunos estudios revisados para esta evaluación demostraban que en comunidades donde había sido asperjado glifosato, el herbicida también causó daño cromosomal y al ADN en células humanas, así como un

aumento en marcadores de daño cromosomal en muestras de sangre de pobladores una comunidad (Guyton *et al.*, 2015).

En el informe de la IARC se menciona que el glifosato es el herbicida más utilizado en la agricultura a nivel mundial, además de que su uso se ha incrementado a partir del desarrollo de cultivos genéticamente modificados para ser resistentes a éste, también se ha utilizado en la silvicultura, en zonas urbanas y para aplicaciones domésticas, se ha detectado en el aire, en el agua y en diversos alimentos; la población en general está expuesta a glifosato principalmente a través de la fumigación cerca de zonas residenciales, por el uso en el hogar, y en la dieta, aunque según el reporte los niveles detectados son generalmente bajos (IARC/WHO, 2015).

Para determinar si sólo los individuos que están en contacto directo con glifosato o con alimento para ganado contaminado con el mismo, estaban en riesgo de envenenamiento por glifosato, se condujo un estudio en una población urbana en Berlín, se examinó la orina de empleados, periodistas y abogados, que no tenían contacto directo con glifosato y ni con actividades agrícolas. El estudio encontró glifosato en todas las muestras de orina en valores que van de los 0.5 a 2 ng de glifosato por mL de orina, siendo que el límite para agua potable es de 0.1 ng/mL (Brändli & Reinacher, 2012).

También se ha encontrado glifosato en muestras de sangre y orina de trabajadores agrícolas, indicando absorción, como las bacterias del suelo degradan el glifosato a AMPA (ácido aminometilfosfónico), el AMPA en la sangre de los trabajadores que sufrieron envenenamiento sugiere que las bacterias de la microbiota intestinal humana metabolizan el herbicida (Guyton *et al.*, 2015).

A partir de la clasificación del glifosato como probable carcinogénico se ha intensificado el debate público sobre los cultivos genéticamente modificados (Frayssinet, 2015). Aunado a esto, desde hace ya varios años se ha descubierto un rápido aumento en la emergencia de malezas tolerantes a glifosato (TG) (Duke & Powles, 2009).

A pesar de que algunos expertos y organizaciones afirman que los cultivos genéticamente modificados han disminuido en general el uso de pesticidas, a partir de

los datos disponibles del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y estudios independientes como los que ha realizado la Unión de Científicos Comprometidos (UCS) en el mismo país, se ha podido determinar cuál ha sido el verdadero efecto de estos cultivos.

En Estados Unidos entre 1996 y 2011 se cultivaron 550 millones de hectáreas de maíz tolerante a herbicidas (TH). En 2011 el 72% del maíz sembrado correspondía a maíz TH (Benbrook, 2012) y actualmente se calcula que alrededor del 90% del maíz cultivado es tolerante a glifosato (Benbrook, 2016).

Actualmente los cultivos tolerantes a glifosato o Roundup Ready® (RR) representan la mayoría de los cultivos TH a nivel mundial (ISAAA, 2015b). Estos cultivos fueron adoptados porque en su momento se ofreció a los agricultores un sistema de manejo de malezas más simple y flexible que los sistemas de dosis bajas, ya que prometía ser más eficaz contra las malezas no deseadas e implicaba menor tiempo y esfuerzo para eliminarlas (Gurian-Sherman & Mellon, 2013); como consecuencia desde 1996 y hasta 2008, los cultivos tolerantes a herbicidas diferentes al glifosato, desaparecieron o se plantaron en relativamente pocas hectáreas (p.ej. tolerantes a glufosinato: algodón y maíz Liberty Link) (Benbrook, 2012).

Como se observa en la Tabla 6, al comparar la tasa de uso de glifosato por hectárea en cultivos no-TH, los cultivos TH han incrementado el uso de glifosato en los Estados Unidos en un estimado de 993 millones de kilogramos de 1995 a 2014 comparado con años anteriores, sólo en la década de 2005 a 2014 se utilizaron 1,070 millones de kilogramos, lo que representó alrededor del 71% del uso de glifosato desde la introducción de los cultivos transgénicos (Benbrook, 2016).

**Tabla 6. Uso de glifosato en Estados Unidos: 1974-2014 (miles de kilogramos). Modificado de (Benbrook, 2016).**

	1974	1982	1990	1995	2000	2005	2010	2012	2014
<b>Uso de glifosato (1000kg)</b>	635	3538	5761	18,144	44,679	81,506	118,298	118,753	125,384
<b>Uso Agrícola (1000kg)</b>	363	2268	3357	12,474	35,720	71,441	106,963	113,356	107,192
<b>Uso No- agrícola (1000kg)</b>	272	1270	2404	5670	8958	10,065	11,335	11,562	12,029
<b>Aportación agrícola (%)</b>	57.1	64.1	58.3	68.8	79.9	87.7	90.4	90.3	90.4
<b>Aportación no agrícola (%)</b>	42.9	35.9	41.7	31.3	20.1	12.3	9.6	9.7	9.6

En Estados Unidos, el incremento del uso de glifosato en maíz ha crecido exponencialmente, especialmente después de la introducción del maíz GM, del año 2000 al 2005 hubo un dramático incremento de más del 500%, y posteriormente en 2010 el incremento fue de alrededor del 270% (Tabla 7). En 2012, tan solo en Estados Unidos se aplicaban 31 millones de kilogramos de glifosato en los cultivos de maíz GM y un total de 70.2 millones de kilogramos en todo el mundo (Tabla 8).

**Tabla 7. Cantidad de glifosato aplicado en maíz de 1990-2014 en Estados Unidos. Modificado de (Benbrook, 2016).**

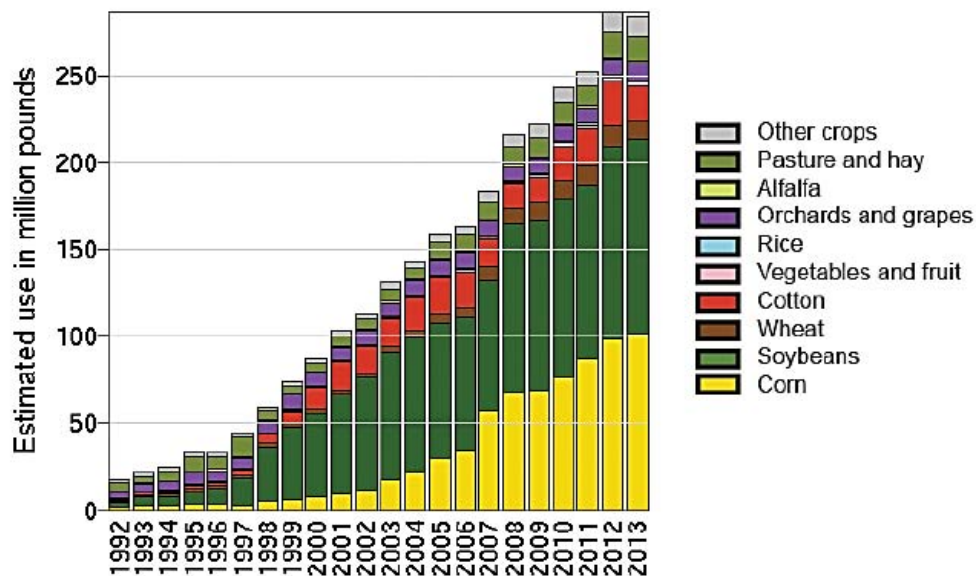
<b>Año</b>	<b>Uso de glifosato en maíz en Estados Unidos (kg)</b>
<b>1990</b>	399,191
<b>1995</b>	1,188,802
<b>2000</b>	2,167,856
<b>2005</b>	11,606,106
<b>2010</b>	31,522,095
<b>2014</b>	31,274,945



**Tabla 8. Uso de glifosato en maíz tolerante a herbicidas (millones de kilogramos). Modificado de (Benbrook, 2016).**

Uso de Glifosato en maíz TH	2010	2011	2012
Norteamérica (millones de kg)	26.1	28.5	31.0
Resto del mundo (millones de kg)	21.63	37.1	39.2
Total (millones de kg)	47.7	65.6	70.2

El glifosato es un herbicida de dosis relativamente alta que se aplica usualmente en una tasa entre 0.67 y 0.9 kg por hectárea; debido a que el herbicida no se puede asperjar en las plantas no-GM, raramente se habían observado residuos de glifosato en alimentos (Benbrook, 2012). Sin embargo, se ha dado un aumento del número de aplicaciones de glifosato al final de temporada en trigo, cebada y otros cultivos (Figura 4), utilizándolo como desecante para los cultivos maduros como ayuda para la cosecha, y también como control para malezas (Marquez *et al.*, 2016).



**Figura 4. Uso de glifosato por año y cultivo en Estados Unidos. Tomado de (Marquez *et al.*, 2016).**

En el año 2010 en Reino Unido, se realizó un estudio en el que 5.6% de 107 muestras de pan contenían residuos de glifosato. Tres de esas muestras contenían 0.5 ppm de glifosato, un nivel relativamente alto comparado con los demás pesticidas encontrados

en dichas muestras de pan. (United Kingdom Health and Safety Executive & Pesticide Residues in Food, PRiF, 2010).

Aunado a esto, el USDA, ha dejado de monitorear el uso de pesticidas en soya desde el 2006 debido a recortes de presupuesto, justo cuando comenzaron a generarse malezas resistentes a glifosato y por lo tanto también a incrementarse el uso de herbicidas en algunas zonas de Estados Unidos (Benbrook, 2012).

El uso de pesticidas en general (herbicidas e insecticidas), por los cultivos GM, aumentó un total de 183 millones de kilogramos en Estados Unidos desde 1996, comparado con el uso de pesticidas que hubiera habido en ausencia de cultivos GM, lo que representa un aumento del 7% en uso de pesticidas y un incremento de 0.21 kg/ha del ingrediente activo por cada hectárea plantada con cultivos GM (Benbrook, 2012).

### **2.6.3 Malezas resistentes a glifosato.**

Después de la adopción de los cultivos TH, el aumento en el uso de herbicidas ha producido un incremento en el número de malezas resistentes, antes de la adopción de cultivos RR prácticamente no se conocían las malezas resistentes a glifosato (Benbrook, 2012). Por otro lado, la respuesta de las industrias de semillas y pesticidas para solucionar el problema de malezas resistentes ha sido ofrecer una nueva generación de cultivos tolerantes no sólo a glifosato, sino también a herbicidas más viejos y tóxicos, como dicamba y 2,4-D (Gurian-Sherman & Mellon, 2013), por lo que el resultado final es un mayor uso de agrotóxicos que sólo exacerbarán el problema actual.

A mediados de 1990, científicos de Monsanto, creadores de la tecnología Roundup Ready® (RR), publicaron un artículo argumentando con base en la historia de alrededor de 20 años en el uso de herbicidas, que la evolución de malezas resistentes era poco probable, y la relativa ausencia de malezas resistentes (Bradshaw, 1997).

De acuerdo a la Sociedad Americana de Ciencia de las Malezas (WSSA, por sus siglas en inglés), hasta 2012 más de 5.7 millones de hectáreas se encontraban infestadas con malezas resistentes a glifosato (WSSA, 2012). En 2015 la WSSA enlistó 34 especies de malezas resistentes a glifosato ([www.weedscience.org](http://www.weedscience.org)). Otro estudio sugiere que

alrededor de 40 millones de hectáreas se encuentran afectadas por malezas resistentes a glifosato en Estados Unidos (Abel, 2015).

Las malezas resistentes a glifosato se han convertido en un serio problema a causa de la dependencia total al herbicida debido a que los cultivos TG hacen posible la aplicación de glifosato durante toda la temporada de crecimiento (Gurian-Sherman & Mellon, 2013), por lo que el uso constante ha puesto a las poblaciones de malezas bajo una presión de selección progresivamente intensificada y sin precedentes, desencadenándose las condiciones perfectas para la emergencia de malezas resistentes a dicho herbicida (Mortensen, 2012). El mecanismo para la resistencia a glifosato se debe a que la amplificación del gen *epsps*, es decir, el aumento en el número de copias del gen, es heredable, cuestión que pondría en riesgo el “éxito” de los cultivos tolerantes a glifosato así como la sustentabilidad del glifosato como el herbicida más importante del mundo (Gaines *et al.*, 2010).

La generación de resistencia a glifosato representa también una amenaza económica, en el caso del algodón ya ha sucedido que los productores estadounidenses se han visto forzados a dejar de cosechar sus cultivos debido a la invasión de malezas como el amaranto (Benbrook, 2012). Los productores, al tratar de resolver dicho problema, han aumentado las tasas de aplicación del herbicida que utilizan, realizan múltiples aplicaciones y aplican ingredientes activos adicionales de diferentes herbicidas; además de implementar otras estrategias que, junto con la tecnología transgénica de tolerancia a herbicidas, evidentemente incrementan los costos de producción (Benbrook, 2012).

Se ha encontrado que el manejo de malezas incrementan los costos por hectárea entre 50% y 100% o incluso más en aquellos campos con infestación con malezas resistentes a glifosato (Abel, 2015). Los costos asociados a la tecnología de TH incluyen además de los herbicidas, el de la semilla genéticamente modificada para resistir a la aplicación de éstos. En la década de 1970 los agricultores estadounidenses podían guardar semilla de maíz para replantar, con la transición hacia la compra de semilla de maíz híbrida convencional y finalmente con el uso de semilla de maíz GM se ha dado un aumento en los costos por hectárea (período 1975-2011) calculado en alrededor de 920% (Marquez *et al.*, 2016; Benbrook, 2012).

Por otro lado, si se aprobaran más cultivos tolerantes al 2,4-D y dicamba, el uso de dichos herbicidas podría significar el mismo problema que con el glifosato debido a que existen por lo menos nueve malezas resistentes al 2,4-D (WSSA, 2012). Las malezas resistentes a glifosato emergen en campos aislados, pero su polen, genes y semillas pueden viajar extensivamente y se pueden esparcir rápidamente, especialmente si el glifosato sigue siendo ampliamente utilizado (Owen, 2008). Desafortunadamente se espera que crezca el número de hectáreas de cultivos resistentes a glifosato, como consecuencia también las poblaciones de malezas resistentes al mismo y por lo tanto se incrementará tanto el número de herbicidas utilizados como la cantidad en kg que se aplica (Benbrook, 2012).

#### **2.6.4 Riesgos potenciales a la salud humana por la exposición y/o consumo de glifosato.**

Se ha incrementado la preocupación sobre los riesgos e impactos a la salud que tiene el uso intensivo de herbicidas. Hasta hace un tiempo las evaluaciones de riesgo estimaban que el glifosato se encontraba entre los herbicidas más seguros en términos de daños a la salud (Benbrook, 2012).

Dado que ya se ha demostrado que existen residuos de herbicidas en los alimentos, se han llevado a cabo numerosos estudios con modelos animales sobre la toxicidad al herbicida glifosato, lo que permite tener una perspectiva sobre los daños potenciales a la salud humana (Bøhn, 2014).

En la investigación biomédica los ensayos con animales modelo (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, cerdos, simios) son ampliamente usados para estudiar el grado de toxicidad y los daños colaterales ocasionados por nuevos medicamentos o productos comerciales en humanos, animales o el medio ambiente (Dell, 2000).

Algunos de los estudios incluyen la evaluación de los efectos adversos que pueden ocurrir con una primera exposición o una única dosis de alguna sustancia (toxicidad aguda), otros estudios buscan evaluar el potencial de una sustancia para interactuar con el material genético (genotoxicidad), otros estudios buscan identificar si la toxicidad ocurre después de una exposición continua a una sustancia (estudios de toxicidad de dosis

repetida), otros estudios se llevan a cabo para encontrar si algún tipo de cáncer se desarrolla como resultado de la exposición a ciertos químicos, y otros que se realizan para asegurar la inocuidad de medicamentos o sustancias (Nuffield BioEthics, 2014). Existen investigaciones sobre el efecto a nivel de salud animal (por ejemplo, ratas o cerdos) por el consumo de organismos genéticamente modificados.

La toxicidad de las formulaciones de herbicidas no puede ser completamente entendida sin conocer la toxicidad específica de cada uno de sus componentes y de sus efectos combinados. Sorprendentemente, para medir sus efectos adversos, los principios activos de los herbicidas se evalúan a nivel regulatorio de forma individual, sin embargo los adyuvantes, son clasificados como inertes sin llevar a cabo una adecuada evaluación (Mesnage *et al.*, 2013).

El herbicida comercializado por la compañía Monsanto como Roundup<sup>®</sup>, es una mezcla de glifosato y varios adyuvantes a diferentes concentraciones, éstos últimos han sido poco estudiados y se han medido poco en el ambiente ya que usualmente se consideran inertes y están protegidos como “secreto comercial”; sin embargo, dentro de estos adyuvantes, uno de los más predominantes es el POEA o POE-15 (polioxietilenamina), el cual tiene cierta toxicidad por sí solo y en combinación con glifosato, la formulación se vuelve más activa (Williams *et al.*, 2000). Estos adyuvantes, facilitan la penetración del glifosato a través de las membranas plasmáticas, potencializando su acción e incrementando su estabilidad y bioacumulación (Benachour & Séralini, 2009).

Uno de los estudios más recientes sobre toxicidad del herbicida Roundup<sup>®</sup> que utilizó el análisis de perfil transcriptómico y se realizó en un modelo sistémico de ultra-baja dosis ambiental en animales de laboratorio, sugiere que la exposición crónica a herbicidas basados en glifosato, puede resultar en daño hepático y renal con implicaciones potencialmente significativas para poblaciones humanas y animales (Mesnage *et al.*, 2015). Se encontraron perturbaciones en genes los cuales reflejaron condiciones lipotóxicas en riñón e hígado, relacionadas con la administración crónica del herbicida Roundup<sup>®</sup>, además de un incremento en el crecimiento celular que puede estar relacionado un mecanismo de regeneración en respuesta a los efectos tóxicos causados por el daño tisular. Se observaron patologías a nivel bioquímico, histológico y anatómico,

lo que se relacionó con las alteraciones observadas en la expresión de genes (Mesnage *et al.*, 2015).

En 2009 se publicó un artículo en el que se evaluaba la toxicidad de formulaciones del herbicida Roundup® en tres diferentes tipos de células humanas: umbilicales, embrionarias y placentarias. Los niveles de dilución utilizados estaban muy por debajo de los recomendados en la agricultura, y correspondían a bajos niveles de residuos en alimentos. Todas las formulaciones causaron muerte celular total en las primeras 24 horas por inhibición de la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, y necrosis por la liberación de adenilato cinasa citosólica indicando daño a la membrana, también indujeron apoptosis vía activación enzimática de caspasas, lo que fue confirmado por una característica fragmentación del ADN, picnosis nuclear (condensación de la cromatina) y cariorrexis (estallido del núcleo de la célula) (Benachour & Séralini, 2009).

En el mismo estudio se evaluó el ácido aminometilfosfónico (AMPA), que es el principal metabolito del glifosato, así como el adyuvante POEA (presente en la formulación de Roundup®), se observó que estas dos moléculas por separado y también de forma sinérgica dañan las membranas celulares, tal y como lo hace el herbicida Roundup® pero a diferentes concentraciones. Las mezclas fueron generalmente aún más dañinas con glifosato. En conclusión el estudio confirmó que los adyuvantes como POEA cambian la permeabilidad de las membranas celulares humanas y amplifican la toxicidad ya inducida por el glifosato a través de apoptosis y necrosis, y el herbicida además de daño celular, puede causar muerte celular a concentraciones residuales que pueden esperarse en alimentos derivados de cultivos tratados con el herbicida Roundup® (Benachour & Séralini, 2009).

Posteriormente en 2013 el mismo grupo de investigación evaluó la toxicidad de los adyuvantes del herbicida Roundup® en células hepáticas, embrionarias y placentarias humanas, demostrando que las 9 formulaciones (a diferentes concentraciones de los adyuvantes etoxilados) a base de glifosato utilizadas fueron más tóxicas que el glifosato por sí solo. De todas las formulaciones utilizadas, el POE-15 fue el más tóxico en células

humanas, teniendo efectos en la respiración celular y en la integridad de la membrana a dosis ocupacionales/ambientales de 1 y 3 ppm (Mesnage *et al.*, 2013).

En otro estudio se demostró que el herbicida Roundup<sup>®</sup>, causa pronunciados efectos citotóxicos en células epiteliales de tejido bucal. Por otra parte, las pruebas de genotoxicidad demostraron que tanto el compuesto activo glifosato como su formulación Roundup<sup>®</sup> inducen ruptura del ADN, así como anomalías nucleares que reflejan inestabilidad del mismo, incluyendo daño cromosomal. Se observó que la formulación Roundup<sup>®</sup>, produce daño en la membrana celular e interfiere con la síntesis de proteínas a una concentración de 10 mg/L (Koller *et al.*, 2012). La formulación de Roundup<sup>®</sup> probada en este estudio contenía 450 g/L de glifosato y debía ser diluido según las instrucciones del fabricante a 1-3% antes de su uso (concentración final 4,500-13,500 mg/L). El hecho de que se hayan encontrado efectos agudos y genotóxicos significativos en concentraciones entre 10 y 20 mg/L después de 20 min, indica que una exposición corta a una dilución asperjada puede causar efectos adversos en células de la cavidad oral y posiblemente en epitelio respiratorio (Koller *et al.*, 2012).

Se conoce que alrededor del 90% de todos los casos de cáncer en humanos tienen un origen epitelial (Cooper, 2000), por lo que las observaciones del daño al ADN en células epiteliales de la cavidad oral, podría ser un indicio de potenciales efectos adversos en la población por el uso de herbicidas a base de glifosato (Koller *et al.*, 2012).

Además de este estudio existen muchos otros que desde hace más de una década indican que existe una correlación entre la exposición a glifosato y una elevada incidencia de diferentes tipos de cáncer en humanos, tales como: mieloma múltiple (De Roos *et al.*, 2005) y linfoma no-Hodgkin (Eriksson *et al.*, 2008).

Existen más evidencias que sugieren que los residuos de herbicidas a base de glifosato representan un riesgo para las funciones del hígado y riñón: se observaron efectos hepáticos del glifosato incluyendo su habilidad para interrumpir la fosforilación oxidativa mitocondrial en el hígado de ratas (Olorunsogo *et al.*, 1979), también se había observado su habilidad transportar protones al aumentar la permeabilidad de la membrana mitocondrial a los protones  $\text{Ca}^{2+}$  (Olorunsogo, 1990), puede desencadenar la producción

de especies reactivas de oxígeno, lo que resulta en estrés oxidativo (De Liz Oliveira *et al.*, 2013).

Se ha detectado una elevación en los marcadores de estrés oxidativo en hígado y riñón de ratas después de exposición subcrónica a herbicidas a base de glifosato a la concentración permitida de glifosato en agua potable en Estados Unidos (700 µg/L) (Larsen *et al.*, 2012). También se han observado cambios histológicos en hígado y alteraciones bioquímicas clínicas en ratas que consumían 4.87 mg/kg p.c. de glifosato cada 2 días por un período de 75 días (Benedetti *et al.*, 2004).

En estudios metabólicos realizados en animales de granja y de laboratorio, se observaron niveles de glifosato y AMPA en tejidos de hígado y riñón que eran 10 o hasta 100 veces mayores que los niveles encontrados en tejido adiposo, muscular y otros tejidos (BfR, 2014). En vacas lecheras, los niveles elevados de glifosato en orina se han correlacionado con alteraciones en parámetros bioquímicos de plasma sanguíneo, que son indicativos de estrés oxidativo en hígado y riñón y de reducción en los niveles de micronutrientes (Krüger *et al.*, 2013).

Además de los efectos citotóxicos, se ha sugerido que los herbicidas a base de glifosato pueden interrumpir diversos sistemas de señalización endócrina, incluyendo vías como las del estrógeno pudiendo ejercer efectos proliferativos en cáncer de mama dependiente de hormonas (Thongprakaisang *et al.*, 2013) y la vía del ácido retinoico, teniendo efectos teratogénicos en anfibios (Paganelli *et al.*, 2010) y mamíferos (Antoniou *et al.*, 2012).

Cuando se realizan aplicaciones de glifosato al final de la temporada de crecimiento, es más probable que haya residuos de glifosato en los cultivos de silaje o forraje. Como resultado se han encontrado residuos de herbicidas en leche, carne y otros productos animales; también, cuando se aplican herbicidas en temporadas calurosas, aumenta el riesgo de que estos se volatilicen y viajen por el aire, exponiendo a las poblaciones por este medio así como por el agua o con los cultivos que crecen a la proximidad (Benbrook, 2012).



En general, la regulación de químicos potencialmente tóxicos, por ejemplo, los herbicidas, se basa en la información científica producida por la industria, que a menudo tiene fuertes incentivos financieros para su uso sin restricciones (Cuhra, 2015). Existe una paradoja sobre la regulación de glifosato ya que, a medida que ha aumentado la evidencia que demuestra su alta toxicidad, también ha aumentado el límite máximo residual (LMR) (Cuhra *et al.*, 2016). En teoría, en las políticas basadas en investigación científica, la evidencia de mayor toxicidad por una sustancia o producto, debería tener como efecto una disminución en los niveles de aceptación por las agencias regulatorias. En el caso del glifosato, la evolución sobre su regulación ha sido lo opuesto: el incremento en su aceptación está positivamente relacionado con su toxicidad (Cuhra *et al.*, 2016).

En 2002, la Unión Europea estableció una ingesta diaria admisible (IDA) para la exposición diaria a glifosato, de 0.3 miligramos por kilogramo de peso corporal por día (mg/kg p.c /d) (FOEE, 2013a), esto significa que un consumo “aceptable” de residuos de glifosato para un niño de 20 kg sería de 6mg. La FAO ha establecido una IDA mayor, de hasta 1 mg/kg p.c./día, lo que significa que sería aceptable para un niño de 20 kg consumir 20mg de glifosato cada día (FAO, 2016) y el límite máximo residual establecido por el Codex Alimentarius de la FAO, es de 5 mg/kg de glifosato en maíz.

Se ha sugerido que la IDA debería fijarse en 0.025 mg/kg p.c/día (Antonioniou *et al.*, 2012)., con base algunos estudios toxicológicos donde se encontró que el herbicida es un potente disruptor hormonal y que altera el desarrollo reproductivo en ratas que fueron expuestas durante la pubertad (Romano *et al.*, 2010) y que también causa daño irreversible a células hepáticas de ratón (Benedetti *et al.*, 2004). en dosis inferiores a los establecidos por la FAO.

Desde 1991, el USDA conduce un programa que recolecta datos sobre residuos de pesticidas en alimentos. Sin embargo, en el último reporte sobre pesticidas no se incluye información sobre glifosato, a pesar de la clasificación del herbicida como probable agente carcinogénico, no se han actualizado los límites residuales permitidos ni la ingesta diaria admisible en la base de datos disponible del USDA, y actualmente no se realizan pruebas para detectar residuos en alimentos (Gillam, 2013; USDA, 2016).

En una extensa revisión de artículos científicos que comprueban los efectos dañinos del glifosato, se ha descrito que el herbicida, inhibe las enzimas del citocromo P450 (CYPs), las cuales están implicadas en la detoxificación de xenobióticos, incrementando así los efectos dañinos de otros residuos químicos transmitidos por alimentos y toxinas ambientales. El impacto negativo puede presentarse lentamente con el tiempo al dañar sistemas celulares en el organismo. Se observó cómo la interferencia del herbicida con las enzimas CYPs, actúa sinérgicamente en la disrupción de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos que llevan a cabo las bacterias de la microbiota intestinal, así como en el deterioro del transporte de sulfato. Por lo que la ingesta de glifosato se ha relacionado con muchas de las enfermedades asociadas con una dieta occidental: desórdenes gastrointestinales, obesidad, diabetes, enfermedades del corazón, depresión, autismo, infertilidad, cáncer y Alzheimer (Samsel & Seneff, 2013b).

En una segunda entrega de esta revisión, los autores analizaron los estudios científicos que han relacionado al glifosato con la enfermedad celíaca (alergia al gluten), entre una de sus causas está el deterioro de las enzimas del citocromo P450, que a su vez produce deficiencias de vitamina D3 y vitamina A. También se ha observado la capacidad del glifosato para quelar elementos como el hierro, cobalto, molibdeno y cobre, cuyas deficiencias también se relacionan con esta enfermedad (Samsel & Seneff, 2013a).

Un estudio realizado en Estados Unidos, encontró glifosato en dos tercios y hasta en un 100% en muestras de aire y agua de lluvia, en Mississippi y Iowa (Chang *et al.*, 2011), cuestión que demuestra cómo el uso intensivo de este tipo de agroquímicos no permanece únicamente en el lugar de aplicación.

Los anfibios son especialmente vulnerables a la exposición con pesticidas, debido a que pueden absorber químicos a través de su piel, así como también a través de la alimentación. En experimentos de laboratorio, los embriones de rana expuestos a diluciones de herbicidas que contenían glifosato mostraron malformaciones craneales y faciales, así como acortamiento corporal, microcefalia y defectos oculares, también en ranas adultas también se observaron efectos adversos anatómicos (Paganelli *et al.*, 2010).

Gracias a estudios existentes sobre los efectos de los herbicidas como el de Paganelli y colaboradores, así como del estudio epidemiológico en Paraguay que encontró que las mujeres que estuvieron expuestas a herbicidas asperjados en zonas agrícolas durante el embarazo tuvieron descendencia con defectos de nacimiento, particularmente microcefalia, anencefalia y malformaciones craneales (Benítez-Leite, Macchi, & Acosta, 2009), en Argentina se empezaron a investigar los efectos del glifosato.

Se encontraron reportes sobre el incremento en defectos de nacimiento y abortos espontáneos en áreas cultivadas con cultivos genéticamente modificados en Argentina, las familias afectadas habitaban zonas localizadas a unos metros de donde se asperjaban herbicidas (Antonioniou *et al.*, 2010); un estudio previo confirmó que el glifosato y su formulación Roundup<sup>®</sup>, pueden pasar a través de la placenta humana y llegar al compartimento fetal, donde además dañan las células embrionarias humanas (Benachour *et al.*, 2007; Poulsen *et al.*, 2009).

#### **2.6.5 Impactos ambientales del herbicida glifosato.**

Sobre los impactos ambientales ligados a la tecnología de tolerancia a herbicidas, uno de los más estudiados ha sido la capacidad de deterioro que tiene el glifosato sobre las comunidades microbianas del suelo, de forma que aumenta la vulnerabilidad de las plantas hacia los organismos patógenos como *Fusarium*, debido a que en la tierra que rodea la raíz de la planta de maíz se incrementa la proporción de bacterias oxidantes de manganeso y decrece la población de *Pseudomonas*, las cuales son antagonistas de los hongos patógenos (Fernandez *et al.*, 2009; Kremer & Means, 2009), al mismo tiempo disminuyen la disponibilidad de ciertos nutrientes y micronutrientes en los suelos, gracias a que la molécula de glifosato es un fuerte quelante de metales como el níquel, el cual es esencial para microorganismos simbióticos fijadores de nitrógeno (Zobiolo *et al.*, 2010).

Las hierbas o malezas comunes pueden ser importantes fuentes alimentarias para diversas especies de insectos, aves y otros animales en áreas agrícolas, por lo que los cultivos transgénicos tolerantes a glifosato pueden afectar la alimentación de dichos animales; se ha comprobado que la población de la alondra común (*Alauda arvensis*) se

afectó debido a la ausencia de alimento por el uso de canola tolerante al glifosato (FOEE, 2013b).

Los ambientes donde dominan cultivos resistentes a herbicidas soportan menos poblaciones de aves e insectos; de 1999 a 2010 se reportó una disminución del 58% de la planta algodoncillo y una reducción del 81% de mariposas monarcas (Pleasants & Oberhauser, 2013). También el uso indiscriminado de glifosato puede reducir la viabilidad de lombrices (Casabe *et al.*, 2007) y se ha observado una reducción en la fijación de nitrógeno en cultivos de soya TG (Zobiolo *et al.*, 2010).

La abeja (*Apis mellifera*) es la principal especie polinizadora de cultivos comerciales, se ha descubierto que al exponerse a dosis de glifosato comúnmente usadas en la agricultura, se daña su capacidad cognitiva necesaria para recuperar e integrar la información espacial para un exitoso regreso a la colmena, por lo que se afecta la navegación de las abejas y pueden haber consecuencias negativas para la colonia y la polinización de cultivos importantes a largo plazo (Balbuena & Tison, 2015). También se encontró que abejas expuestas a dosis de glifosato utilizadas normalmente en campo, redujeron su sensibilidad a la sacarosa, a su desempeño para aprender y también se disminuyó su memoria a corto plazo (Herbert *et al.*, 2014).

## **2.7 MAIZ TRANSGÉNICO RESISTENTE A INSECTOS.**

Después de las variedades con tolerancia a herbicidas, los cultivos resistentes a insectos son el segundo rasgo más utilizado en plantas transgénicas, la resistencia a insectos es un rasgo muy común en maíz y algodón genéticamente modificados (GMO Compass, 2015). La superficie destinada para maíz resistente a insectos en los Estados Unidos ha alcanzado un 84%, mientras que para maíz tolerante a herbicidas ha alcanzado 89% (USDA, 2016).

*Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria del suelo ampliamente utilizada en la agricultura como insecticida biológico (Ibrahim *et al.*, 2010). Durante la esporulación, las células bacterianas sintetizan cuerpos de inclusión de insecticidas que consisten de proteínas Cry, activas contra larvas de especies invertebradas. Las proteínas Cry pueden

encontrarse en la naturaleza en tres formas principales: cristalina, protoxina soluble, y toxina soluble (Vázquez-Padrón *et al.*, 2000).

El modelo “clásico” para explicar el mecanismo de acción de las proteínas Cry establece lo siguiente: las proteínas cristalinas (Cry) ingeridas e inactivas deben estar solubilizadas en el ambiente intestinal del insecto a un pH alto (>10). La solubilización de las proteínas cristalinas da como resultado una forma inactiva de la proteína llamada “*full-length*” o de longitud completa (protoxina) que requiere una posterior escisión bioquímica para producir un pequeño fragmento tóxico (delta-endotoxina). Este fragmento debe entonces unirse a ciertos receptores localizados en el epitelio del intestino medio y de este modo, inducir la formación de un poro (también llamado formación de canal iónico), que lleva a la lisis del intestino, resultando en septicemia y en la muerte del insecto (Hilbeck & Otto, 2015).

Sin embargo, en los últimos años se ha realizado más investigación sobre los modos de acción de las toxinas para conocer el mecanismo subyacente de la resistencia de algunas plagas a las toxinas Cry (Soberón *et al.*, 2012; Storer *et al.*, 2012).

Los productos Bt han sido utilizados para el manejo biológico de plagas desde hace cincuenta años y son “químicos” aprobados para la agricultura orgánica, basados en la premisa de que son inocuos para los humanos, ya que no existen sitios de unión para delta-endotoxina de *B. thuringiensis* en la superficie de las células intestinales de mamíferos, por lo que, en teoría los animales no serían susceptibles a estas proteínas, contrario a los insecticidas químicos (CERA, 2015).

La transferencia de genes provenientes de *Bacillus thuringiensis* que codifican para las toxinas Bt (proteínas Cry) son los responsables de la resistencia a insectos en las plantas transgénicas. Existen varias clases de proteínas Cry, las más estudiadas son las Cry 1, las toxinas Cry 3 y Cry 2 y sus mecanismos de acción han recibido menos atención (Hilbeck & Otto, 2015).

Existen diferentes formas de la toxina Bt que son específicamente activas contra ciertos grupos de insectos, se conocen cerca de 170 toxinas Bt con especificidades variables: en maíz, para la resistencia a insectos se transfieren diferentes variantes de los genes Bt, por ejemplo, Cry1Ab, Cry1Ac, y Cry2Ab2 (Höss *et al.*, 2013). Las variedades de maíz

transgénico difieren dependiendo de la variante del gen Bt utilizado, de la cantidad de proteína Bt que producen y de su distribución de la planta; algunas variedades de maíz Bt producen la toxina principalmente en el tallo, mientras que otras la producen en toda la planta (Lorch & Then, 2007).

En el mundo se han liberado 115 eventos de resistencia a insectos (ISAAA, 2015b), tan sólo en México se han aprobado para alimentación humana (ya sea para uso directo o como aditivo) 55 eventos transgénicos, que contienen algún gen de resistencia a insectos, encontrándose en su mayoría como eventos apilados (ISAAA, 2015b). En la Tabla 9, se encuentran los genes utilizados para conferir resistencia a insectos en los eventos transgénicos disponibles comercialmente en el mundo.

**Tabla 9. Genes utilizados para conferir resistencia a insectos en los eventos transgénicos disponibles comercialmente en el mundo (ISAAA, 2015).**

Característica: Resistencia a insectos coleópteros			
Gen	Origen del gen	Producto	Función
<b>cry34Ab1</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa PS149B1	delta-endotoxina Cry34Ab1	Confiere Resistencia a insectos coleópteros particularmente al gusano de la raíz del maíz dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>cry35Ab1</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa PS149B1	delta-endotoxina Cry35Ab1	Confiere Resistencia a insectos coleópteros particularmente al gusano de la raíz del maíz dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>cry3Bb1</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kumamotoensis	delta endotoxina Cry3Bb1	Confiere Resistencia a insectos coleópteros particularmente al gusano de la raíz del maíz dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>dvsnf7</b>	Gusano de la raíz del maíz o Western Corn Rootworm ( <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> )	Transcrito de ARN de doble cadena que contiene un fragmento de 240 pb del gen WCR Snf7	Interferencia por RNAi resultando en la sub-regulación de la función del gen blanco Snf7 llevando a la mortalidad del gusano del maíz.
<b>mcry3A</b>	Forma sintética del gen cry3A gene de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. tenebrionis	delta-endotoxin Cry3A modificada	Confiere Resistencia a insectos coleópteros particularmente al gusano de la raíz del maíz dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
Característica: Resistencia a insectos lepidópteros			
Gen	Origen del gen	Producto	Función
<b>cry1A</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	delta-endotoxina del grupo de Cry1A	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio

<b>cry1A.105</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kumamotoensis	Proteína Cry1A.105 que comprende las proteínas Cry1Ab, Cry1F y Cry1Ac	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>cry1Ab</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kurstaki	delta-endotoxina Cry1Ab	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>cry1Ab (truncado)</b>	Forma sintética de Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kumamotoensis	delta-endotoxina Cry1Ab	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>cry1Ac</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. Kurstaki cepa HD73	delta-endotoxina Cry1Ac	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>cry1F</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. aizawai	delta-endotoxina Cry1F	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>cry1Fa2</b>	Forma sintética del gen cry1F derivado de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. aizawai	Proteína Cry1F modificada	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>cry2Ab2</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. kumamotoensis	delta-endotoxina Cry2Ab	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>cry2Ae</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp Dakota	delta-endotoxina Cry2Ae	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>cry9C</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. tolworthi strain BTS02618A	delta-endotoxina Cry9C	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>mocry1F</b>	Forma sintética del gen cry1F de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. aizawai	Proteína Cry1F modificada	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>pinII</b>	<i>Solanum tuberosum</i>	Proteína inhibidora de la proteasa	Mejora la defensa contra los insectos depredadores mediante la reducción de la digestibilidad y la calidad nutricional de las hojas
<b>vip3Aa20</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i> cepa AB88	Proteína insecticida vegetativa (variante vip3Aa)	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio
<b>Característica: Resistencia múltiple a insectos</b>			
<b>Gen</b>	<b>Origen del gen</b>	<b>Producto</b>	<b>Función</b>
<b>ecry3.1Ab</b>	Forma sintética del gen Cry3A y Cry1Ab de <i>Bacillus thuringiensis</i>	Proteína quimérica delta-endotoxina (Cry3A-Cry1Ab)	Confiere resistencia a insectos lepidópteros dañando selectivamente el revestimiento del intestino medio

### 2.7.1 Generación de resistencia a los cultivos Bt.

Los cultivos transgénicos resistentes a insectos producen dentro de sus células una o más formas del bioinsecticida natural Bt, dichos cultivos han desplazado cerca de 56 millones de kilogramos de insecticidas desde 1996 (Benbrook, 2012).

La diferencia principal entre las proteínas Bt en una planta transgénica y los insecticidas Bt que se asperjan en las hojas, es que en el último caso, la toxina está presente principalmente en la superficie de la planta, mientras que en las plantas Bt éstas se encuentran dentro de las células, por lo altera el perfil del riesgo sobre los organismos no-blanco, debido a que puede generar cambios perjudiciales en las comunidades de organismos (Hilbeck *et al.*, 2000). Las proteínas Cry de los insecticidas foliares Bt se descomponen rápidamente debido a que están expuestos a la luz solar y la lluvia; esta es la razón por la que raramente se detectan residuos de insecticidas en los granos de maíz durante la cosecha, y también explica por qué las aplicaciones convencionales de insecticida no representan un gran riesgo en la dieta humana (Abbas, 2005).

Por otro lado, en las plantas GM, la tasa de síntesis de las proteínas endotoxinas Cry de *B. thuringiensis* es aproximadamente proporcional a la tasa de crecimiento de la planta, por lo que al entrar en período de senescencia, decae la expresión de las endotoxinas Bt (Benbrook, 2012).

En los últimos años se ha generado evidencia científica sobre la emergencia de resistencia por parte de algunos insectos, en uno de los estudios más recientes, publicado en la revista Nature, se resumen los casos registrados de resistencia evolucionada en campo, al maíz Bt (Carrière *et al.*, 2015).

La resistencia desarrollada en campo puede deberse a que los productores no cumplen con los requerimientos de plantación de áreas de refugio con variedades no-GM, también que las dosis de toxinas pudieron haber sido muy bajas para matar a los insectos resistentes, o que el contenido de toxinas Cry varía en diferentes condiciones ambientales ya que se ha demostrado que disminuye su concentración conforme pasa la temporada de cultivo, también se ha especulado que la disminución en producción de las toxinas se puede deber a otros factores como: inestabilidad del mRNA, disminución en la



actividad del promotor, reducción en el metabolismo de nitrógeno y por lo tanto disminución en la producción de proteínas totales (Agapito-Tenfen *et al.*, 2014).

El gusano de la raíz del maíz es una plaga importante en Estados Unidos que se había manejado exitosamente mediante el uso de cultivos Bt (Devos *et al.*, 2013). En 2009 y 2010 se encontraron campos en los que la plaga había generado daños graves al maíz Bt productor de la toxina Cry3Bb1 y al maíz Bt productor de la toxina mCry3A, debido a que se producían dosis bajas de las toxinas y se generó resistencia cruzada a ambas toxinas, lo que demuestra la alta vulnerabilidad del maíz Bt a la generación de resistencia por parte de las plagas (Gassmann *et al.*, 2014).

La resistencia desarrollada en campo de *S. frugiperda* al maíz Bt que producía la toxina Cry1F ocurrió en un período de tres años en Puerto Rico, dicho suceso es el caso de resistencia generada más rápidamente, lo que provocó que ese cultivo fuera voluntariamente retirado del mercado (Storer *et al.*, 2012). Otro caso de resistencia desarrollada se dio en un período de ocho años en Sudáfrica, el insecto *B. fusca* (barrenador del tallo de maíz) generó resistencia a un maíz que producía la toxina Cry1Ab (Rensburg, 2007).

La estrategia de pirámide consiste en que una misma planta produzca dos o más toxinas Bt que tengan como blanco la misma plaga, para lograr un control más efectivo y reducir daños a cultivos. Se ha descubierto que en muchos casos no se logra la muerte de la plaga debido a que los insectos generan resistencia cruzada a las toxinas utilizadas; cuando la resistencia ocurre por una disminución en la unión de las toxinas a los receptores del intestino de los insectos, se ha descubierto que la resistencia a dos más toxinas se debe a la similitud en la secuencia de aminoácidos en sus dominios de unión (Carrière *et al.*, 2015). También se ha observado que al utilizar esta estrategia, una de las toxinas puede encontrarse en una concentración menor e invalidar la estrategia, lo que aceleraría la evolución de la resistencia por parte de los insectos (Agapito-Tenfen *et al.*, 2014).

### **2.7.2 Potenciales daños a la salud por los cultivos con rasgo de resistencia a insectos (Cultivos Bt).**

En 2012 se realizó un estudio que evaluaba los cambios morfológicos y bioquímicos en ratas alimentadas con maíz Bt, se encontraron diferencias significativas entre los grupos alimentados con maíz convencional y los alimentados con maíz GM resistente a insectos. En general, el grupo alimentado con el maíz MON810 sufrió varios cambios en el peso de algunos órganos como riñón, corazón e hígado así como cambios en los niveles de varias proteínas del suero y otros indicadores bioquímicos; por ejemplo se encontró un incremento en los niveles de creatinina, que es un indicador de nefropatía crónica, es decir, deficiencia en la función renal (Gab-Alla, 2012).

En 2007 se aplicó una metodología estadística apropiada para probar los efectos del maíz Bt sobre la salud de mamíferos, las ratas alimentadas con maíz transgénico MON863 (que contiene la toxina Cry3Bb1) fueron comparadas con sus controles isogénicos más cercanos y se incluyeron seis grupos de referencia para comparar con los resultados de un estudio previamente realizado por la compañía Monsanto, se observó toxicidad renal en las ratas macho relacionada con la dieta GM, debido a alteraciones químicas en la orina, también en ambos sexos se encontró una disrupción endócrina, lo que explica la mayor sensibilidad en riñones de ratas macho y sensibilidad en el hígado de las hembras debido a que la detoxificación hepática es dependiente de hormonas (Séralini, Cellier, & De Vendomois, 2007).

También se ha comprobado la citotoxicidad *in vitro* de las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac en una línea celular hepática embrionaria, la toxina Cry1Ab causó muerte celular a una concentración de 100 ppm, mientras que por sí sola la proteína Cry1Ac no causó efectos adversos (Mesnage *et al.*, 2013). Otro estudio realizado en 2009, analizó también parámetros bioquímicos en ratas alimentadas con maíz MON810, se encontraron diferencias significativas en algunos parámetros bioquímicos asociados a procesos inflamatorios relacionados a hiperplasia en riñones (de Vendômois *et al.*, 2009).

En 1999 se condujo un estudio en el que se evaluaron respuestas inmunes en trabajadores de campo que asperjaban insecticida que contenía esporas de Bt, se comprobó que los trabajadores altamente expuestos fueron los que principalmente dieron pruebas cutáneas positivas a varios extractos de esporas, la reacción alérgica mediada por el efecto de la inmunoglobulina E (anticuerpos IgE) específicos a los organismos Bt vegetativos fueron muy frecuentes y aumentaron significativamente meses después de la exposición inicial, también se observaron reacciones alérgicas en trabajadores con exposición baja o intermedia, lo que levanta preocupación de que pudieran ocurrir efectos de la misma naturaleza al consumir alimentos transgénicos (Bernstein *et al.*, 1999).

En el mismo año Vázquez-Padrón y colaboradores del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), querían explorar si el gen cry1Ac de una cepa de *E. coli* podría usarse para desarrollar vacunas contra patógenos que se adhieren a mucosas; inesperadamente encontraron que la protoxina Cry1Ac es un inmunógeno de mucosas tan potente como la enterotoxina de *Vibrio cholerae* (causante del cólera), y que además tiene actividad adyuvante de mucosas, es decir, facilita la inducción de anticuerpos de clase IgA específicos para los antígenos (toxina Cry). Lo anterior implica que la proteína Cry1Ac ingerida con los alimentos transgénicos que la contengan y consumida de manera eventual, subcrónica o crónica, al ser liberada a la luz intestinal podría inducir inmunidad contra ella misma (alergia), y su potente actividad adyuvante también podría inducir inmunidad contra múltiples antígenos alimentarios y tener efectos nutricionales nocivos (Vazquez-Padron *et al.*, 1999).

También se ha comprobado que la exposición por vías respiratorias a la proteína Cry1Ab purificada, presente en el evento MON810, produce una reacción inmunológica y alérgica (Andreassen *et al.*, 2014).

En enero de 2016 se publicó el artículo que Glöckner y Séralini habían preparado de 1997 a 2002, el cual representa el estudio más largo de observación en mamíferos de granja, realizado por veterinarios y granjeros experimentados en vacas recibiendo una dieta alta en OGMs. Se utilizó el maíz Bt176, que fue el primer OGM liberado comercialmente en Europa, dicho maíz, que también contiene la toxina Cry1Ab, se introdujo progresivamente en dietas controladas en el período que duró el estudio.

A pesar de que no se diseñó como un experimento científico, a través de los años y coincidiendo con un incremento del contenido de maíz transgénico en la dieta (0-40%), la proporción de vacas saludables con altos rendimientos de producción de leche, disminuyó de 70% (tasa normal) a sólo 40%. En 2002 se presentó un pico de mortalidad, con un 10% de muertes, precedido de un síndrome duradero de parálisis sin hipocalcemia o fiebre, pero con falla bioquímica renal y problemas de mucosas o epiteliales. Al no haber encontrado causas microbianas y no haber hecho algún otro cambio en el manejo de los animales, se propuso que el maíz Bt176, subsecuentemente retirado del mercado, provocó los efectos tóxicos a largo plazo, los cuales no son observables en condiciones de agricultura intensiva en donde hay una rápida rotación de animales y sin un etiquetado específico en el alimento genéticamente modificado (Glöckner & Seralini, 2016).

### **2.7.3 Efectos de los cultivos Bt sobre organismos no-blanco.**

Las toxinas Bt pueden tener efectos sobre organismos que están estrechamente relacionados con los organismos blanco, no obstante, también pueden tener efectos sobre organismos más distantes. La mayoría de los estudios realizados para identificar efectos adversos en organismos no blanco, han resultado negativos (Yu *et al.*, 2011). Sin embargo, existen estudios recientes que comprueban el daño que produce el consumo de las proteínas Cry en diversos insectos no blanco.

La toxina Cry1Ab, aumenta la mortalidad de las catarinas (*Harmonia axyridis*), la cuales son de gran importancia para el control de plagas agrícolas (Hilbeck *et al.*, 2012). También se ha encontrado que las larvas de mariposas monarca (*Danaus plexippus*) que se desarrollan en la planta de algodoncillo, al estar en contacto con polen de maíz Bt, se alimentaban menos, crecían a una tasa menor y sufrían mayor mortalidad que las larvas que crecían en las hojas con polen de maíz convencional o sin polen (Losey *et al.*, 1999).

En el caso de las abejas, se ha demostrado que al ser alimentadas con la proteína Cry1Ab purificada, pueden afectarse las respuestas al aprendizaje para asociar aromas con las fuentes de néctar, las abejas alimentadas con 5000 ppb de la toxina continuaban respondiendo positivamente al aroma aprendido incluso en ausencia de alimento, mientras que las abejas control se desanimaban y buscaban otras fuentes de alimento.

Aunque aún no hay explicación sobre los mecanismos de acción de la toxina que pudieran afectar el comportamiento, es probable que existan modos de acción desconocidos y que pongan en riesgo a otros organismos (Ramirez-Romero *et al.*, 2008). Debido a que las concentraciones de proteínas Bt son muy variables y los organismos no blanco podrían estar expuestos desde etapas tempranas de su desarrollo y por periodos más largos, más organismos no blanco podrían estar en riesgo por los cultivos Bt (Latham & Wilson, 2008).

## **2.8 APILAMIENTO (*STACKING*) DE EVENTOS TRANSGÉNICOS PARA RESISTENCIA A INSECTOS Y TOLERANCIA A HERBICIDAS.**

Desde hace algunos años ha habido un rápido incremento en el desarrollo y cultivo de plantas con rasgos apilados, la mayoría de estos cultivos se han generado por cruzamiento convencional de dos eventos parentales GM, es decir por la cruce entre una planta (evento) que contiene un rasgo individual con otro(s) evento(s) que contienen uno o más rasgos transgénicos produciendo así los llamados “eventos apilados” o “eventos piramidados” (De Schrijver *et al.* 2006).

Actualmente muchas compañías biotecnológicas desarrollan cada vez más variedades con rasgos apilados para resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas (Que *et al.*, 2010).

Con respecto a la legislación en materia de bioseguridad de los cultivos con eventos transgénicos apilados se ha puesto de manifiesto la falta de consenso con respecto a si dichos OGMs deben ser objeto de evaluaciones específicas; en Estados Unidos y Canadá, los eventos apilados se consideran productos del cultivo convencional e inocuos cuando las líneas parentales ya hayan sido consideradas “seguras”, al contrario, en la UE, cada nuevo evento apilado se considera como un nuevo OGM, el cual debe ser evaluado y aprobado, aun cuando los eventos individuales ya hayan sido aprobados en el mercado (Co-Extra, 2006).

Según el ministerio austriaco de salud y la Unión Europea (UE), los eventos apilados pueden considerarse diferentes de sus eventos transgénicos parentales por varias razones (Jugend, 2007):

- 1) Los eventos apilados contienen una nueva combinación de rasgos transgénicos y fondos genéticos derivados de eventos GM individuales.
- 2) No se construyen por una modificación genética directa, en contraste con las líneas parentales, sino que son producidos por cruzamiento de diferentes eventos transgénicos parentales.
- 3) Los eventos apilados deben considerarse como nuevos organismos genéticamente modificados, los cuales deberían someterse a una evaluación de riesgos similar o aún más estricta a la de los eventos individuales antes de establecerse en el mercado (EC 2003b, EFSA 2004b).

Actualmente los cultivos con eventos apilados son los mayormente comercializados y consumidos en el mundo, sin embargo, sólo se han realizado estudios toxicológicos de más de 90 días o en más de una generación por parte de la Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (EFSA). No obstante, algunos investigadores consideran que incluso un período de 90 días es insuficiente para evaluar la toxicidad crónica en mamíferos (EFSA, 2008; Séralini *et al.*, 2009).

Todos estos cultivos transgénicos comercializados han sido modificados para contener pesticidas, tanto por la producción de proteínas insecticidas o por su tolerancia a herbicidas, y por lo tanto podrían ser considerados como "plantas pesticidas" (Séralini, 2004). Por lo general, se evalúa la toxicidad de los plaguicidas durante un período de 2 años para medir efectos secundarios en mamíferos. Además, los efectos no intencionales de la modificación genética no pueden ser excluidas, como consecuencia directa o indirecta de mutagénesis de inserción que crean posibles efectos metabólicos (Rosati *et al.*, 2008).

En los últimos años se han utilizado ampliamente eventos transgénicos piramidados que producen dos o más toxinas de *Bacillus thuringiensis* que matan a la misma plaga de insectos, con el objetivo de retrasar la evolución de la resistencia a las toxinas Cry (Carrière *et al.*, 2015), al haberse encontrado probables daños a la salud por el consumo de maíz GM que contiene toxinas Bt, es relevante que se realicen análisis de riesgo para este tipo de eventos, los cuales contienen un mayor número de proteínas transgénicas y

de las que se desconoce su inocuidad al no haberse realizado ensayos de alimentación a largo plazo (Glöckner & Séralini, 2016).

En un estudio realizado para evaluar los efectos del apilamiento de genes de resistencia a insectos (*cry*) y tolerancia a herbicidas (*epsps*) en el proteoma del maíz transgénico se encontró que existe una variación en la expresión de veintidós proteínas en maíces tanto en eventos apilados como en eventos simples con respecto a maíces no GM; se observó una clara reducción de los niveles de transcrito de los transgenes en el maíz que contenía los eventos apilados, comparando con los que sólo tenían un evento, lo que implicaría, en el caso de las toxinas Bt, que las proteínas se produzcan en menor cantidad y que de esta manera se generara resistencia ya que la dosis de toxina Bt puede ser muy baja y no suficiente para matar a los insectos heterócigos resistentes, además la expresión de algunas proteínas no transgénicas en variedades GM no estaba comprendida en el intervalo de variabilidad natural de la variedad local utilizado en este estudio (Agapito-Tenfen *et al.*, 2014).

Este fue el primer informe sobre el análisis proteómico comparativo de cultivos GM apilados contra cultivos GM de un solo evento; se concluyó que la inserción de transgenes apilados en el genoma de un maíz puede afectar la expresión global de genes endógenos y por lo tanto afectar su seguridad y utilidad, por lo que se deben considerar análisis más extensos para la evaluación de riesgos de estos cultivos (Agapito-Tenfen *et al.*, 2014).

Por otro lado, también se han estudiado los efectos combinatorios de las toxinas Cry en eventos apilados con una o más de las proteínas Bt. Para evaluar la seguridad de estos cultivos es importante evaluar sus efectos sinérgicos, ya que las toxinas que en combinación excedan la tasa de mortalidad de la toxina de forma individual considerando su mayor actividad, significa que la toxicidad de una mezcla no puede predecirse a partir de las toxinas individuales. En varios de los estudios se han encontrado efectos combinatorios de las toxinas Cry con compuestos derivados de bacterias (Wirth *et al.*, 2004), insectos (Chen *et al.*, 2007) y plantas (Mohan, 2008), en los que se observó que los efectos de las proteínas individuales eran frecuentemente menores y no letales, mientras que la combinación de las toxinas con dichos compuestos tenían efectos más fuertes y letales (Hilbeck & Otto, 2015).

Por las evidencias expuestas anteriormente, queda claro que los niveles de expresión de proteínas en los eventos transgénicos apilados son de gran preocupación. Por otra parte, las pruebas de posibles interacciones de las proteínas transgénicas apiladas, y de elementos genéticos implicados en su expresión, es un tema que no se ha estudiado y que requiere de análisis (Agapito-Tenfen *et al.*, 2014).

## **2.9 EL MAÍZ TRANSGÉNICO Y EL INCREMENTO EN EL RENDIMIENTO.**

La evidencia de que los cultivos transgénicos aumentan el rendimiento comparado con los métodos convencionales de mejoramiento de cultivos suele ser controversial ya que los estudios que examinan los rendimientos de los cultivos transgénicos en algunos casos han fracasado al aislar los efectos de la tecnología transgénica de otros factores, debido a que los desempeños varían de acuerdo al tipo de cultivo, región geográfica, clima, presión por plagas e incluso la capacitación del agricultor (Klümper & Qaim, 2014).

Sin embargo, existe evidencia sólida de que los cultivos transgénicos no han logrado aumentar los rendimientos. En un estudio realizado por la Universidad de Ohio con datos del USDA, se concluyó que no ha habido un incremento significativo en el rendimiento con la adopción del maíz transgénico. Los registros indican que el aumento del rendimiento de maíz entre 1940 y 1995, cuando se utilizaba la agricultura convencional, fue de 118 kg por hectárea, mientras que en el período de 1996 a 2011, después de la adopción de la tecnología GM, fue de 128 kg por hectárea; es decir, hubo aumento de sólo 1% (Zulauf, 2011).

Una de las revisiones sobre rendimiento de los transgénicos más completas, publicada por la UCS en Estados Unidos, con base en una revisión de los estudios científicos sobre el desempeño que los cultivos transgénicos han tenido para aumentar el rendimiento, afirman que los cultivos GM han fallado en incrementarlo (Gurian-Sherman, 2009).

Se encontró que: 1) los cultivos GM no han mejorado el rendimiento intrínseco (rendimiento máximo bajo condiciones ideales) de ningún cultivo, 2) La ingeniería genética sólo ha traído mínimas ganancias en el rendimiento operacional (bajo condiciones de campo consideradas no ideales), siendo el maíz Bt el único que ha



aumentado alrededor de 3.3% entre los cultivos Bt para el barrenador europeo y el gusano de la raíz, y desde 1996 se ha incrementado el rendimiento en un promedio de 0.2 a 0.3% por año, 3) Los incrementos en el rendimiento en general se atribuyen a los enfoques que no implican OGMs, 4) Los cultivos experimentales de alto rendimiento aún no han sido exitosos (Gurian-Sherman, 2009).

Otro ejemplo del pobre rendimiento de cultivos transgénicos es el del algodón GM en la India, ya que después de una adopción importante por los agricultores, se ha encontrado que el rendimiento no ha sido significativo, ya que en regiones en las que se cultiva el algodón Bt se obtienen menores rendimientos que en regiones que utilizan algodón convencional, también se requiere de una fuerte inversión económica para adquirir la semilla GM de la que además es necesario utilizar hasta tres veces más dependiendo de la variedad. También se ha registrado que a pesar de que el algodón resiste a plagas, se continúan utilizando insecticidas ya que no es suficiente sólo con el cultivo resistente (Gutierrez *et al.*, 2015).

El uso de pesticidas para resolver los problemas de plagas que el algodón Bt no logró solucionar, provocó que los productores dependieran de la industria semillera; por estas razones, los agricultores han aumentado sus deudas ya que los intereses para obtener las semillas e insumos son muy altos (5-10% por mes). Entre 2001 y 2010 varias regiones al sur de la India han sido un foco rojo de suicidios, que se han relacionado con la producción de algodón Bt ya que el 76% de los fallecimientos correspondían a productores de algodón, de los cuales 87% eran hombres entre los 30 y 44 años de edad (Gutierrez *et al.*, 2015).

España es el único país de la UE donde se cultivan transgénicos a gran escala (Greenpeace, 2015a). Aragón es el epicentro del cultivo de transgénicos en España, sin embargo en 2015 el propio Gobierno de Aragón publicó un informe técnico que demuestra que el maíz GM no es necesario ya que la producción es igual o menor a la del maíz convencional y la plaga que pretende combatir el maíz transgénico MON810, barrenador de maíz (*Ostrinia nubilalis*), no provoca daños importantes a los cultivos (Gobierno de Aragón, 2015).

## 2.10 ESTUDIOS DE MONITOREO Y DETECCIÓN DE MAÍZ TRANSGÉNICO EN MÉXICO Y EL MUNDO.

A nivel mundial también se han encontrado casos de introgresión transgénica. En 2012 el Instituto Nacional de Investigación Ambiental de Corea del Sur (NIER) realizó pruebas en muestras de soya, canola, algodón y maíz, dichas plantas se encontraban en sitios cercanos a puertos y fábricas de alimentos que procesaban plantas GM, el maíz resultó la planta con más resultados positivos de contaminación. Además, se encontraron poblaciones completas de plantas transgénicas en áreas cercanas a las granjas que procesaban plantas GM. Estudios previos ya habían mostrado la presencia de plantas GM en áreas cercanas a puertos de importación; además se encontraron cambios epigenéticos en las plantas transgénicas analizadas (Bauer-Panskus *et al.*, 2013).

En Filipinas se cultiva maíz Bt desde 2002, muchos agricultores en ese país utilizan variedades de polinización abierta para la producción tradicional de maíz, lo que quiere decir los transgenes pueden persistir en las variedades regionales una vez que se establece el flujo génico. Un estudio realizado por Greenpeace confirmó la contaminación de variedades tradicionales con secuencias transgénicas. El maíz es el segundo cultivo alimentario más importante de Filipinas y es el alimento básico del 20% de la población. Se encontró la presencia de dos eventos transgénicos de maíz en muestras colectadas en los mercados de Mindanao, los niveles de contaminación encontrados fueron sustanciales ya que se encontró hasta 40% de contaminación (Ocamo & Cotter, 2013).

En Sudáfrica, al igual que en México, se practica el intercambio de semillas, situación que puede contribuir con la propagación y persistencia de transgenes a nivel local o regional. El maíz GM se introdujo en ese país en 1997, un estudio reciente analizó plantas de maíz en un pueblo donde se había cultivado previamente maíz Bt, se encontraron genes para la resistencia a insectos (de MON810) en 10% de los lotes de semillas, indicando que el evento MON810 se había vuelto parte del maíz que se intercambia localmente, cuestión desconocida por los agricultores (Iversen *et al.*, 2014).

Durante 1993 en México, se realizó experimentación con maíz transgénico por parte de investigadores del CINVESTAV; a partir de esa primera solicitud y hasta mediados de

1995, todos los ensayos fueron en realidad experimentos de escala mínima y en febrero de 1996 se le concedió al CIMMYT el primer permiso oficial para llevar a cabo una prueba propiamente de campo en los únicos invernaderos bioconfinados para maíz transgénico en el país, en la zona de Tlaltizapán, Morelos (Serratos-Hernández, 2009).

A partir de 1996, y hasta enero de 1999, hubo un crecimiento significativo de solicitudes de experimentación en campo con maíz transgénico. En la mayoría de los casos (20 ensayos) se trató de pruebas para medir la eficacia del maíz Bt. Sin embargo, también se solicitaron permisos (8 ensayos) para probar los dos tipos de maíz tolerante a herbicidas (glifosato y glufosinato de amonio). En dos casos (CIMMYT) se solicitó permiso para generar semillas transgénicas al retrocruzar con polen de maíz normal el jilote de plantas transgénicas (Serratos-Hernández, 2009).

En todos los casos, el área de campo utilizada no excedió una hectárea y se tomaron medidas de control para el manejo de material transgénico, principalmente: 1) no permitir la maduración sexual de la planta o desespigar todas las plantas del experimento; 2) barreras físicas y biológicas alrededor de las pruebas; 3) personal calificado y autorizado para el manejo del ensayo; 4) destrucción o incineración de material transgénico remanente y de las barreras biológicas en el caso de que se hubiera utilizado maíz convencional. En 1997 se sabía que en superficies de menos de una hectárea y con supervisión técnica es posible manejar en campo el maíz transgénico (Serratos-Hernández, 2009).

A pesar del conocimiento sobre el manejo del maíz transgénico y la experiencia acumulados por la Comisión Nacional de Bioseguridad Agrícola (CNBA), encargada de la bioseguridad en México en ese tiempo, no hubo una respuesta clara del gobierno para apoyar las iniciativas en cuanto al impacto del maíz transgénico propuestas por los científicos y la sociedad. Por otro lado hubo una fuerte presión de las empresas para realizar pruebas “experimentales” de gran escala que involucraban superficies de varias hectáreas, estas solicitudes parecían tener el propósito de acelerar el proceso de desregulación tal como estaba sucediendo con el algodón GM para el cual ya en 1998 se pedían permisos con el fin de hacer ensayos en miles de hectáreas (Serratos-Hernández, 2009).

En 1999 la SAGARPA implementó la moratoria *de facto* para las pruebas de campo con maíz transgénico, desapareció la CNBA y se creó la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), modificándose sustancialmente los preceptos y la filosofía de bioseguridad que había desarrollado el CNBA (Serratos-Hernández, 2009).

La presencia de maíz transgénico en México fue revelado por primera vez al público a través de un estudio de científicos de la Universidad de Berkeley, quienes encontraron construcciones transgénicas en variedades nativas de maíz en la Sierra Juárez de Oaxaca (Quist & Chapela, 2001).

A pesar de que los resultados del estudio fueron atacados inmediatamente por la industria e investigadores afiliados a ella, autoridades mexicanas condujeron pruebas consistentes con los resultados (Ezcurra *et al.*, 2001). Un grupo de investigación comisionado por el TLCAN confirmó que la contaminación de variedades nativas mexicanas de maíz era una realidad (CEC, 2004). En un estudio realizado en 2005 no se encontraron rastros de maíz GM en las variedades nativas de maíz (Ortíz-García, 2005). Finalmente, algunos años después del primer estudio publicado, se confirmó la propagación de secuencias transgénicas en variedades de maíz nativo mexicano en diversos estudios citados en la Tabla 10.

**Tabla 10. Investigaciones que confirman la propagación de secuencias transgénicas en variedades de maíz nativo en México.**

Lugar	Toma de muestras	Referencias
Sierra Juárez (Oaxaca)	2000	(Quist & Chapela, 2001).
Suelo de conservación cercano a la Ciudad de México	2003	(Serratos-Hernández <i>et al.</i> , 2007).
Sierra Juárez (Oaxaca)	2001 y 2004	(Piñeyro-Nelson <i>et al.</i> , 2009).
Guanajuato, Veracruz, Oaxaca y Yucatán,	2002	(Dyer <i>et al.</i> , 2009)
Oaxaca, Puebla, Ciudad de México, Michoacán, Tamaulipas, Estado de México, Veracruz y Chiapas	2004-2014	Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC, 2015)

Otros reportes de fuentes gubernamentales en México y de ONGs fueron parcialmente publicados, y de acuerdo a ellos también se encontró introgresión transgénica en los estados de Chihuahua, Morelos, Durango, Oaxaca y Tlaxcala (Mercer & Wainwright, 2008).

La comisión del TLCAN concluyó que las importaciones de maíz provenientes de Estados Unidos eran las responsables de la introducción de maíz transgénico incluso en partes remotas de México, dicho maíz fue importado como ayuda alimentaria pero no fue molido ni etiquetado como genéticamente modificado (CEC, 2004). De acuerdo a esta teoría, el maíz importado de Estados Unidos se utilizó como semilla por agricultores mexicanos y así fue encontrando su camino en los sistemas de semillas tradicionales, los cuales se basan en el intercambio de semillas (Dyer *et al.*, 2009).

En la Tabla 11 se presentan los casos que fueron notificados en un reporte periodístico basado en documentos de agencias públicas en México. Se encontró que en el transcurso de algunos años han habido derrames de maíz transgénico en el territorio mexicano, en total, las compañías notificaron el derrame de 712.5 toneladas de grano de maíz GM (Mendoza, 2015), pero no puede descartarse que sucedieran más, y no fueran notificados.

**Tabla 11. Casos notificados de derrame de maíz transgénico en México (Mendoza, 2015).**

Año	Estado	Derrame (toneladas)	Compañía
2010	Veracruz	631	CP Ingredientes
2010	Guanajuato	20	Almidones Mexicanos
2010	Guanajuato	20	Almidones Mexicanos
2012	Guanajuato	41,5	Monsanto

De acuerdo con las agencias de bioseguridad mexicanas, se realizaron medidas de bioseguridad como el monitoreo y destrucción de las plantas GM, para tratar de parar el escape de material transgénico, aunque no hay más información disponible al respecto, y el tiempo de monitoreo permanece poco claro (Mendoza, 2015).

El flujo génico ha añadido un nivel extra de riesgo a la biodiversidad, se debe reforzar el principio precautorio para proteger la integridad ecológica y evolutiva de la biodiversidad natural (Pimentel *et al.*, 2000), mediante la prevención de la propagación de organismos GM en el ambiente. También son necesarias herramientas regulatorias más fuertes para rechazar la liberación de organismos transgénicos que no pueden ser controlados en su dimensión espacio-temporal, especialmente si tienen consecuencias no intencionadas a largo plazo (Bauer-Panskus *et al.*, 2015).

El cultivo de plantas GM en regiones en las cuales se pueden contaminar los sistemas de intercambio donde se salvaguardan semillas nativas, debe parar tan pronto sea posible para evitar que se sigan propagando los transgenes en los sistemas agroecológicos (Bauer-Panskus *et al.*, 2015).

## **2.11 FLUJO GÉNICO Y LAS IMPLICACIONES DE LA LIBERACIÓN DE MAÍZ GM DE FORMA MASIVA EN MÉXICO.**

El intercambio de genes entre poblaciones de una misma especie, se denomina flujo génico, es el primer paso para que suceda el flujo de secuencias transgénicas, seguido por la hibridación e introgresión (incorporación del transgén en el genoma hospedero con herencia estable) (Soleri *et al.*, 2006).

El flujo génico y sus efectos a largo plazo en la diversidad de la población que recibe la información genética; depende de algunas variables, incluyendo el tamaño de las poblaciones del donador y de la especie receptora, la tasa de flujo y polinización de las semillas y el polen, y el “*fitness*” o la aptitud absoluta y relativa de los híbridos, las cuales se determinan por los procesos genéticos, ecológicos y socioculturales en sistemas agrícolas específicos (Ellstrand, 2003b).

Este fenómeno determina hasta qué punto cada población local es una unidad evolutiva independiente, por lo que sí existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales todas ellas evolucionarán juntas (Slatkin, 1995) y por lo tanto se conduce a la población hacia una homogeneización de la especie, al tener las mismas frecuencias alélicas, a menos que exista oposición de otras fuerzas divergentes como la deriva génica o la selección natural (Futuyma, 2009).

El proceso de hibridación se define como la cruce entre individuos pertenecientes a poblaciones genéticamente diferentes, la hibridación generalmente conduce a un proceso denominado introgresión, el cual consiste en la incorporación de genes de un taxón a otro o a más poblaciones (Ellstrand, 2003). La hibridación puede tener consecuencias evolutivas, por ejemplo, puede ser un medio para el escape de transgenes a las poblaciones naturales, presentando problemas potenciales como la pérdida del valioso germoplasma en centros de diversidad y la introgresión de transgenes a las poblaciones naturales. Al contrario de lo que sucede con contaminantes químicos o de otro tipo, los transgenes no necesariamente decaerían en el ambiente con el paso del tiempo, sino que podrían aumentar su frecuencia con el paso del tiempo si los organismos en los que residen tienen éxito al reproducirse y transmitir sus genes a las siguientes generaciones (Alavez *et al.*, 2013).

En un estudio realizado por Turrent y colaboradores, se realizó un cálculo hipotético de lo que podría suceder si interaccionaran genéticamente 30 eventos transgénicos independientes con las más de 50 razas de maíz nativo. Se determinó que en los años posteriores a la liberación comercial de maíz transgénico, las plantas transformadas de cada raza de maíz nativo podrían incluir desde uno hasta 30 insertos de ADN transgénico en su genoma, pudiendo generar  $2^{2 \times 30}$  genotipos diferentes (Turrent-Fernández *et al.*, 2009).

Según Turrent-Fernández y colaboradores, algunos miembros de la comunidad científica mexicana aún se inclinan por el uso irrestricto de maíz genéticamente modificado en el campo mexicano, argumentando que evolutivamente las especies han aprendido a prosperar con acumulaciones de ADN adventicio (de maíz mejorado no GM), por lo que la acumulación de ADN transgénico podría resultar inofensivo (Turrent-Fernández *et al.*, 2009) e incluso, por ejemplo en el caso del maíz Bt, conferir una ventaja a las variedades transgénicas si es que los agricultores reconocen el valor del nuevo rasgo conferido por el maíz GM (Bellon *et al.*, 2004). Sin embargo, otros científicos indican que, entre otras consecuencias, esa acumulación podría causar esterilidad, pérdida de vigor, producción de granos defectuosos, lo que sería desastroso para la diversidad genética del maíz

nativo y provocaría el fin de la conservación *in situ* de maíz nativo para programas de mejoramiento genético clásico (Turrent-Fernández *et al.*, 2009).

Del estudio se concluye que sólo por medio de una investigación multigeneracional del microcosmos de esas interacciones genéticas se conocería *a priori* si la acumulación de ADN transgénico pone en riesgo la biodiversidad del maíz en México (Alavez *et al.*, 2013). Existen factores que fomentan el flujo génico, la persistencia y la proliferación de transgenes, como la existencia de sistemas para el intercambio de semillas, que lleva a la transferencia inadvertida de semillas contaminadas. Además el monitoreo y control de las plantas GM no se lleva a cabo efectivamente en México (Bauer-Panskus *et al.*, 2013). Por otro lado, si por efectos económicos de la globalización, se comenzaran a sembrar variedades transgénicas, estas podrían afectar la diversidad tan sólo por el hecho de que se reduciría el área plantada con variedades nativas o por que serían reemplazadas por el maíz GM (Soleri *et al.*, 2006).

Desde hace varios años, se ha identificado que el cultivo de maíz es de los más vulnerables dentro del sector agrícola mexicano, aproximadamente el 70-80% de los agricultores siembran maíz nativo de temporal *ergo*, dependen fuertemente de las condiciones climáticas (Cruz *et al.*, 2012). Sin embargo, se sabe que en una misma región, el cambio climático puede favorecer a ciertas especies agrícolas y perjudicar a otras; basándose en este mismo principio, como las poblaciones de maíz están adaptadas a condiciones climáticas particulares, también se podría suponer que el impacto del cambio climático será diferencial dentro de una especie agrícola que presenta tanta diversidad genética, morfológica, fisiológica y fenológica (Ureta-Sánchez, 2014).

Si México llegara a perder la gran variedad de maíces nativos, se pondría en riesgo la soberanía alimentaria ya que los agricultores se verían obligados a comprar semillas año con año a alguna de las compañías semilleras transnacionales, sin poder guardar semillas para las próximas cosechas (GRAIN, 2015a), además de los probables riesgos a la salud, pérdida de patrimonio biocultural, daños al medio ambiente y pérdida de biodiversidad (Álvarez-Buylla *et al.*, 2013).



## **2.12 LEGISLACIÓN SOBRE EL ETIQUETADO DE ALIMENTOS QUE CONTIENEN OGMs.**

Actualmente 64 países tienen una legislación específica para el etiquetado y la para el control de la producción de alimentos que contienen OGMs ([www.justlabelit.org](http://www.justlabelit.org)). En algunos países el etiquetado de OGMs es de carácter obligatorio, como en la Unión Europea (UE), mientras que en otros es voluntario, o no es un requisito exigible, como en Estados Unidos (Federici, 2010).

En la reglamentación de la UE se establece que los alimentos GM deben etiquetarse si la proteína o el ADN transgénico puede ser detectado. Se exige el etiquetado de los alimentos que contengan OGMs en una cantidad superior al 0.9% que es el límite asumido para que la presencia de transgénicos sea accidental o técnicamente inevitable (de los ingredientes individualmente considerados) (DOUE, 2003a, 2003b).

En México la Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente modificados, se refiere en su título quinto a la protección de la salud humana en relación con los OGMs y el título sexto al etiquetado de OGMs y a la información sobre la composición de OGMs para consumo humano (LBOGM, 2005). Es preciso mencionar, que esta es una de las partes débiles de la ley, puesto que en relación con el etiquetado, la ley es bastante ambigua y no lo establece como una obligación (LBOGM, 2005).

Para poder llevar a cabo el etiquetado de los alimentos transgénicos y garantizar el cumplimiento de la normatividad, es necesario disponer de sistemas de trazabilidad que permitan detectar la presencia o ausencia de OGMs a lo largo de toda la cadena de producción, lo anterior resulta complicado y costoso, por lo que en los países en los que se etiquetan los transgénicos se recurre a un análisis de presencia/ausencia en los productos destinados a la venta; para realizar la detección, identificación y cuantificación de OGMs de manera rápida y eficaz, se utilizan métodos biotecnológicos o de biología molecular (Bertheau, 2012).

## 2.13 TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE OGMs.

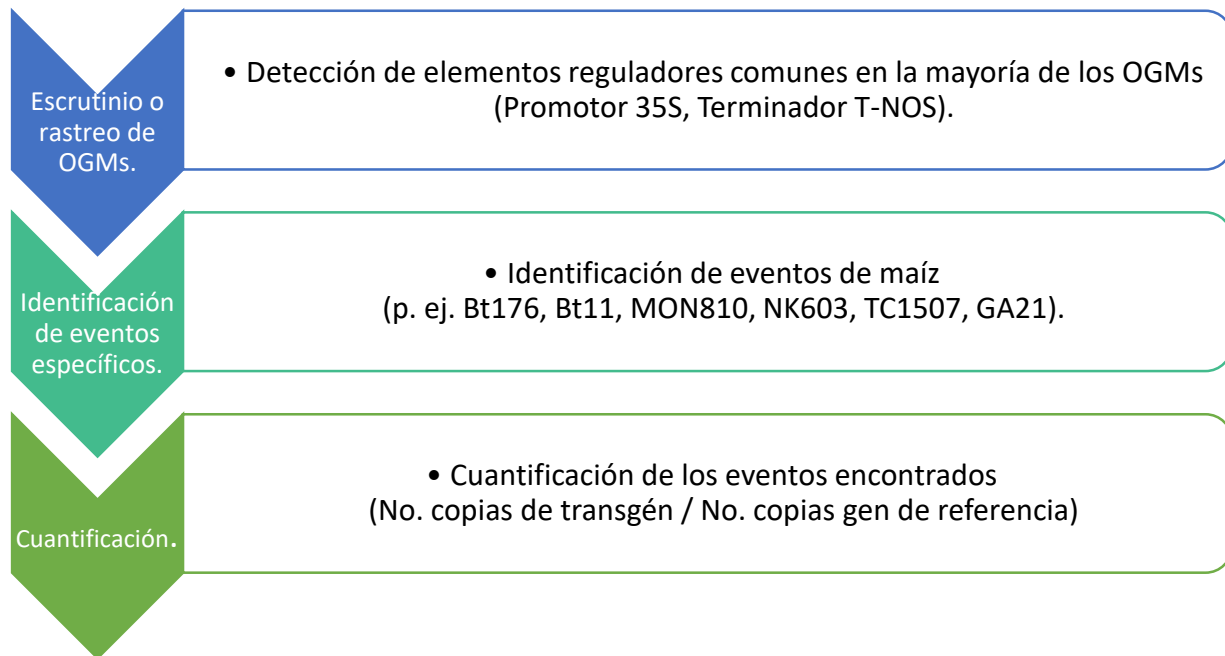
Las técnicas disponibles para la detección de OGMs consisten en evidenciar las diferencias entre la variedad modificada y la no modificada. Esto se puede realizar detectando el ADN transgénico insertado, detectando la nueva proteína expresada, o en el caso de que la proteína sea una enzima, utilizando el análisis químico para detectar el producto de la acción enzimática (Querci *et al.*, 2007).

Los dos métodos comúnmente utilizados para la detección de modificaciones genéticas en plantas son el método de ELISA y la PCR. El primero es el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés), el cual aprovecha la especificidad de la unión entre el antígeno expresado por la proteína transgénica y un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable. El segundo es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Saiki *et al.*, 1988), basada en la detección de secuencias de ADN insertadas en el genoma de la planta. Ambos métodos indican la presencia o ausencia de OGMs en la muestra y pueden dar una estimación de su contenido (López *et al.*, 2003).

En muchos casos, el uso de la técnica de ELISA está limitado por el bajo nivel de expresión de la proteína transgénica, o por la degradación de las mismas durante el procesamiento del alimento (Arleo, 2015). También, en el caso de los eventos apilados, la presencia combinada de transgenes, puede influir en el silenciamiento de otros genes o de las mismas secuencias transgénicas, y cambiar la expresión de, por ejemplo, secuencias reguladoras (De Schrijver *et al.*, 2007), situación que produciría la ausencia del promotor responsable de la expresión del transgén para su transcripción a ARN y posterior traducción a proteína (Alavez *et al.*, 2013).

Por otro lado, los métodos basados en la detección de ADN han resultado ser más específicos y sensibles, y son los métodos aceptados y validados por las instancias regulatorias internacionales (Barbau-Piednoir *et al.*, 2014; EFSA, 2008; Gasparic *et al.*, 2010; Mazzara *et al.*, 2004). La PCR permite la amplificación selectiva de fragmentos específicos de ADN presentes en baja frecuencia en una matriz que contiene otras secuencias de ADN.

Los alimentos crudos pueden ser identificados fácilmente como genéticamente modificados, pero la detección puede llegar a ser más difícil cuando éstos se encuentran procesados, ya que el ADN puede estar degradado y el alimento contiene otras sustancias que incluso pueden interferir con la reacción de PCR; por lo que cuanto más procesado esté el alimento, más difícil será la detección del transgén (Querci *et al.*, 2010). En el proceso de detección de OGMs en alimentos existen tres principales etapas (Figura 5). La primera consiste en la detección cualitativa o escrutinio de OGMs (*screening* de OGMs), cuya finalidad es evidenciar la presencia o ausencia de material transgénico en una muestra. Para lo cual se buscan secuencias comunes entre distintos eventos transgénicos, de modo que se pueda abarcar la mayor cantidad de OGMs liberados, en este trabajo se monitorearon las secuencias CaMV 35S y T-NOS, debido a que en conjunto están presentes en más del 90% de los eventos transgénicos de maíz aprobados en México para consumo humano y en alrededor del 80% de todos los eventos transgénicos de maíz en el mundo (CERA, 2015; COFEPRIS, 2015; ISAAA, 2015b). La segunda etapa es la de identificación, cuyo objetivo es determinar específicamente cuál o cuáles son los eventos transgénicos específicos de maíz que están presentes en una muestra alimentaria, para precisar si se trata de eventos transgénicos aprobados o no aprobados para consumo humano. La tercera etapa consiste en la cuantificación, que tiene como propósito determinar el contenido porcentual de OGMs en el alimento, para evaluar si requeriría o no del etiquetado, en el supuesto caso de que la legislación lo exigiera (Griffiths *et al.*, 2002; Markoulatos *et al.*, 2004).



**Figura 5. Procedimiento general para la detección de OGMs. 1) Escrutinio de OGMs: se detecta la presencia de OGMs mediante una búsqueda dirigida de secuencias comunes presentes en distintos eventos. 2) Identificación de eventos específicos. 3) Cuantificación de los OGMs encontrados.**

### 2.13.1 Métodos cualitativos de detección de OGMs por PCR.

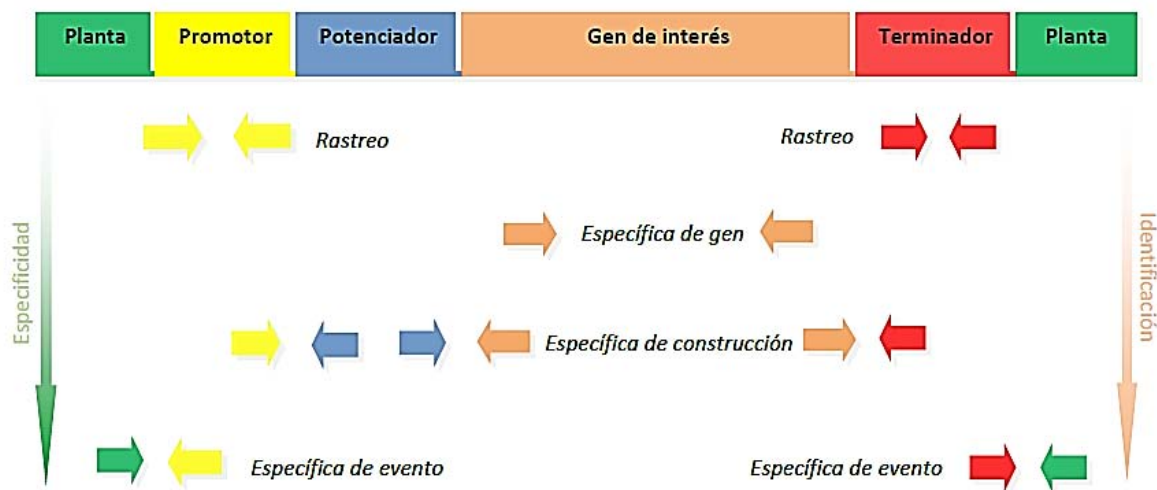
Existen varios niveles de especificidad para el análisis de detección de transgenes por PCR, dependiendo del blanco al cual están dirigidos los cebadores (Figura 6). En grado creciente de especificidad se encuentran las siguientes estrategias de detección: rastreo o escrutinio de OGMs (*screening*), detección específica de gen, detección específica de construcción y detección específica de evento.

La diferencia entre ellas consiste en la secuencia blanco a la cual se unen los cebadores dentro de la construcción del transgén (*cassette* de expresión). Estas secuencias pueden ser: el promotor, un gen introducido, el terminador, o la unión entre dos de estos elementos (Arleo, 2015).

El promotor sirve como una señal de comienzo para la expresión génica y consecutivamente para la producción de la proteína de interés. El promotor 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV) es utilizado en más del 90% de las variedades de plantas GM liberadas (CERA, 2015). El gen introducido codifica para una proteína nueva que confiere a la planta cierta característica de interés (p.ej. el gen de la proteína Cry1Ab

para la resistencia a insectos). Los genes introducidos pueden existir en la naturaleza o pueden ser completamente sintéticos. La secuencia terminadora es la señal de finalización para la expresión de la proteína de interés. Aproximadamente el 70% de las plantas transgénicas liberadas, contienen en su construcción al terminador del gen (*nos*) de la enzima nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (CERA, 2015).

Debe tomarse en cuenta que estos elementos pueden originarse a partir de organismos de tipo salvaje, pueden estar presentes en más de una copia y en más de un evento transgénico; incluso pueden ser combinados de una manera similar en más de un OGM. De este modo, la elección del método debe ajustarse a la finalidad del análisis (Anklam *et al.*, 2002).



**Figura 6. Representación esquemática de un evento transgénico. Se muestran las estrategias de detección e identificación por PCR en grado creciente de especificidad de arriba hacia abajo. Las flechas horizontales indican la ubicación de los cebadores. Tomado de (Arleo, 2015).**

### 2.13.2 Estrategia de escrutinio (*screening*) de OGMs.

En el primer nivel de especificidad, se encuentra el escrutinio o rastreo de OGMs, que es capaz de detectar a la mayoría de eventos transgénicos autorizados actualmente. Se basa en la detección de las secuencias que controlan la expresión de los transgenes, como promotores y terminadores, que flanquean al gen introducido en la planta. Entre las secuencias reguladoras más utilizadas se encuentra el promotor CaMV 35S y el terminador T-NOS. Esta aproximación establece en primera instancia si la muestra

contiene o no rastros de material genéticamente modificado. Si bien tiene la virtud de poder detectar la presencia de varios eventos transgénicos en un solo ensayo, no existe un único rastreo que detecte todos los OGMs, ya que existen eventos que contienen promotores y terminadores distintos (p. ej. Promotor FMV del virus del mosaico del higo y el terminador t-HSP17 de la proteína *heat shock* del trigo). Es un método cualitativo, cuya sensibilidad suele detectar alrededor de 0.01% de material GM (Griffiths *et al.*, 2002).

### **2.13.3 Estrategia específica de gen.**

La estrategia específica de gen o de característica (*trait-specific*) se encuentra en el segundo nivel de especificidad. Consiste en la detección de los genes activos del transgén, como el gen *cry1Ab* de los eventos de maíz Bt11 y MON810, o el gen *pat* del evento Bt11. Esta estrategia indica la posible presencia de un grupo de eventos con un gen característico en una muestra y da información sobre las características fenotípicas de una muestra GM. Sin embargo, no se puede identificar cuál es el evento específico presente, ya que el gen blanco puede haber sido utilizado en diferentes OGMs.

### **2.13.4 Estrategia específica de construcción.**

Las estrategias de detección específica de construcción se encuentran en el tercer nivel de especificidad. Esta aproximación consiste en la detección de secuencias de unión dentro de la construcción del transgén, por ejemplo, al borde entre el promotor y el gen, o entre el gen y el terminador. Mediante esta estrategia se acotan las posibilidades de encontrar numerosos eventos, pero al existir varios OGMs que comparten las mismas construcciones no es tan específica como la estrategia específica de evento.

### **2.13.5 Estrategia evento específica.**

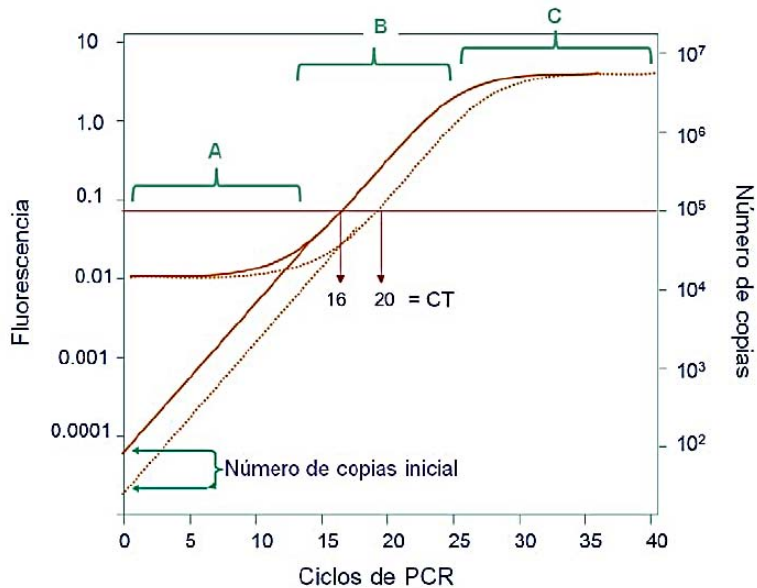
La estrategia específica de evento permite identificar un único evento de transformación. Se logra una mayor especificidad ya que detecta la secuencia comprendida en el sitio de unión entre el ADN transgénico y el genoma del organismo huésped, que es único para cada evento de transformación (Markoulatos *et al.*, 2004).

Debido a que los eventos apilados, que se obtienen mediante la cruce entre líneas de plantas GM, se consideran nuevos eventos transgénicos, mediante el uso de estos métodos es imposible distinguir entre un evento apilado, por ejemplo el evento MON810 X NK603, y la mezcla de los OGM parentales MON810 y NK603 en una muestra (Holst-Jensen *et al.*, 2006).

## **2.14 CUANTIFICACIÓN DE OGMs POR PCR EN TIEMPO REAL.**

### **2.14.1 Fundamento de la PCR en Tiempo Real.**

La técnica de PCR en Tiempo Real (qPCR) representa una metodología práctica, rápida y confiable para detectar secuencias transgénicas en alimentos (Ahmed, 2002). La gran mayoría de los trabajos publicados para detectar OGMs en matrices complejas se respaldan en esta técnica (Barbau-Piednoir *et al.*, 2010; Huber *et al.*, 2013; Van den Bulcke *et al.*, 2010). Los sistemas de PCR en tiempo real monitorean la cantidad de producto amplificado a medida que se lleva a cabo la reacción. En este tipo de sistema, la PCR se acopla a la emisión de una señal fluorescente proporcional a la cantidad de producto generado en cada ciclo sucesivo de reacción. El primer incremento significativo de la fluorescencia se correlaciona con la cantidad inicial del molde de ADN blanco (Vinueza-Burgos, 2009). A medida que progresa la reacción de PCR, se recogen los datos de fluorescencia (valores Rn) y se construye un gráfico respecto al tiempo de reacción (número de ciclos) como se muestra en la Figura 7.



**Figura 7. Esquema de las diferentes etapas de la detección de fluorescencia en un sistema de PCR en tiempo real. En la etapa A, sólo se detecta fluorescencia de fondo. En los ciclos incluidos en la fase B se observa incremento exponencial de fluorescencia y es posible analizar medidas tanto cualitativas como cuantitativas. En C la reacción ha llegado a una fase de saturación o agotamiento de los reactivos, el nivel de fluorescencia se iguala independientemente de la cantidad de ADN inicial y la medida sólo es relevante como dato cualitativo (tiempo final). El Ct de cada muestra representa el ciclo en el que la fluorescencia alcanza el nivel de referencia (umbral), y es proporcional al número de copias de ADN iniciales en la reacción. Tomado de (López Andreo, 2013).**

La cuantificación se efectúa en la fase de crecimiento exponencial de la cantidad de ADN amplificado. El número de ciclo en el cual la emisión de la intensidad de fluorescencia se eleva por encima del ruido de fondo, se conoce como ciclo umbral o Ct (López Andreo, 2013). Cuanto mayor es la cantidad inicial de ADN genómico, más temprano se detecta el producto acumulado y más bajo resulta el valor de Ct. La cuantificación se realiza comparando el número de ciclo, Ct, en el cual la muestra problema alcanza un mismo nivel de fluorescencia que una muestra patrón, cuya concentración inicial o número de copias de ADN es conocida (Mason *et al.*, 2002). Si en cada ciclo de PCR se duplica el número de moléculas (asumiendo una eficiencia de la reacción del 100%), el valor de Ct debe ser proporcional al número de copias de ADN inicial en la muestra.

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

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



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

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

En la que E es la eficiencia de la reacción de PCR, es decir, el número medio de copias de producto de reacción por ciclo de PCR (López Andreo, 2013). La eficiencia puede ser calculada experimentalmente, tomando el valor de la pendiente de una curva de calibración realizada con diluciones seriadas de un estándar de ADN de concentración conocida (Ct vs log[ADN]). E se calcula de acuerdo a la fórmula:

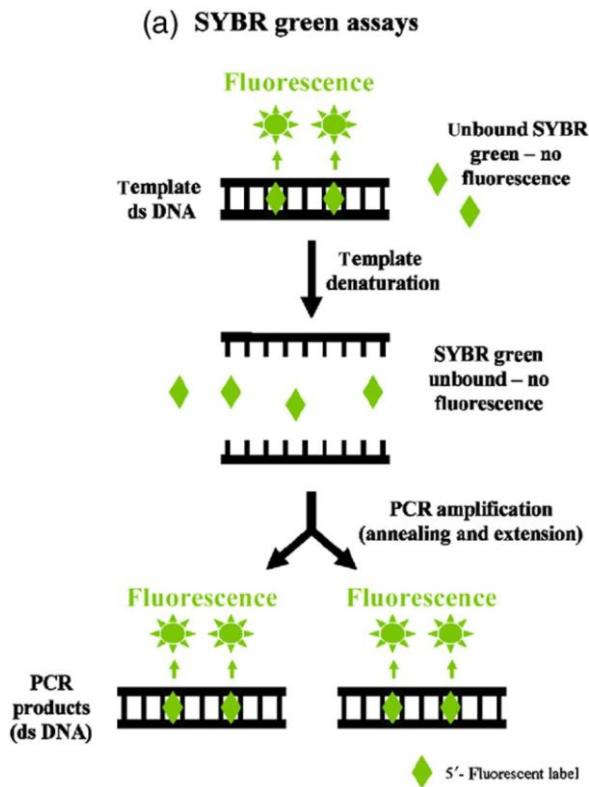
$$E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{pendiente}}\right)}$$

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

#### **2.14.2 Sistema de detección por fluorescencia.**

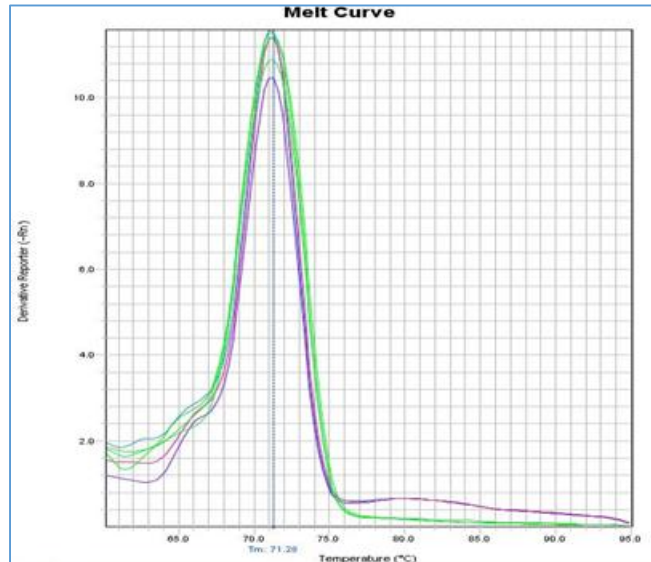
La especificidad del método de PCR en Tiempo Real depende del reactivo fluorescente utilizado para generar la señal de amplificación y del instrumento empleado para monitorearla. Los sistemas de detección por fluorescencia utilizan actualmente dos tipos de reactivos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos (Gasparic *et al.*, 2010).

Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan notablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble cadena. El más empleado en PCR en Tiempo Real es el *SYBR<sup>®</sup> Green* (Figura 8). A medida que la reacción de PCR avanza, el producto amplificado se acumula, una mayor proporción de moléculas de *SYBR<sup>®</sup> Green* se unen a las dobles hebras de ADN generadas, lo que resulta en un aumento de la señal de fluorescencia (BIO-RAD Laboratories, 2012).



**Figura 8. Detección de productos de amplificación mediante agentes intercalantes fluorescentes (SYBR Green). El colorante se une al surco del ADN bicatenario, pero no al ADN monocatenario. Como consecuencia de esta unión, se produce un incremento de la señal fluorescente (representado con estrellas color verde). Debido al aumento de la cantidad de ADN recién sintetizado tras cada ciclo de la PCR, la emisión de fluorescencia aumenta en proporción al número de moléculas del ADN bicatenario, tomado de (Smith & Osborn, 2009).**

La utilización de *SYBR<sup>®</sup> Green* es ventajosa por su simplicidad y capacidad de detectar concentraciones bajas de ADN de doble cadena, además de ser más económico que las sondas específicas. La principal desventaja es la potencial falta de especificidad ya que el *SYBR<sup>®</sup> Green* se intercala a cualquier secuencia de doble cadena, emitiendo así una señal fluorescente, dificultando la distinción entre el ADN diana y la amplificación de secuencias no diana o de la formación de dímeros de cebadores; además de la señal de fluorescencia de base de la técnica, emitida por el compuesto SYBR<sup>®</sup> Green. Por esta razón es importante implementar un análisis de la curva de disociación (*melt curve*), para verificar si se está amplificando la secuencia diana u otro artefacto (Hernández *et al.*, 2003).



**Figura 9. Curva de disociación (*melt curve*) típica generada a partir de los datos recolectados del análisis de PCR en tiempo real utilizando el colorante SYBR Green. Mediante la comparación de las temperaturas de disociación de los productos de PCR de cada muestra, se puede detectar la presencia de la secuencia diana, la presencia de un amplicón no blanco adicional, o la formación de dímeros de cebadores.**

El análisis de la curva de disociación se basa en aumentar la temperatura para que todas las cadenas de ADN que se encuentren en doble cadena se disocien a cadenas simples. De esta forma, las moléculas de SYBR® Green que se encontraban unidas al ADN de doble cadena se liberan, lo que se observa como una disminución de la fluorescencia. En una curva de disociación típica (Figura 9) se representa la intensidad de fluorescencia frente a la temperatura y se traza la primera derivada negativa ( $-d(RFU)/dt$ ). Esta derivada representará un pico característico a cada amplificación, conocido como temperatura de disociación (*melting temperature*). La temperatura de *melting* o  $T_m$ , es la temperatura a la cual el 50% de los pares de bases de bases de una doble cadena de ADN se separan. La misma dependerá del tamaño del ADN de doble cadena y de su composición en bases nitrogenadas. Cuanto mayor sea el contenido de GC (guanina-citosina) y más grande sea el tamaño de amplicón, más alta será la temperatura de disociación. Mediante la comparación de las  $T_m$  de los amplicones conocidos, se puede detectar fácilmente la presencia de un amplicón no objetivo adicional, o de la formación de dímeros de cebadores (Flores *et al.*, 2007).

### 2.14.3 Cuantificación de OGMs en alimentos.

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

Si un alimento además de contener maíz GM contiene por ejemplo soya GM, el porcentaje de material genéticamente modificado debe expresarse para cada ingrediente (especie) individualmente, sin realizar la suma de los porcentajes (Querci *et al.*, 2007). Para realizar la determinación del porcentaje de OGMs, es necesario medir el número de secuencias de ADN específicas del OGM y normalizarlo con el número de secuencias de un gen de referencia endógeno de la especie correspondiente. El porcentaje de OGMs se calcula de la siguiente manera (ENGL, 2011).

$$OGM (\%) = \frac{\text{No. de copias GM}}{\text{No. de copias de referencia}} \times 100$$

El gen de referencia endógeno debe ser específico de la especie, estar presente en una sola copia por genoma haploide, deber encontrarse estable en líneas diferentes de la misma especie y también ser fácil de amplificar. Algunos genes de referencia corresponden a: zeína (*zeine*), invertasa (*ivr*), alcohol deshidrogenasa (*adh1*), o proteínas del grupo de alta movilidad (*hmgA*) en el maíz (Hernandez *et al.*, 2004).

Mediante la PCR en Tiempo Real, sólo es posible cuantificar, en sentido estricto, el número de copias de ADN presente al inicio de la reacción. Por lo tanto, la cuantificación debe expresarse en número de copias del ADN blanco (López-Andreo, 2013).

Uno de los enfoques generales para la cuantificación de OGM en alimentos mediante la PCR en Tiempo Real es el método de las curvas patrón (cuantificación absoluta) (Querci *et al.*, 2007). En esta aproximación se realizan dos curvas patrón utilizando materiales de referencia; una para el sistema de cuantificación específico del OGM y la otra para la cuantificación del gen de referencia.

Para cada muestra, se determinan mediante interpolación con las curvas patrón, las cantidades correspondientes a la secuencia diana GM y al gen de referencia. Luego se calcula el porcentaje de GM según la fórmula anterior. Para utilizar las curvas de calibración es necesario comprobar que las eficiencias de amplificación del ADN estándar y el de la muestra son comparables (López-Andreo, 2013).

La Comisión Europea recomienda que los resultados de las medidas de OGMs, se expresen en función del número de copias de ADN; para calibrar las medidas de OGMs se utilizan materiales de referencia basadas en la fracción másica GM (%m/m, definido como la masa de soluto por cada 100 unidades de masa de disolvente), el resultado final puede convertirse a número de copias, sabiendo que estos MRC se producen con maíz hemicígoto para el transgén (Trapmann, 2006).

El número de copias de ADN contenido en una muestra de maíz puede ser calculado dividiendo la masa de ADN obtenida, por el valor 1C calculado para el genoma de la especie (2.725 pg) (Arumuganathan *et al.*, 1991). Por ejemplo, se calcula que una muestra de 100 ng de ADN genómico de maíz, contiene alrededor de 36,697 copias de genoma haploide para esa especie (Mazzara *et al.*, 2004). Por lo tanto, 100 ng de un material de referencia de maíz 0.1% GM (m/m), tendrá 36 copias de genoma transgénico.

Según la normativa de la UE, un alimento a base de maíz que contenga menos de 0.9% de maíz GM, deberá ser etiquetado como “Libre de OGMs”, pero cuando el producto contenga más de 0.9% es obligatorio que presente una etiqueta en donde se indique la presencia de organismos genéticamente modificados. En la Tabla 12 se presenta el umbral de etiquetado de OGMs establecido para algunos países.

**Tabla 12. Umbral para el etiquetado de OGMs en algunos países (IHCP, 2010).**

<b>País</b>	<b>Nivel</b>
Unión Europea	0.9%
Rusia	0.9%
Arabia Saudita	0.9%
Brasil	1%
Australia-Nueva Zelanda	1%
Corea del Sur	3%
Japón	5%
Indonesia	5%
Taiwan	5%
Tailandia	5%

El umbral establecido por la UE fue definido para contemplar posibles contaminaciones de maíces por flujo génico, por el procesado o el transporte de granos, así como por las técnicas de detección utilizadas, siendo el límite de cuantificación de la PCR de 0.1%; cabe mencionar que dicho límite en el contenido de OGM no ha considerado estudios sobre consumo de transgénicos y su posible relación con daños a la salud humana, debido a que no existen estudios clínicos al respecto.

#### **2.14.4 Materiales de Referencia Certificados.**

Los Materiales de Referencia Certificados (MRC), son elementos con propiedades estables y uniformes, autenticadas por una institución reconocida y especializada. El Instituto de Materiales y Medidas de Referencia del Centro Común de Investigación en Geel, Bélgica (IRMM), ofrece un conjunto de MRC para distintas variedades de maíz GM (European Commission, 2015). El material de referencia para OGMs utilizado en este trabajo, consistía de harina de semillas GM, con un porcentaje de pureza definido y certificado. Cada variedad transgénica, tiene un juego de materiales de referencia que incluyen distintos porcentajes GM y sus respectivos blancos no-GM.

### **2.14.5 Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).**

La sensibilidad de la técnica de PCR puede ser expresada en términos de límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ). Estos parámetros de validación dependen de la cantidad de ADN genómico utilizado para la reacción, del tamaño del genoma de las especies y del número de transgenes insertados.

El límite de detección para esta metodología se define como la menor concentración de ADN transgénico (LOD relativo en % m/m, LOD absoluto en número de copias), que puede ser detectada en un 95% de las determinaciones.

El límite de cuantificación se define como la menor concentración de ADN transgénico que puede determinarse cuantitativamente, con un nivel aceptable de precisión y exactitud (CEN European Comitee for Standarization, 2005).

El número mínimo de copias que se puede cuantificar depende del error analítico aceptado y de la sensibilidad del método de detección de PCR. Para el análisis de alimentos transgénicos, el límite de detección de los métodos de PCR se encuentra en el intervalo de 1-10 copias de la secuencia diana o 0.01%% m/m de OGM, mientras que el límite de cuantificación se encuentra en un intervalo de 10-100 copias o 0.1% m/m de OGM (Querci *et al.*, 2007).

### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1 Objetivo general.**

- Detectar la presencia de secuencias transgénicas de maíz y residuos de herbicidas en alimentos elaborados con maíz y que se encuentran disponibles en México.

#### **3.2 Objetivos particulares.**

- Determinar la presencia de maíz GM en muestras alimentarias utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real (SYBR® Green).
- Utilizar una estrategia de *escrutinio* de OGM mediante la detección del promotor CaMV 35S y terminador T-NOS.
- Identificar eventos transgénicos específicos de maíz en las muestras alimentarias, utilizando los cebadores específicos para seis diferentes variedades de maíz genéticamente modificado: Bt176, NK603, TC1507, GA21, Bt11 y MON810.
- Cuantificar el contenido transgénico en muestras alimentarias de maíz.
- Cuantificar residuos del herbicida glifosato, ácido aminometilfosfónico y glufosinato de amonio.

### **4. HIPÓTESIS**

Dado que en México se encuentran aprobados 68 eventos de maíz transgénico para consumo humano y animal, que actualmente se importan desde Estados Unidos alrededor de 11 millones de toneladas de maíz que no es etiquetado como transgénico, que no existe trazabilidad de dicho maíz y que se ha detectado desde 2001 presencia de maíz transgénico en el campo mexicano, se espera encontrar secuencias genéticamente modificadas en productos alimentarios elaborados a base de maíz comercializados en el país.



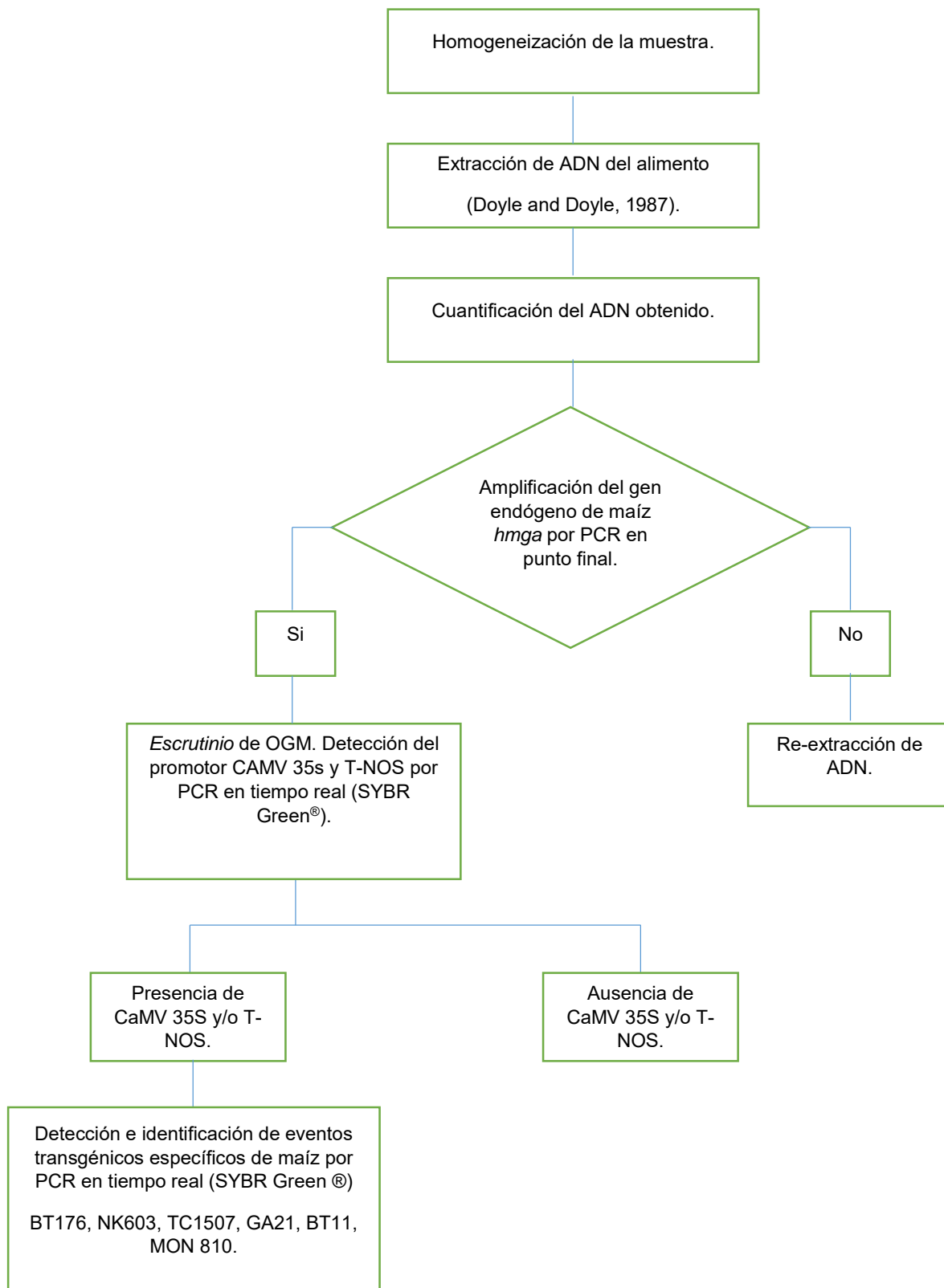
## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Método

La detección e identificación de secuencias transgénicas en alimentos se llevó a cabo mediante el método ilustrado en la Figura 10.

Se buscó obtener ADN de buena calidad y en cantidad suficiente a partir de muestras de alimentos elaborados con maíz. Se detectó mediante la estrategia de escrutinio de OGM por PCR en Tiempo Real, la presencia del promotor CAMV 35S y del T-NOS. Posteriormente todas las muestras se analizaron para la presencia de eventos transgénicos de maíz específicos BT176, NK603, TC1507, GA21, BT11 y MON810.

También se cuantificó el contenido transgénico en 29 de las muestras alimentarias y finalmente se cuantificó en un laboratorio certificado externo la presencia del herbicida glifosato, su metabolito AMPA y el glufosinato de amonio en 16 muestras de alimentos por HPLC (Cromatografía de líquidos de alta eficiencia) con derivatización pos-columna.



**Figura 10. Diagrama metodológico empleado en la detección e identificación de secuencias transgénicas de maíz en alimentos (PCR en Tiempo Real con SYBR® Green).**

## 5.2 Muestras Alimentarias.

Se recolectaron 156 muestras alimentarias elaboradas con maíz, 35 muestras corresponden a tortillas, 46 muestras a botanas de maíz, 30 muestras a harinas, 30 muestras a tostadas y 15 muestras a cereales. Las muestras se recolectaron en el mercado nacional entre junio de 2014 y julio de 2015.

## 5.3 Materiales de referencia.

Para realizar la detección e identificación de secuencias transgénicas, como controles positivos y negativos se utilizaron Materiales de Referencia Certificados (MRC) importados desde IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) y por el ERM (European Reference Materials).

Como controles positivos se emplearon harinas certificadas de cinco variedades transgénicas de maíz y como controles negativos se utilizaron sus respectivos blancos no GM (*blanks*): Bt176, NK603, TC1507, GA21, Bt11 y MON810. (Tabla 13).

**Tabla 13. Material de Referencia utilizado para la detección e identificación de secuencias transgénicas.**

Control Positivo	Control Negativo ( <i>blank</i> )
ERM-BF411f, Bt176 Maize (Level 5, 5% GMO)	ERM-BF411a, Bt176 Maize (blank, 0% GMO)
ERM-BF415f, NK603 Maize (Level 5, 5% GMO)	ERM-BF415a, NK603 Maize (blank, 0% GMO)
ERM-BF418d, TC1507 Maize (Level 3, 10% GMO)	ERM-BF418a, TC1507 Maize (blank, 0% GMO)
ERM-BF414f, GA21 Maize (Level 5, 5% GMO)	ERM-BF414a, GA21 Maize (blank, 0% GMO)
ERM-BF412f, Bt11 Maize (Level 5, 5% GMO)	ERM-BF412a, Bt11 Maize (blank, 0% GMO)
ERM-BF413ek, MON810 Maize	ERM-BF413ak, MON810 Maize (blank, 0% GMO)

#### **5.4 Extracción de ADN.**

Las muestras alimentarias se pulverizaron con nitrógeno líquido utilizando un mortero estéril. Para la extracción de ADN se realizaron algunas modificaciones del protocolo de Doyle y Doyle (Anexo I) para tejidos vegetales (Doyle & Doyle, 1990).

Se añadieron 1.5  $\mu\text{L}$  de RNAsa (10 mg/mL) a las muestras para evitar tener una concentración elevada de ARN que pudiera interferir en la cuantificación. Las muestras obtenidas se rotularon y almacenaron en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Una vez extraído el ADN, se cuantificó la concentración de ácidos nucleicos, utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop 2000<sup>®</sup> a 260 nm. Generalmente se consideran “puras” las muestras de ADN cuya relación de absorbancia a 260 nm/280 nm sea de aproximadamente 1.8 (Thermo Scientific, 2012).

Cada muestra de ADN extraído fue diluida en  $\text{H}_2\text{O}$  mQ hasta una concentración final de 50 ng/ $\mu\text{L}$  para ser utilizadas en los ensayos de PCR en punto final y PCR en Tiempo Real. Las muestras se almacenaron en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### **5.5 Detección de gen endógeno de maíz *hmga* por PCR en Punto Final.**

Para confirmar la presencia de ADN de maíz y descartar la presencia de inhibidores de la PCR, se amplificó el gen endógeno *hmga* (High Mobility Group proteins), que codifica para una proteína del grupo de alta movilidad de maíz; se ha demostrado que el gen *hmga* está presente en el genoma haploide de maíz en una sola copia y aunque esto podría ser problemático cuando se utilizan plásmidos como moléculas de referencia, se han desarrollado metodologías, como la PCR en Tiempo Real en donde el gen *hmga* se ha seleccionado como un gen de referencia endógeno de maíz en muchos de los protocolos validados por la European Commission para la detección de secuencias transgénicas en maíz y sus derivados (Salvi *et al.*, 2008).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen total de 15  $\mu\text{L}$ , el contenido de cada tubo de reacción fue el siguiente: 2  $\mu\text{L}$  de ADN molde (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 0.3  $\mu\text{L}$  del cebador o primer forward (20 mM), 0.3  $\mu\text{L}$  del cebador o primer reverse (20 mM), 0.18  $\mu\text{L}$  de DNA polimerasa (1U), 1.5  $\mu\text{L}$  Buffer 10X, 0.45  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 1.2  $\mu\text{L}$  dNTPs (10 mM) y  $\text{H}_2\text{O}$

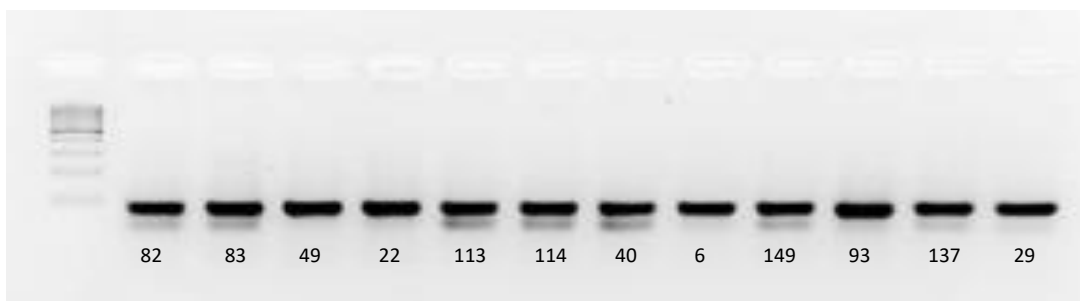
mQ c.s.p 15 µL. Los cebadores utilizados están reportados por el Joint Research Centre (JRC) de la Unión Europea y se encuentran en la Tabla 14.

**Tabla 14. Cebadores utilizados para la detección del gen endógeno *hmga* de maíz. (JRC, 2011).**

CEBADOR	NOMBRE	SECUENCIA 5´- 3´	Tm (°C)	TAMAÑO DEL AMPLICÓN	TEMP. TRABAJO	Método Ref.
Directo o Forward	HMGA-F	TTG GAC TAG AAA TCT CGT GCT GA	58.9	79 pb	60°C	QT/ZM/020
Reverso o Reverse	HMGA-R	GCT ACA TAG GGA GCC TTG TCC T	62.1			

La PCR se llevó a cabo con un programa de ciclado de 4 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, seguida de 35 ciclos: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C y 30 segundos a 72°C. Finalmente una extensión de 7 minutos a 72°C.

Los productos de PCR se analizaron a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio (Figura 11).



**Figura 11. Productos de PCR para la amplificación del gen endógeno de maíz *hmga* en muestras de alimentos (Los números indican el número de muestra de la que se extrajo el material genético).**

## 5.6 Escrutinio de secuencias transgénicas en alimentos.

Para el rastreo de OGMs en alimentos se eligieron como secuencias diana de detección al promotor CaMV 35S y el terminador T-NOS, debido a la presencia de al menos uno de

éstos en todos los eventos transgénicos aprobados en México para consumo humano, con excepción de los eventos DAS40278 y LY038 (Anexo III). Estas secuencias también están presentes en la mayoría de los eventos liberados en países que exportan sus productos a México (ISAAA, 2015b).

El escrutinio por PCR en Tiempo Real se realizó utilizando SYBR® Green. El protocolo para la detección del promotor 35S CaMV con SYBR® Green fue puesto a punto y se verificó previo al análisis de los alimentos.

### 5.7 Puesta a punto del escrutinio de OGMs por PCR en Tiempo Real (SYBR® Green).

El método de escrutinio de OGMs por qPCR se basó en el protocolo realizado por Barbau-Piednoir y colaboradores (Barbau-Piednoir *et al.*, 2009). El método consiste en la amplificación de las secuencias del promotor CaMV 35S y del terminador T-NOS, mediante el uso de cebadores específicos y la detección de los productos amplificados a partir de la señal fluorescente emitida por el agente intercalante SYBR® Green. Dicho protocolo ha sido validado como Método de Referencia por el Joint Research Centre (Método QL-ELE-00-17).

Se realizó la puesta a punto del método evaluando parámetros de validación tales como la especificidad y selectividad de los cebadores utilizados (Tabla 15). Posteriormente se analizó cada una de las muestras alimentarias.

**Tabla 15. Cebadores utilizados para el escrutinio de OGMs en tiempo real.**

Secuencia Diana	Cebador	Secuencia 5'-3'	Tm °C	Tamaño amplicón	Temp. trabajo	Método de Ref.
<b>CaMV 35S</b>	CAMVp35S-F	GCCTCTGCCGACAGTG GT	60	82 pb	60°C	SC/ELE/012
	CAMVp35S-R	AAGGCGTGGTTGGAAC GTCTT	60.3			
<b>T-NOS</b>	t-Nos F	CATGTAATGCATGACG TTATTTAT	59.3	84 pb	60°C	SC/ELE/012
	t-Nos R	TTGTTTTCTATCGCGTA TTAAATGT	64.4			

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un equipo ABI 7500 PCR System (Applied Biosystems), en un volumen final de 7 µL, conteniendo: 2 µL de ADN (50 ng/µL), 3 µL de

SYBR® Green PCR Mastermix con ROX (Life Technologies, Thermo Scientific), 5mM de cada cebador. El programa de ciclado consta de: un ciclo de activación de la enzima ADN polimerasa de 2 minutos a 50°C y posteriormente 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95°C (desnaturalización) y 1 minuto a 60°C (*annealing* y extensión). Adjunto al ciclado de amplificación, se programa un ciclo para las curvas de fusión (*melting curve*) de los productos obtenidos. Se concreta un ascenso de temperatura desde 60°C a 95°C y se recolectan los datos de intensidad de fluorescencia cada minuto.

### 5.8 Análisis de datos.

Los valores obtenidos para cada reacción se normalizaron contra la señal de fluorescencia de la zona de referencia interna ROX (referencia pasiva). El Software StepOne v.2.3 de Applied Biosystems, calculó automáticamente la línea de base y el umbral (*threshold*) para cada reacción, en algunas ocasiones se ajustaron estos parámetros manualmente. Para cada muestra se registró el ciclo umbral (Ct), que corresponde al número de ciclo en el que la fluorescencia generada por el SYBR® Green sobrepasó la línea de *threshold*.

Se establecieron cuatro criterios obligatorios para considerar a una muestra como positiva para la presencia de un marcador transgénico (CaMV 35S o T-NOS y/o algún evento transgénico específico de maíz):

- 1) Cuando la señal de fluorescencia obtenida sobrepasa la línea umbral de detección.
- 2) Cuando se observa una señal detectable en el control positivo y no se observa fluorescencia en el control negativo (blanco).
- 3) Cuando el valor de Ct de la muestra no sobrepasa el ciclo número 36.5 (definido experimentalmente). Debido a que después de este ciclo la señal de amplificación detectada podría deberse a una amplificación inespecífica.
- 4) Cuando el producto de amplificación presenta un único pico de temperatura en la curva de disociación, con un valor de Tm igual al obtenido para el respectivo control positivo. Se toleró una desviación de  $\pm 1^\circ\text{C}$ .

## 5.9 Especificidad y selectividad de los cebadores para el método de escrutinio.

Se evaluó la capacidad de los cebadores CaMVp35s F/R y t-NOS F/R de amplificar de manera específica la secuencia blanco correspondiente. Se analizó el material certificado de referencia (MCR): ERM-BF412f correspondiente a la línea de maíz Bt11 (5%) que contiene tanto la secuencia transgénica CaMV 35S como la T-NOS.

Para descartar la presencia de falsos positivos en el método, se analizó el material de referencia certificado no transgénico (blanco no-GM). Además, en cada una de las pruebas se incluyó un blanco de reacción sin ADN para evaluar la formación de dímeros de cebadores y la intensidad de la fluorescencia base del método.

## 5.10 Sensibilidad y cálculo del Límite de Detección (LOD).

El límite de detección de la técnica fue definido como la menor concentración de ADN transgénico (LOD relativo en % m/m) que puede ser detectada en un 95% de las determinaciones (ISO 21571, 2005). Este límite se calculó para ambas secuencias blanco, promotor CaMV 35S y T-NOS. Para ello, realizaron ensayos con distintas concentraciones de material GM del MRC de la línea NK603 que contiene al promotor CaMV 35S y al T-NOS): 5%, 1%, 0.1%, 0.01% (m/m) y se definió el menor valor para el cual las cuatro réplicas dieron positivas.

Se construyeron las curvas de calibración para cada juego de cebadores, graficando los valores de Ct, respecto al logaritmo (log) de las concentraciones de los MRC. A partir de las curvas de calibración se calcularon las eficiencias de las reacciones como se presenta a continuación:

$$Eficiencia = 10^{\left(-\frac{1}{pendiente}\right)} - 1 \times 100$$

Posteriormente se analizaron las muestras de ADN extraídas de distintos alimentos de maíz. Cada ensayo se realizó por triplicado colocando una cantidad de 100 ng en la reacción de PCR.



### 5.11 Identificación de eventos específicos de maíz transgénico por PCR en Tiempo Real (SYBR® Green).

Una vez realizado el escrutinio de OGM en los alimentos se continuó con los ensayos de PCR en Tiempo Real para la identificación de eventos específicos. En este estudio se monitorearon cinco eventos transgénicos específicos de maíz aprobados en México: Bt11, NK603, TC1507, GA21, MON810; y uno no aprobado para consumo: Bt176.

Se utilizaron cebadores específicos diseñados para la técnica de PCR en Tiempo Real que amplifican la región de unión entre el genoma de la planta y la construcción génica, específica del evento buscado (Tabla 16). La identificación con SYBR® Green fue puesta a punto y validada con los materiales de referencia certificados del IRMM. Cada reacción se llevó a cabo en 7 µL totales, conteniendo: 2 µL de ADN (50 ng/µL), 3 µL de SYBR® Green PCR Mastermix con ROX (Life Technologies, Thermo Scientific), 1 µL del cebador forward [5 mM] y 1 µL del cebador reverse [5 mM].

**Tabla 16. Cebadores utilizados para la identificación de eventos específicos de maíz transgénico.**

Evento	Primer	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	Tamaño del amplicón	Temp. de trabajo	Método de Referencia
Bt11	Bt11-INS-F	GCG GAA CCC CTA TTT GTT TA	55.3	70 bp	60°C	QT-EVE-ZM-006
	Bt-11-3'JUN-R	TCC AAG AAT CCC TCC ATG AG	57.3			
NK603	NK603-F	ATG AAT GAC CTC GAG TAA GCT TGT TAA	65.6	108 bp	60°C	QT-EVE-ZM-008
	NK603-R	AAG AGA TAA CAG GAT CCA CTC AAC ACT	65			
TC1507	TC1507-F	TAG TCT TCG GCC AGA ATG G	58	58 bp	60°C	QT-EVE-ZM-010
	TC1507-R	CTT TGC CAA GAT CAA GCG	54			
GA21	GA21-OTP-F	GAAGCCTCGGCAACGTC	58	133 bp	60°C	QT-CON-00-008
	GA21-ESPS-R	ATCCGGTTGGAAAGCGACTT	57.3			
Bt176	Bt-176- CryIA(b)-F	TGT TCA CCA GCA GCA ACC AG	59.4	100 bp	60°C	QT-CON-00-007
	Bt-176-IVS9PEPC-R	ACTCCACTTTGTGCAGAACAGA TCT	61.3			
MON810	Mon810-IVS-HSP-F	GAT GCC TTC TCC CTA GTG TTGA	64.3	113 bp	60°C	QT-CON-00-004
	Mon810-CRY 1A(B)-R	GGA TGC ACT CGT TGA TGT TTG	65.4			

Se utilizó un termociclador ABI 7500 PCR System (Applied Biosystems) con el programa de ciclado de la estrategia de escrutinio: un ciclo de activación de la enzima ADN polimerasa de 2 minutos a 50°C y posteriormente 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 15 segundos a 95°C (desnaturalización) y 1 minuto a 60°C (*annealing* y extensión). Finalizada la reacción de amplificación se programa un ascenso gradual de temperatura desde 60°C a 95°C y se tomaron los datos de intensidad de fluorescencia cada minuto. Lo anterior se realiza para registrar la temperatura de disociación (*melting*) de los productos obtenidos.

Para considerar una muestra como positiva o negativa, se siguieron los mismos que para la estrategia de escrutinio de OGM por SYBR® Green.

### **5.12 Especificidad y selectividad de los cebadores evento-específicos.**

Para asegurar que los cebadores amplifican única y específicamente los eventos transgénicos correspondientes, el par de cebadores de cada evento transgénico por analizar fue probado sobre los materiales de referencia certificados del evento específico y sobre cada una de las líneas transgénicas para los cuales se contaba con material de referencia. En cada reacción, se analizaron los controles no-GM, así como el blanco de PCR (sin ADN) para poder descartar falsos positivos del método, observar si existía formación de dímeros de cebadores o potenciales estructuras secundarias entre los cebadores que pudieran ser detectadas por el instrumento y evaluar la intensidad de fluorescencia de base de cada reacción específica.

### **5.13 Sensibilidad y cálculo de Límite de Detección (LOD).**

De la misma forma que para el método de escrutinio de OGMs por SYBR® Green, el límite de detección se definió como la menor concentración de ADN transgénico (LOD) relativo en (% m/m) que pudo ser detectada en un 95% de las determinaciones (ISO 21571, 2005). Para cada estrategia evento específica se ensayaron distintas concentraciones del MRC genéticamente modificado correspondiente, con un contenido GM de 5%, 1%, 0.1% y 0.01%, y se definió el menor valor para el cual se obtuvo una señal de fluorescencia por encima del umbral detectable. A partir de estos resultados se generaron

las curvas de calibración correspondiente y se calcularon las eficiencias de reacción como se presentó anteriormente.

Posteriormente se analizaron las muestras de ADN extraídas de los alimentos procesados. Cada alimento se analizó por triplicado, colocando una cantidad de 100 ng de ADN extraído en la reacción de PCR.

#### **5.14 Cuantificación de OGMs mediante qPCR (SYBR® Green).**

Esta metodología se llevó a cabo en colaboración con la M. en B. Mailén Arleo del Laboratorio de Trazabilidad Molecular Alimentaria de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República de Uruguay.

La cuantificación de OGMs mediante SYBR® Green para 29 de las muestras alimentarias, se realizó diseñando dos curvas de calibración, una para el gen endógeno de maíz *hmga* (normalizador) y una para el promotor CaMV 35S. Las curvas se construyeron utilizando diluciones del material de referencia certificado (MRC), de la línea NK603 (5% GM) que contiene al promotor 35S, conteniendo aproximadamente 100, 50, 10, 1, y 0,1 ng de ADN genómico. Estas concentraciones corresponden a 18348, 3670, 367 y 36 copias del genoma haploide de maíz (considerando el valor 1C de la especie), y 917, 184, 18, y 2 copias de material GM respectivamente (Mazzara *et al.*, 2004).

Los valores obtenidos de Ct fueron graficados con respecto al logaritmo (log) del producto amplificado y tras la regresión lineal, se obtuvo el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y la pendiente. A partir del valor de esta última, se calcularon las eficiencias de cada reacción. El límite de cuantificación (LOQ) se definió como la menor cantidad de material transgénico que pudo determinarse cuantitativamente con un nivel aceptable de precisión y exactitud, y se estimó a partir de las curvas de calibración.

#### **5.15 Cálculo del porcentaje de OGMs en muestras alimentarias.**

Para las 29 muestras cuantificadas, se determinaron mediante interpolación con las curvas patrón, las cantidades correspondientes al gen de referencia y a la secuencia

promotora. El contenido de OGMs en porcentaje, se estimó como el cociente entre la cantidad de secuencias de promotor CaMV 35S sobre la cantidad de gen endógeno, multiplicado por 100. Los cálculos se realizaron utilizando una planilla de cálculo diseñada especialmente para trazar las curvas patrón, calcular las eficiencias de reacción, calcular las concentraciones para cada secuencia blanco y estimar el contenido (porcentaje de OGMs) en las muestras, tomando en cuenta las desviaciones de la técnica y un factor normalizador que contempla la diferencia entre las eficiencias de las dos curvas patrón. Para amplificar la secuencia del promotor CaMV 35S se utilizó el juego de cebadores CaMV F/R (ver Tabla 15) y para amplificar el gen *hmga*, se utilizaron los cebadores HMGA F/R (ver Tabla 14).

Las reacciones se llevaron a cabo en 25  $\mu$ L totales, conteniendo: 2  $\mu$ L de ADN (25 ng/ $\mu$ L), 12.5  $\mu$ L de SYBR® Green PCR Mastermix con ROX (*Life technologies*), 1  $\mu$ L del cebador *directo* (10  $\mu$ M) y 1  $\mu$ L del cebador *inverso* (10  $\mu$ M) y H<sub>2</sub>O mQ c.s.p. 25  $\mu$ L.

Se utilizó el equipo ABI 7500 PCR System (*Applied Biosystems*), el cual se programó de la siguiente manera: un ciclo de activación de la enzima ADN polimerasa por 10 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 30 segundos a 95°C para la desnaturalización, y 1 minuto a 60°C para el *annealing* y la extensión. Al finalizar la reacción de amplificación, se realizó el análisis de la temperatura de *melting* de los productos obtenidos. Para ello se programó un ascenso gradual de temperatura desde 60°C a 95°C y se tomaron los datos de intensidad de fluorescencia cada 30 segundos. El análisis de los datos, y los criterios de aceptación para considerar una muestra como positiva, fueron los mismos que se utilizaron para el escrutinio de OGM por SYBR® Green.

## 6. RESULTADOS

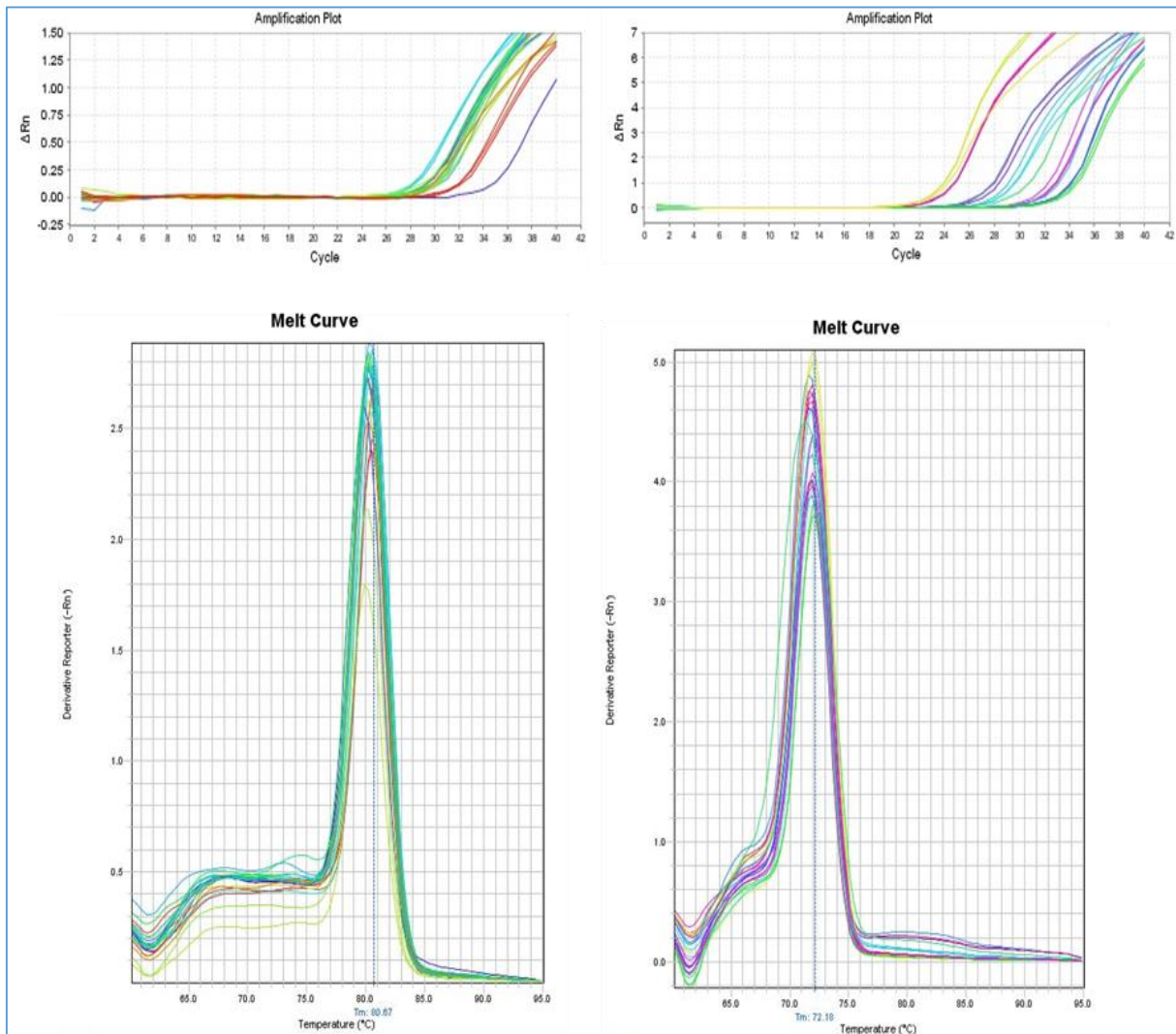
### 6.1 Especificidad de los cebadores CaMVp35S F/R y Tnos F/R utilizados en este estudio.

Los cebadores utilizados para detectar al promotor CaMV 35S y los utilizados para detectar el terminador T-NOS, resultaron ser específicos (Tabla 17).

**Tabla 17. Ensayo de especificidad y selectividad para el juego de cebadores CaMVp35S F/R y Tnos F/R. Se representan los valores obtenidos del ciclo umbral (Ct) y las temperaturas de melting (Tm) para los MRC, las líneas transgénicas Bt11, Bt176, TC1507, GA21, MON810 y NK603, y para sus respectivos blancos no transgénicos. Si: la secuencia blanco está presente; No: la secuencia blanco está ausente; (-) No hubo amplificación o la misma se encontró por debajo del límite de detección, con valores de Ct >36,5. (\*) pico de Tm no característico para la secuencia blanco.**

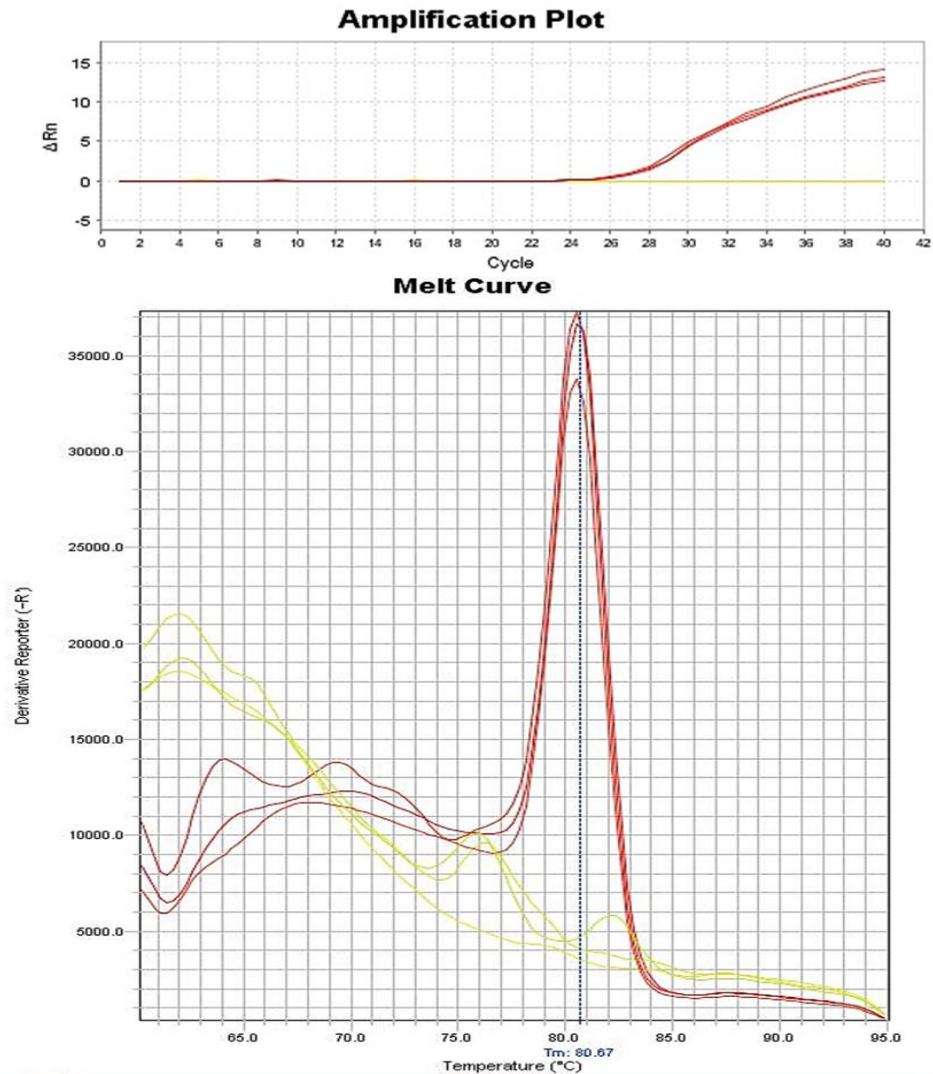
Material de Referencia Certificado				Cebadores			
Línea	% GM (m/m)	Secuencia blanco		CaMVp35S F/R		Tnos F/R	
		CaMV 35S	T-NOS	Ct	Tm	Ct	Tm
Bt11 (GM)	5%	Si	Si	29.1	80.8	29.5	73.2
Bt176 (GM)	5%	Si	No	27.2	80.1	-	63.5*
TC1507 (GM)	10%	Si	No	28.4	79.8	-	63.8*
GA21 (GM)	5%	No	Si	-	65.1*	29.7	73.1
MON810 (GM)	10%	Si	No	29.2	79.9	-	62.9*
NK603 (GM)	2%	Si	Si	28.9	80.2	29.1	72.6
Bt11 (blanco)	0%	No	No	-	64.5*	-	62.5*
Bt176 (blanco)	0%	No	No	-	66.0*	-	63.9*
TC1507 (blanco)	0%	No	No	-	65.6*	-	64.0*
GA21 (blanco)	0%	No	No	-	64.8*	-	63.9*
MON810 (blanco)	0%	No	No	-	65.5*	-	62.8*
NK603 (blanco)	0%	No	No	-	64.4*	-	63.6*
Control sin ADN	-	No	No	-	62.2*	-	62.9*

Para el par de cebadores CaMVp35S F/R, se obtuvieron señales de fluorescencia por encima del umbral detectable en las líneas transgénicas Bt11, Bt176, TC1507, MON810 y NK603, las cuales contienen al promotor 35S en la secuencia recombinante (Figura 12).



**Figura 12. Ejemplo de curvas de amplificación y de disociación (melting) obtenidas en el escrutinio de OGM mediante qPCR (SYBR® Green) en las muestras de alimentos. (arriba) Curvas obtenidas para la amplificación del promotor CaMVp35S (izquierda) y del Terminador *nos* (derecha). (Abajo) Curvas de disociación correspondientes a los productos de amplificación utilizando los cebadores CaMVp35S F/R (izquierda) y los cebadores t-Nos F/R (derecha). Para ambos casos se observan picos únicos de  $T_m$ , característicos de la secuencia diana (CaMVp35S  $T_m$  (°C) =  $80 \pm 1$ ; t-Nos  $T_m$  (°C) =  $73 \pm 1$ ).**

No se detectó señal en la línea de maíz GA21, tampoco en los MRC no transgénicos (blancos), ni en el control negativo de PCR (sin ADN), que carecen de dicho elemento genético. Debido a que no se observó la presencia de falsos positivos en este ensayo, la especificidad para el juego de cebadores CaMVp35S F/R se consideró de 100% (Figura 13).



**Figura 13. (Arriba) Curvas obtenidas para la amplificación de los MRC del control positivo (rojo) y negativo (amarillo) del promotor CaMV 35S. (Abajo) Curvas de disociación correspondientes a los productos de amplificación utilizando los cebadores CaMVp35S F/R sobre el control positivo (rojo) y negativo del promotor CaMV 35S (amarillo). Se observan un pico único de  $T_m$  (rojo), característicos de la secuencia diana CaMVp35S  $T_m$  ( $^{\circ}\text{C}$ ) =  $80 \pm 1$ , en amarillo se observa una curva de disociación inespecífica correspondiente al control negativo del promotor CaMV 35S, esta curva se observa de forma similar para los controles negativos de otras secuencias diana.**

Después de visualizar las curvas de fluorescencia para los MRC, se analizaron las temperaturas de disociación o *melting* ( $T_m$ ) de los productos amplificados con los dos juegos de cebadores. La curva de disociación obtenida con el par de cebadores CaMVp35S F/R sobre los MRC de las líneas Bt11, Bt176, TC1507, MON810 y NK603, resultaron en un pico único de  $T_m = 80 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . El mismo es característico de la secuencia del promotor 35S (Figura 12). Este pico no fue observado en el control de la línea GA21,

ni en los blancos no-GM, o en el control negativo de PCR (sin ADN), que carecen de esta secuencia recombinante. Sin embargo, para estos últimos controles, se observó un ligero pico de  $T_m = 65 \pm 1^\circ\text{C}$ , cuya intensidad de fluorescencia resultó insignificante respecto a la obtenida para el pico de  $T_m = 80 \pm 1^\circ\text{C}$ , este pico inespecífico podría estar indicando la formación de dímeros de cebadores y/o la presencia de una señal de fluorescencia de base de la técnica (Figura 13).

Para el par de cebadores *Tnos F/R*, se observaron señales de fluorescencia por encima del umbral detectable en las líneas transgénicas Bt11, GA21 y NK603, las cuales contienen en su construcción a la secuencia terminadora T-NOS (Figura 12). No se detectaron señales de fluorescencia para las líneas transgénicas Bt176, TC1507 y MON810 que no poseen la secuencia T-NOS, ni para los blancos no-GM o para el control negativo de PCR (sin ADN). La especificidad obtenida para el juego de cebadores *Tnos F/R*, fue establecida en 100%.

El análisis de la curva de disociación de los productos amplificados con el par de cebadores *Tnos F/R*, mostró un pico único de  $T_m = 73 \pm 1^\circ\text{C}$  en los materiales de referencia Bt11, GA21 y NK603 (Figura 12), no así en las líneas Bt176, TC1507 y MON810, tampoco en los blancos ni en el control negativo de PCR. Sin embargo, se observó un pico inespecífico de baja intensidad de  $T_m = 63 \pm 1^\circ\text{C}$ , que podría corresponder a la formación de dímeros de cebadores.

## **6.2 Sensibilidad y Límite de detección (LOD).**

Para calcular el límite de detección de la estrategia de escrutinio, se ensayaron distintas concentraciones del material de referencia de la línea de maíz NK603: 5%, 1%, 0.1%, 0.01%, (m/m) de material GM. Para los dos juegos de cebadores CaMVp35S y *Tnos F/R*, el Límite de Detección (LOD) fue definido en 0.01%(m/m) GM.

Este valor de 0.01% de material GM obtenido para las dos estrategias, equivale a 2 copias de ADN transgénico. El cálculo de copias equivalentes haploides a partir del valor de % m/m, se realizó teniendo en cuenta la naturaleza hemigota del transgén de la línea NK603 y tomando en cuenta que en su construcción contiene una sola copia del promotor CaMV 35S y una copia del T-NOS.



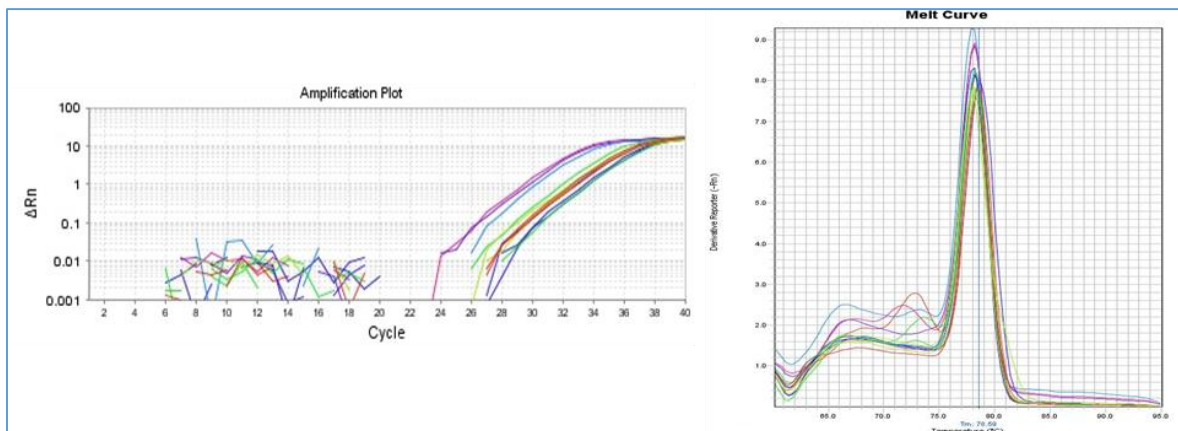
Con base en estos resultados, el escrutinio de OGMs para ambas secuencias abarca un intervalo de detección de 0.01% a 5% (m/m) de material genéticamente modificado, el cual permite detectar el valor límite de 1% establecido para el etiquetado de alimentos GM en la Unión Europea.

Este ensayo sirve únicamente para estimar la cantidad de OGMs presentes y no como un método cuantitativo. La cuantificación de OGMs debe realizarse normalizando la cantidad de secuencias GM, respecto a la cantidad de secuencias endógenas de la especie.

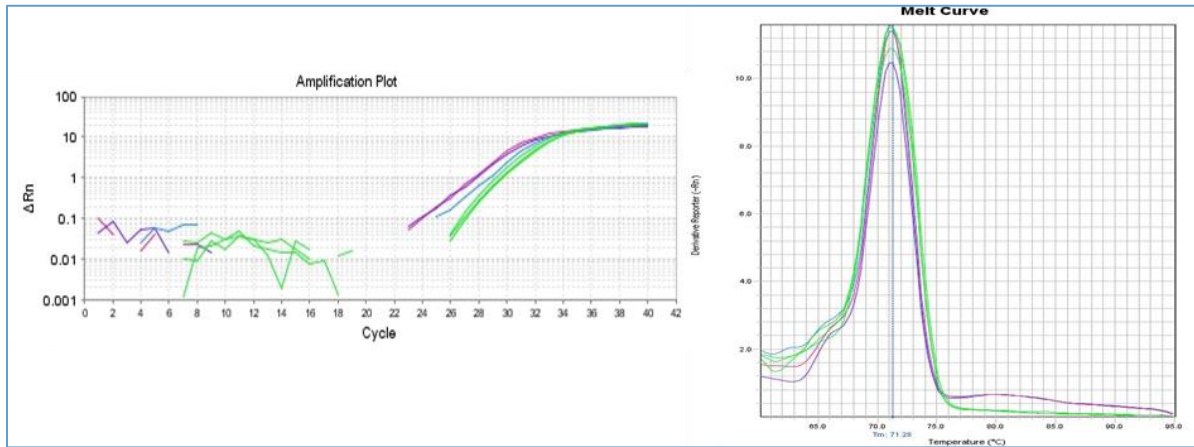
### 6.3 Identificación de eventos transgénicos específicos de maíz en muestras alimentarias mediante PCR en Tiempo Real.

#### 6.3.1 Especificidad de los cebadores utilizados en este estudio.

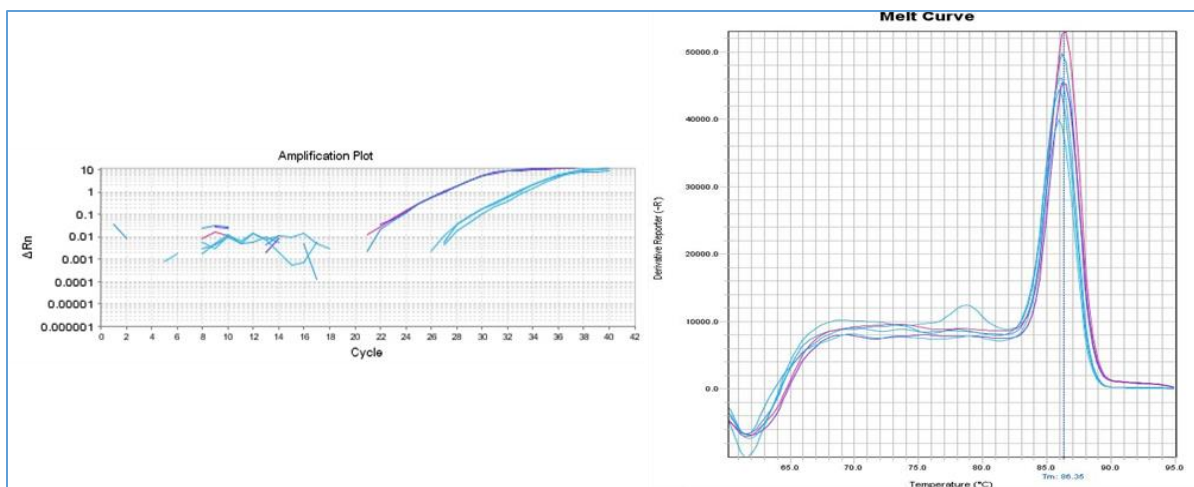
Se analizó la especificidad de cada juego de cebadores diseñados para amplificar de manera específica los eventos transgénicos correspondientes. Se realizaron los ensayos sobre los materiales de referencia correspondientes a cada par de cebadores y sobre las demás líneas transgénicas, así como sobre líneas no GM (blancos) y sobre los controles negativos de PCR (sin ADN) para evaluar la presencia de dímeros de cebadores y observar la señal de base de fluorescencia, así como para identificar posibles falsos positivos (Figura 12 a Figura 17).



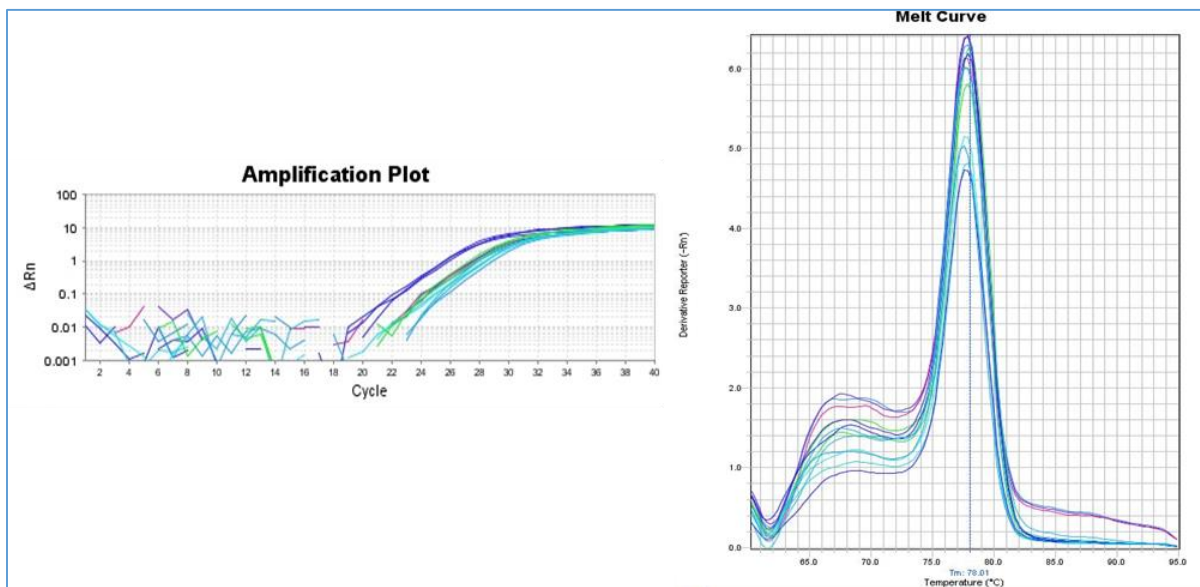
**Figura 12. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento MON810.** Curvas de amplificación (representación logarítmica) (izquierda). Curvas de melting obtenidas con los cebadores MON810 f/R (derecha). Se observa un pico único de  $T_m$ , característico de la secuencia diana buscada ( $T_m$  (°C) =  $79 \pm 1$ ).



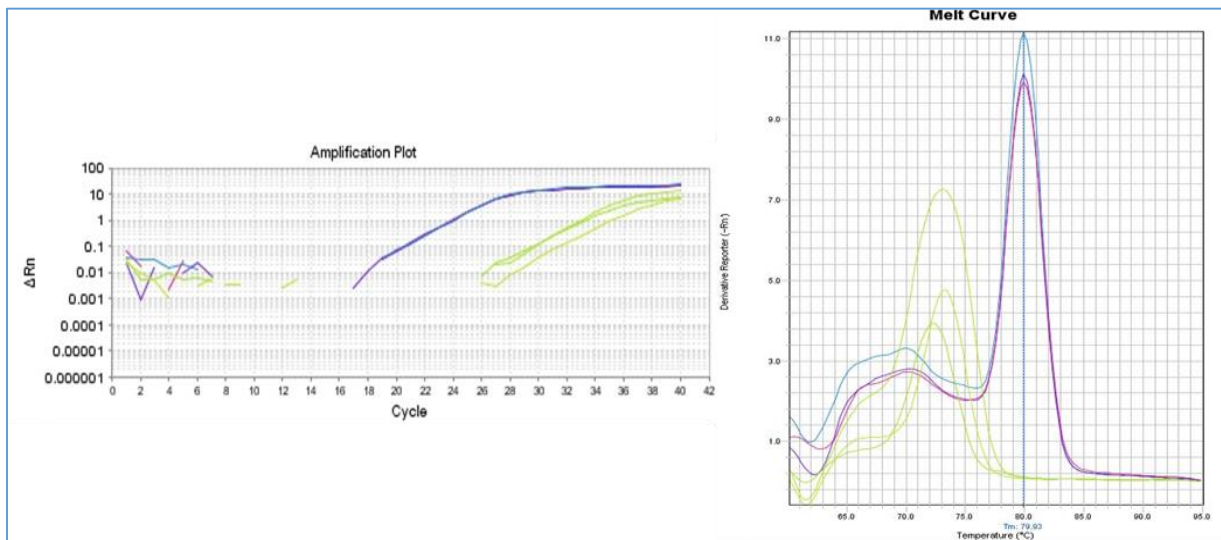
**Figura 13. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento Bt11.** Curvas de amplificación (representación logarítmica) (izquierda). Curvas de disociación obtenidas con los cebadores Bt11 F/R (derecha). Se observa un pico único de  $T_m$ , característico de la secuencia diana buscada ( $T_m$  (°C) =  $72 \pm 1$ ).



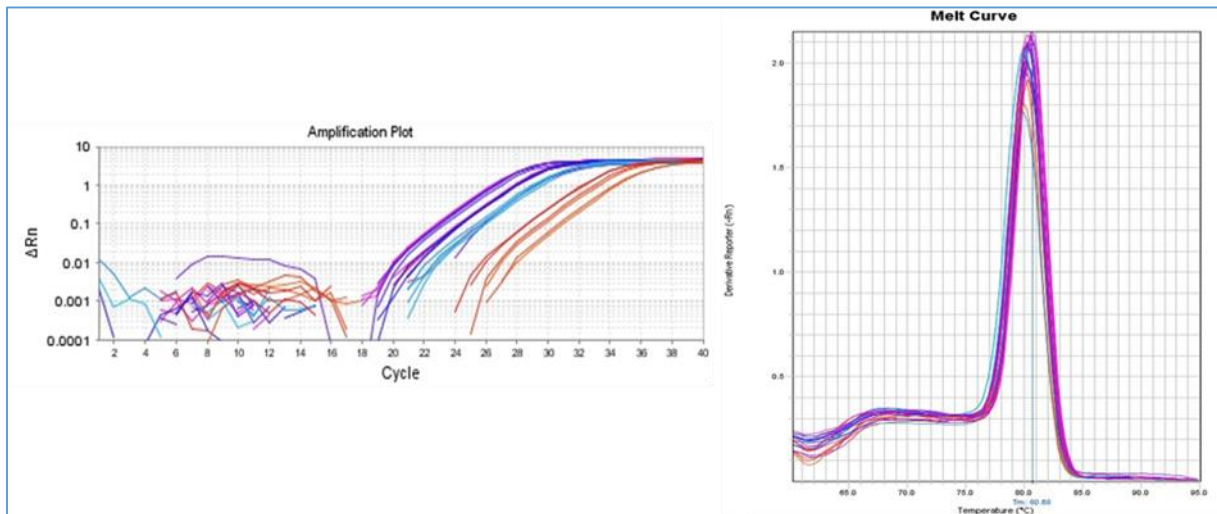
**Figura 14. Curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento GA21.** Curvas de amplificación (representación logarítmica) (izquierda). Curvas de disociación obtenidas con los cebadores GA21 F/R (derecha). Se observa un pico único de  $T_m$ , característico de la secuencia diana buscada ( $T_m$  (°C) =  $86 \pm 1$ ).



**Figura 15. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento TC1507.** Curvas de amplificación (representación logarítmica) (izquierda). Curvas de disociación obtenidas con los cebadores TC1507 F/R. (derecha). Se observa un pico único de  $T_m$ , característico de la secuencia diana buscada ( $T_m$  (°C) =  $78 \pm 1$ ).



**Figura 16. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento Bt176.** Curvas de amplificación (representación logarítmica) (izquierda). Curvas de disociación obtenidas con los cebadores Bt176 F/R (derecha). Se observa amplificación únicamente para el control positivo (MRC), con una temperatura característica  $T_m$  (°C) =  $80 \pm 1$ , se observa amplificación inespecífica para la muestra alimentaria (curvas color amarillo).



**Figura 17. Ejemplo de curvas de amplificación y disociación obtenidas para las muestras de alimentos en la identificación del evento NK603.** Curvas de amplificación (representación logarítmica) (izquierda). Curvas de disociación obtenidas con los cebadores NK603 F/R (derecha). Se observa un pico único de  $T_m$  característico de la secuencia diana ( $T_m = 80 \pm 1$ ).

En la Tabla 18 se muestran los resultados de  $C_t$  y  $T_m$  para cada uno de los cebadores específicos de evento.

**Tabla 18. Ensayo de especificidad y selectividad para los cebadores utilizados en la detección de eventos específicos de maíz. Se encuentran los valores obtenidos en el ciclo umbral ( $C_t$ ) y las temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) para los MRC, líneas transgénicas Bt176, NK603, TC1507, GA21, Bt11 y MON810.**

Material de Referencia		Juego de cebadores F/R											
Línea	%GM (m/m) (100ng ADN)	BT176 $T_m = 80 \pm 1^\circ\text{C}$		NK603 $T_m = 80 \pm 1^\circ\text{C}$		TC1507 $T_m = 78 \pm 1^\circ\text{C}$		GA21 $T_m = 86 \pm 1^\circ\text{C}$		BT11 $T_m = 72 \pm 1^\circ\text{C}$		MON810 $T_m = 79 \pm 1^\circ\text{C}$	
		$C_t$	$T_m$	$C_t$	$T_m$	$C_t$	$T_m$	$C_t$	$T_m$	$C_t$	$T_m$	$C_t$	$T_m$
BT176	5%	25.4	80.2	-	62.0	-	64.4	-	62.9	-	62.5	-	66.2
NK603	5%	-	65.5	28.9	79.9	-	62.5	-	63.4	-	62.5	-	67.9
TC1507	10%	-	61.4	-	63.3	27.1	77.4	-	63.2	-	63.5	-	66.5
GA21	5%	-	63.1	-	64.2	-	62.8	27.9	86.1	-	62.7	-	66.5
BT11	5%	-	64.3	-	63.3	-	61.9	-	62.8	28.7	71.15	-	66.6
MON810	10%	-	61.6	-	62.5	-	62.5	-	61.8	-	62.4	31.8	78.11
BT176	0%	-	61.2	-	64.2	-	62.7	-	62.2	-	62.3	-	65.8
NK603	0%	-	62.2	-	64.3	-	63.0	-	63.1	-	63.2	-	65.6
TC1507	0%	-	63.3	-	63.2	-	63.0	-	63.3	-	63.3	-	66.3
GA21	0%	-	63.2	-	62.7	-	62.6	-	63.1	-	62.3	-	66.3
BT11	0%	-	63.3	-	63.3	-	63.6	-	62.7	-	63.2	-	66.5
MON810	0%	-	62.8	-	63.0	-	63.3	-	62.3	-	63.2	-	66.3

Al analizar la gráfica generada en la amplificación por PCR Tiempo Real, se observó que para cada línea transgénica se obtuvo un pico único correspondiente a la  $T_m$ , característica de la secuencia amplificada y correspondiente al evento específico (valores sombreados, Tabla 16). Claramente se observó que los cebadores son específicos para cada evento transgénico.

Los valores de  $T_m$  que se observan para los MRC transgénicos (que no coinciden con el par de cebadores) así como los valores de  $T_m$  de los MRC no transgénicos, pueden estar indicando la formación de dímeros de cebadores, o una señal de fluorescencia base. Al realizar un análisis de las intensidades de fluorescencia de las  $T_m$  inespecíficas, estas no resultaron significativas al ser comparadas con las intensidades de fluorescencia de los picos de  $T_m$  característicos de cada evento.

#### **6.4 Escrutinio de OGMs en alimentos elaborados con maíz.**

Se analizó un total de 156 diferentes alimentos derivados de maíz. Las muestras se agruparon en cinco categorías: tortillas, botanas de maíz, tostadas, harina de maíz y cereales (p.ej. hojuelas de maíz para desayuno).

Utilizando el protocolo descrito por Doyle & Doyle (Doyle J. J., 1987), se extrajo el ADN de cada muestra, se cuantificó y se confirmó la ausencia de inhibidores de la PCR mediante la amplificación la región del gen endógeno específico de la especie de maíz *hmga* por PCR de punto final.

Las muestras sin inhibidores fueron analizadas para la presencia de material transgénico. El escrutinio de OGM se realizó utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real utilizando SYBR® Green para determinar la presencia de CaMV 35S y T-NOS, presentes en el 97% de los eventos transgénicos permitidos en México y en más del 80% de los eventos permitidos a nivel mundial (CERA, 2015; ISAAA, 2015b). Los resultados obtenidos del escrutinio se resumen en la Tabla 19.

Se consideraron negativas a la presencia de OGMs aquellas muestras en las que no hubo amplificación o cuando la reacción ocurre a partir de un valor de  $Ct > 36.5$  en el análisis por PCR en Tiempo Real, mientras que las muestras con valores  $Ct < 36.5$ , se

consideraron positivas; además de que se analizaron individualmente las curvas de *melting* y los valores de Tm para corroborar que fueran iguales que las de los controles positivos correspondientes a cada secuencia recombinante o evento transgénico específico buscado.

En la Tabla 19 se presenta la lista de los alimentos analizados en este estudio y los resultados obtenidos para el escrutinio de OGMs. El análisis se enfocó principalmente a alimentos ampliamente disponibles en el mercado mexicano y consumidos masivamente a nivel nacional.

**Tabla 19. Resultados del monitoreo de secuencias transgénicas en alimentos de maíz por el método de escrutinio en PCR Tiempo Real. Resultado negativo (-), corresponde a la ausencia de la secuencia buscada, al no haber obtenido señal de amplificación o la misma tuvo valores de Ct > 36,5; Resultado positivo (+), corresponde a la presencia de la secuencia buscada, definida para valores de Ct < 36,5 (límite de detección de la técnica). Los números romanos indican que las muestras son diferentes, y fueron colectadas en sitios distintos.**

Muestra				Escrutinio OGM	
N°	Categoría	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS
1	Tortilla	Tortilla de tortillería I	Ciudad de México	+	+
2	Tortilla	Tortilla de tortillería II	Ciudad de México	-	-
3	Tortilla	Tortilla de tortillería III	Ciudad de México	-	-
4	Tortilla	Tortilla de tortillería IV	Estado de México	+	+
5	Tortilla	Tortilla de restaurante I	Ciudad de México	-	-
6	Tortilla	Tortilla de tortillería V	Colima	+	+
7	Tortilla	Tortilla azul de tienda I	Ciudad de México	+	+
8	Tortilla	Tortilla azul de restaurante II	Ciudad de México	+	+
9	Tortilla	Tortilla artesanal I	Oaxaca	+	+
10	Tortilla	Tortilla de restaurante III	Oaxaca	-	+
11	Tortilla	Tortilla de restaurante IV	Oaxaca	+	+
12	Tortilla	Tortilla de restaurante V	Oaxaca	-	+
13	Tortilla	Tortilla azul de restaurante VI	Oaxaca	+	+
14	Tortilla	Tortilla azul de restaurante VII	Oaxaca	+	+
15	Tortilla	Tortilla de tortillería VI	Oaxaca	+	+
16	Tortilla	Tortilla de restaurante VIII	Ciudad de México	+	+
17	Tortilla	Tortilla de restaurante IX	Chiapas	-	+
18	Tortilla	Tortilla maíz amarillo	Chiapas	-	-
19	Tortilla	Tortilla artesanal II	Ciudad de México	-	+
20	Tortilla	Tortilla artesanal maíz criollo III	Oaxaca	-	+
21	Tortilla	Tortilla de restaurante X	San Luis Potosí	+	+
22	Tortilla	Tortilla de tortillería VII	Tlaxcala	-	-
23	Tortilla	Tortilla orgánica industrial	Nuevo León	-	+
24	Tortilla	Tortilla gourmet industrial	Ciudad de México	-	-
25	Tortilla	Tortilla industrial	Ciudad de México	+	+
26	Tortilla	Tortilla gourmet industrial II	Morelos	-	-
27	Tortilla	Tortilla de tortillería VIII	Estado de México	+	+
28	Tortilla	Tortilla de tortillería IX	Estado de México	-	-
29	Tortilla	Tortilla de tortillería X	Estado de México	+	+
30	Tortilla	Tortilla de tortillería XI	Estado de México	+	+

N°	Categoría	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS
31	Tortilla	Tortilla de tortillería XII	Estado de México	+	+
32	Tortilla	Tortilla de tortillería XIII	Estado de México	-	-
33	Tortilla	Tortilla de tortillería XIV	Estado de México	+	+
34	Tortilla	Tortilla de tortillería XV	Estado de México	+	+
35	Tortilla	Tortilla de tortillería XVI	Estado de México	+	+
36	Botana	Churritos chile y limón industriales I	Ciudad de México	+	+
37	Botana	Churritos chile y limón industriales II	Ciudad de México	+	+
38	Botana	Palomitas industriales I	Ciudad de México	-	+
39	Botana	Palomitas con mantequilla industriales	Ciudad de México	+	+
40	Botana	Tejitas de maíz industriales	Quintana Roo	+	+
41	Botana	Gordita artesanal	Colima	+	+
42	Botana	Frituras de maíz industriales	Ciudad de México	+	+
43	Botana	Churritos chile y limón industriales III	Ciudad de México	+	+
44	Botana	Galletas de maíz artesanales	Ciudad de México	+	+
45	Botana	Totopos artesanales	Oaxaca	-	-
46	Botana	Pasta de maíz industrial	Italia	-	+
47	Botana	Frituras chile-limón industriales	Ciudad de México	-	-
48	Botana	Empanizador de maíz industrial	Ciudad de México	-	-
49	Botana	Tortilla-chips industriales	Ciudad de México	+	+
50	Botana	Palomitas de puesto ambulante	Ciudad de México	-	-
51	Botana	Palomitas industriales II	Ciudad de México	+	+
52	Botana	Churritos de maíz industriales I	Ciudad de México	+	+
53	Botana	Nachos industriales I	Ciudad de México	-	-
54	Botana	Frituras industriales sabor pizza	Ciudad de México	+	+
55	Botana	Frituras industriales con chile	Ciudad de México	-	-
56	Botana	Totopos gourmet industriales I	Estados Unidos	+	+
57	Botana	Palomitas industriales III	Estados Unidos	-	+
58	Botana	Botana de maíz industrial I	Ciudad de México	+	+
59	Botana	Totopos industriales I	Ciudad de México	-	-
60	Botana	Nachos con chile industriales	Ciudad de México	+	+
61	Botana	Tostada de maíz industrial	España	-	-
62	Botana	Churritos de maíz industriales II	Ciudad de México	-	-
63	Botana	Palomitas industriales IV	Estados Unidos	+	+
64	Botana	Galletas industriales	Estados Unidos	-	+
65	Botana	Palomitas industriales V	Estados Unidos	-	+
66	Botana	Totopos gourmet industriales II	Estados Unidos	+	+



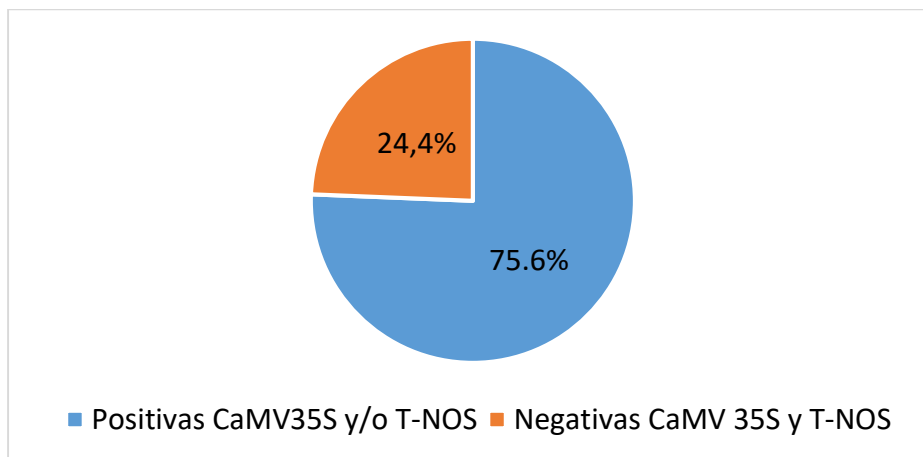
N°	Categoría	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS
67	Botana	Totopos gourmet industriales III	Estados Unidos	-	-
68	Botana	Totopos industriales II	Estados Unidos	+	+
69	Botana	Totopos orgánicos industriales	Estados Unidos	+	+
70	Botana	Palomitas industriales VI	Estados Unidos	-	-
71	Botana	Frituras sabor queso industriales I	Ciudad de México	+	+
72	Botana	Frituras con chile industriales I	Ciudad de México	+	+
73	Botana	Frituras sabor queso industriales II	Ciudad de México	+	+
74	Botana	Frituras chile y limón industriales	Ciudad de México	+	+
75	Botana	Frituras con chile industriales II	Ciudad de México	-	+
76	Botana	Nachos industriales II	Ciudad de México	-	-
77	Botana	Palomitas industriales VII	Ciudad de México	-	+
78	Botana	Churritos de maíz industriales III	Ciudad de México	+	+
79	Botana	Botana de maíz industrial II	Tlaxcala	+	+
80	Botana	Totopos salados industriales	Ciudad de México	+	+
81	Botana	Totopos industriales III	Ciudad de México	-	-
82	Harina	Harina de maíz industrial I	Ciudad de México	+	+
83	Harina	Harina de maíz industrial II	Ciudad de México	+	+
84	Harina	Harina de tortillería I	Chiapas	+	+
85	Harina	Harina de tortillería II	Chiapas	+	+
86	Harina	Harina de tortillería III	Chiapas	+	+
87	Harina	Harina de tortillería IV	Chiapas	+	+
88	Harina	Harina de tortillería V	Chiapas	+	+
89	Harina	Harina de maíz azul de tortillería	Chiapas	+	+
90	Harina	Harina de tortillería VI	Chiapas	+	+
91	Harina	Harina de tortillería VII	Chiapas	+	+
92	Harina	Harina de tortillería VIII	Chiapas	+	+
93	Harina	Harina de tortillería IX	Michoacán	+	+
94	Harina	Harina de tortillería X	Chiapas	-	+
95	Harina	Harina de maíz amarillo tortillería	Chiapas	+	+
96	Harina	Harina de tortillería XI	Chiapas	+	+
97	Harina	Harina de tortillería XII	Chiapas	+	+
98	Harina	Atole artesanal rojo en polvo	Ciudad de México	-	-
99	Harina	Atole artesanal azul en polvo	Ciudad de México	-	-
100	Harina	Harina de tortillería XIII	Estado de México	+	+
101	Harina	Harina de tortillería XIV	Estado de México	+	+
102	Harina	Harina de tortillería XV	Estado de México	+	+
103	Harina	Harina de tortillería XVI	Estado de México	+	+

N°	Categoría	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS
104	Harina	Harina de tortillería XVII	Estado de México	+	+
105	Harina	Harina maíz amarillo industrial	Colombia	+	+
106	Harina	Harina maíz dulce amarillo industrial	Colombia	+	+
107	Harina	Harina de maíz industrial III	Ciudad de México	+	+
108	Harina	Harina de maíz industrial IV	Ciudad de México	+	+
109	Harina	Pinole de maíz tostado	Sinaloa	-	-
110	Harina	Pinole de maíz	Ciudad de México	-	-
111	Harina	Harina de maíz de restaurante	Jalisco	-	-
112	Tostada	Tostadas horneadas maíz azul industriales	Ciudad de México	+	+
113	Tostada	Tostadas c/ sal de mar industriales	Ciudad de México	+	+
114	Tostada	Tostadas planas industriales I	Ciudad de México	+	+
115	Tostada	Tostadas maíz con nopal industriales	Ciudad de México	+	+
116	Tostada	Tostadas industriales I	Ciudad de México	+	+
117	Tostada	Tostadas industriales II	Ciudad de México	-	+
118	Tostada	Tostadas industriales III	Ciudad de México	-	+
119	Tostada	Tostada horneada artesanal	Colima	+	+
120	Tostada	Tostada artesanal	Colima	+	+
121	Tostada	Tostada casera artesanal	Colima	+	+
122	Tostada	Tostadas industriales IV	Colima	+	+
123	Tostada	Tostadas horneadas industriales	Ciudad de México	+	+
124	Tostada	Tostadas industriales V	Ciudad de México	+	+
125	Tostada	Tostadas industriales VI	Ciudad de México	+	+
126	Tostada	Tostada de restaurante I	Ciudad de México	-	-
127	Tostada	Tostadas planas industriales II	Ciudad de México	+	+
128	Tostada	Tostada estilo pozolera industrial	Ciudad de México	-	+
129	Tostada	Tostadas industriales VII	Ciudad de México	-	-
130	Tostada	Tostadas industriales VIII	Ciudad de México	+	-
131	Tostada	Tostada de maíz nativo amarillo artesanal	Colima	+	-
132	Tostada	Tostadas industriales IX	Estado de México	-	+
133	Tostada	Tostada botanera industrial	Ciudad de México	+	+
134	Tostada	Tostada de restaurante II	Morelos	-	-
135	Tostada	Tostadas cevicheras industriales	Jalisco	-	-
136	Tostada	Tostadas industriales X	Hidalgo	+	+
137	Tostada	Tostadas industriales XI	Morelos	+	+
138	Tostada	Tostadas industriales XII	Estado de México	+	+
139	Tostada	Tostadas industriales XIII	Sinaloa	-	-

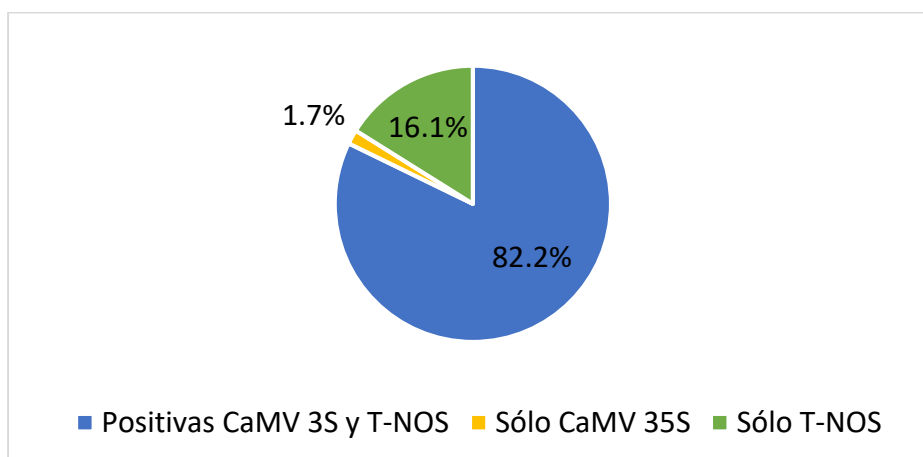
N°	Categoría	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS
140	Tostada	Tostadas chilapitas industriales	Ciudad de México	+	+
141	Tostada	Tostadas industriales XIV	Jalisco	-	+
142	Cereal	Cereal bajo en calorías industrial	Ciudad de México	+	+
143	Cereal	Cereal para niños industrial I	Ciudad de México	-	+
144	Cereal	Cereal sabor miel industrial	Ciudad de México	+	+
145	Cereal	Cereal para niños industrial II	Ciudad de México	+	+
146	Cereal	Cereal industrial I	Ciudad de México	+	+
147	Cereal	Cereal con chocolate industrial	Ciudad de México	-	-
148	Cereal	Cereal para niños industrial III	Ciudad de México	+	+
149	Cereal	Cereal industrial II	Ciudad de México	-	-
150	Cereal	Cereal para niños industrial IV	Ciudad de México	-	-
151	Cereal	Cereal para niños industrial V	Ciudad de México	+	+
152	Cereal	Cereal para niños industrial VI	Ciudad de México	-	-
153	Cereal	Cereal industrial III	Ciudad de México	-	-
154	Cereal	Cereal industrial IV	Ciudad de México	-	-
155	Cereal	Cereal industrial V	Ciudad de México	+	+
156	Cereal	Cereal industrial VI	Ciudad de México	+	+

En la Tabla 19 se observa que a partir del escrutinio de OGMs por PCR en Tiempo Real, un total de 118 de las 156 muestras analizadas, presentaron alguno de los dos elementos transgénicos (CaMV 35S y/o T-NOS), que representa el 75.6% del total de las muestras analizadas, del total de muestras analizadas, el 24.4% (n=38) resultaron negativas para la presencia de ambas secuencias transgénicas monitoreadas en este estudio (Figura 18).

De las 118 muestras positivas, el 82.2% (n=97) contienen tanto al promotor CaMV 35S como al terminador T-NOS; el 16.1% (n=19) de las muestras sólo contienen el marcador T-NOS y únicamente el 1.7% (n=2) de las muestras contenían sólo la secuencia del promotor CaMV 35S (Figura 19).

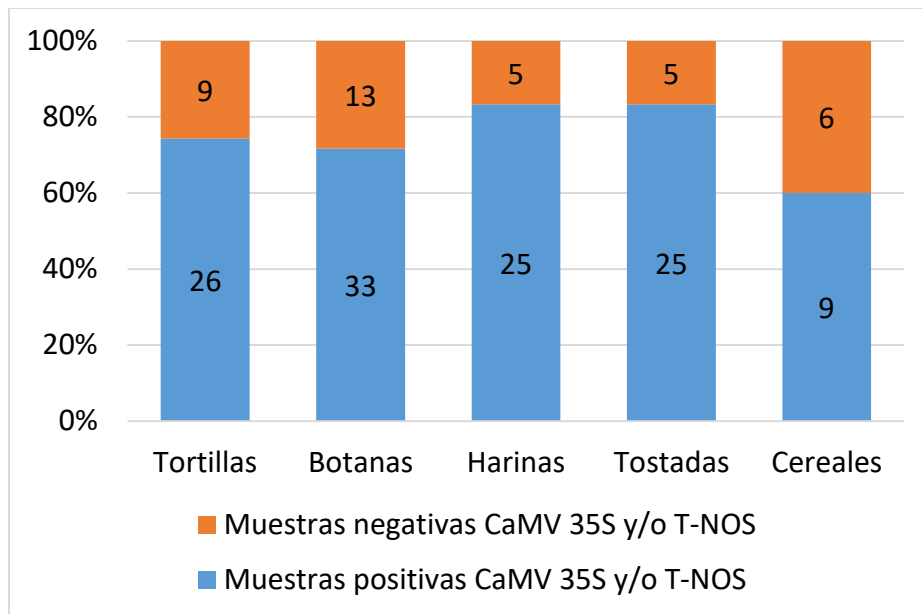


**Figura 18. Resultados del escrutinio de OGMs (búsqueda y detección del promotor CaMV 35S y el terminador T-NOS) en alimentos de maíz (n=156).**



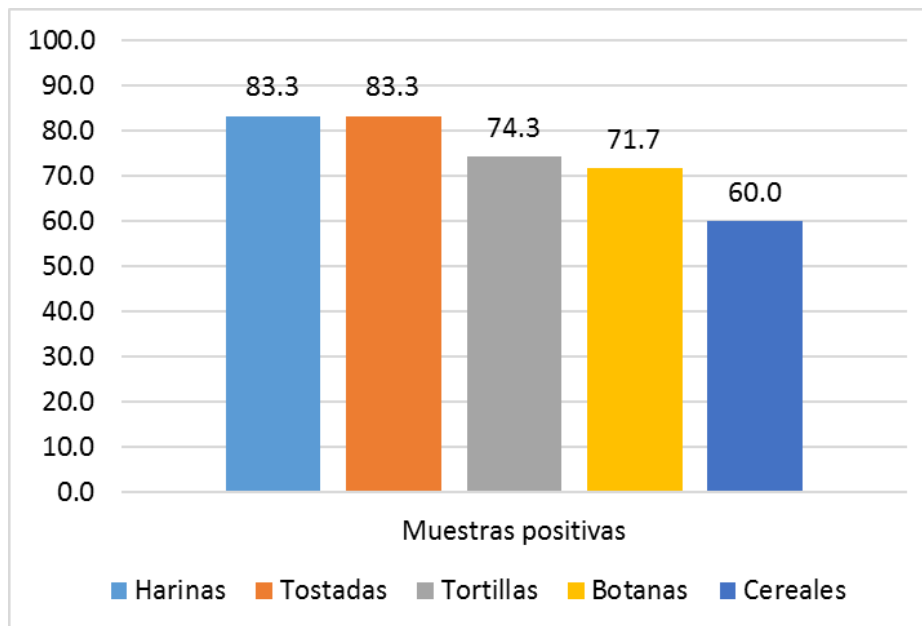
**Figura 19. Resultados de la presencia de las secuencias CaMV 35S y T-NOS en las muestras positivas al escrutinio de OGMs. (n=118)**

En la Figura 20, se resumen los resultados del escrutinio de OGMs en las muestras alimentarias por categoría de alimento.



**Figura 20. Resultados de escrutinio de OGMs por categoría de alimento. Sobre las barras en color azul y anaranjado se muestra el número de muestras positivas y negativas, respectivamente, para la presencia del promotor CaMV 35S y/o T-NOS en cada categoría de alimento.**

Las muestras analizadas, por tratarse en su mayoría de alimentos industrializados, corresponden a productos ampliamente disponibles en puntos de venta presentes en todo el territorio nacional, por lo tanto, aunque las muestras hayan sido colectadas principalmente en la Ciudad de México, los resultados podrían extrapolarse a todo el país. De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis realizado a partir de muestras disponibles en el mercado mexicano de alimentos elaborados con maíz, teóricamente por cada 100 tortillas de maíz, existirían 74 que contengan secuencias transgénicas, por cada 100 botanas de maíz existirían alrededor de 72 productos elaborados con maíz transgénico, por cada 100 muestras de harina se encontrarían 83 que contengan secuencias transgénicas, por cada 100 tostadas existirían 83 productos elaborados con maíz GM y 60 de cada 100 cereales para desayuno contendrían maíz transgénico (Figura 21).



**Figura 21. Porcentaje (%) de muestras positivas para las secuencias transgénicas (CaMV 35S y/o T-NOS) en los diferentes tipos de alimentos elaborados con maíz.**

Al realizarse la prueba estadística de *chi* cuadrada con un valor de significancia del 95% para evaluar si existía diferencia entre la incidencia de secuencias transgénicas de maíz de acuerdo al tipo de alimento, se obtuvo un valor estadístico de *chi* cuadrada de 4.333, con un valor p de 0.363, por lo que el resultado no es significativo, es decir, que el tipo de producto alimentario no influye sobre la presencia de secuencias transgénicas de forma general en los alimentos elaborados con maíz.

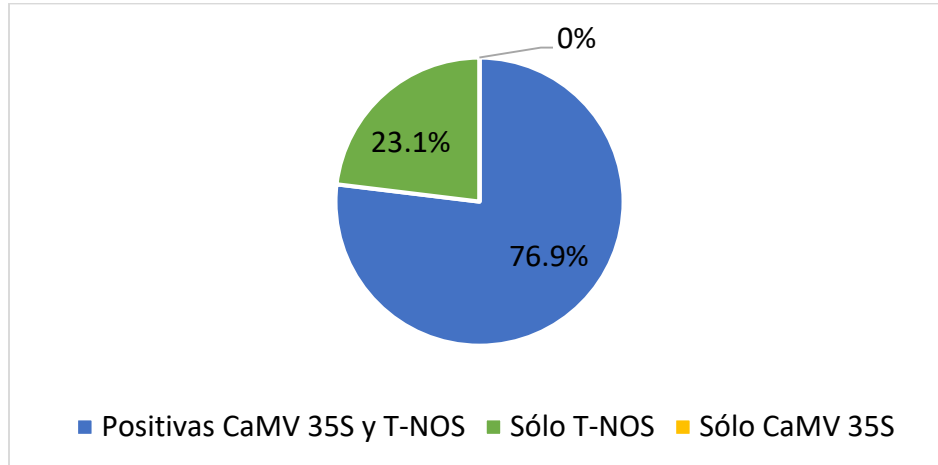
Sin embargo, con base en los resultados obtenidos, se puede observar que las muestras en las que se encuentra maíz GM con mayor frecuencia son las harinas y las tostadas (Figura 21).

A continuación, se muestra un análisis del escrutinio de OGMs por categoría de alimento.

#### **6.4.1 Resultados del escrutinio de OGMs en muestras de tortillas.**

El 74.3 % (n=26) de las muestras de tortillas resultaron positivas para alguno de los marcadores transgénicos (CaMV 35S y T-NOS) monitoreados en el escrutinio de OGMs en las tortillas de maíz y el 25.7% (n=9) resultaron negativas a la presencia de dichos marcadores transgénicos.

En la Figura 22 se observa el porcentaje en el que se detectó la presencia de dichos marcadores, para este tipo de alimento de las 26 muestras positivas, el 76.9% (n=20) contenían tanto al promotor CaMV 35S como al T-NOS, mientras que 23.1% (n=6) contenían únicamente al T-NOS.

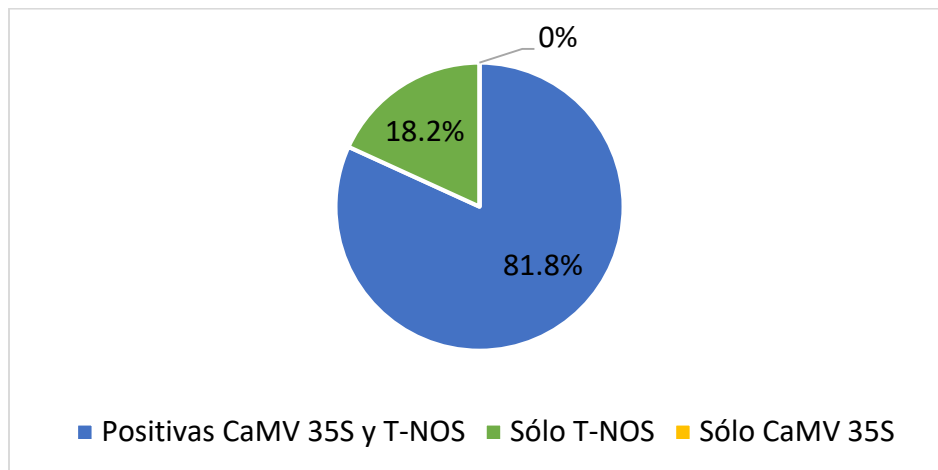


**Figura 22. Resultados de la presencia de las secuencias CaMV 35S y T-NOS en las muestras de tortillas positivas al escrutinio de OGMs (n=26).**

#### **6.4.2 Resultados del escrutinio de OGMs en muestras de botanas de maíz.**

El 71.7% (n=33) de muestras de botanas de maíz resultaron positivas para al menos uno de los dos marcadores transgénicos, el 28.3% (n=13) resultaron negativas para ambas secuencias transgénicas

En la Figura 23 se observa que, de las 33 muestras transgénicas positivas, el 81.8% (n=27) contenía ambos marcadores transgénicos (CaMV 35S y T-NOS), mientras el 18.2% (n=6) contenía únicamente el T-NOS.

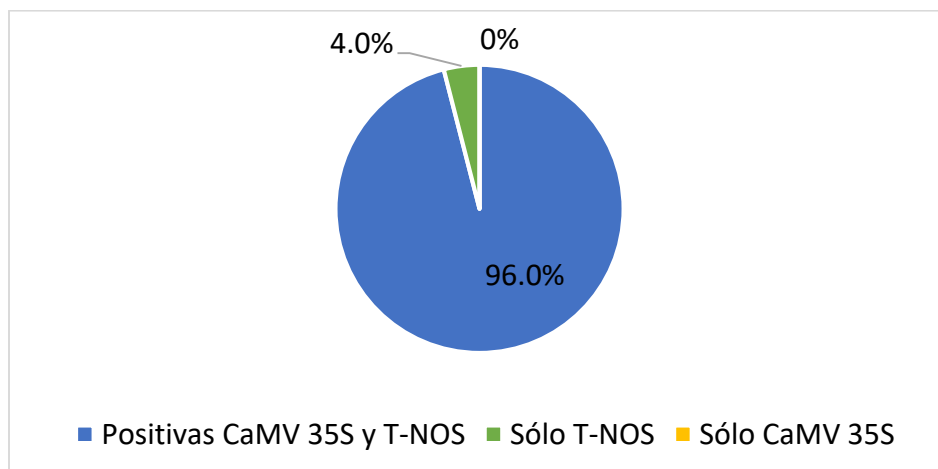


**Figura 23. Resultados de la presencia de las secuencias CaMV 35S y T-NOS en las muestras de botanas positivas al escrutinio de OGMs. (n=33).**

#### 6.4.3 Resultados del escrutinio de OGMs en muestras de harinas de maíz.

El 83.3% (n=25) de las muestras de harinas de maíz analizadas (n=30) resultaron positivas al escrutinio de OGMs, el 16.7% (n=5) de las muestras resultaron negativas para la presencia de los marcadores transgénicos CaMV 35S y T-NOS.

En la Figura 24 se observa que del total de las 25 muestras positivas para la presencia de transgenes, 4% (n=1) presentó únicamente el T-NOS, y el 96% (n=24) presentaron ambos marcadores transgénicos (CaMV 35S y T-NOS).



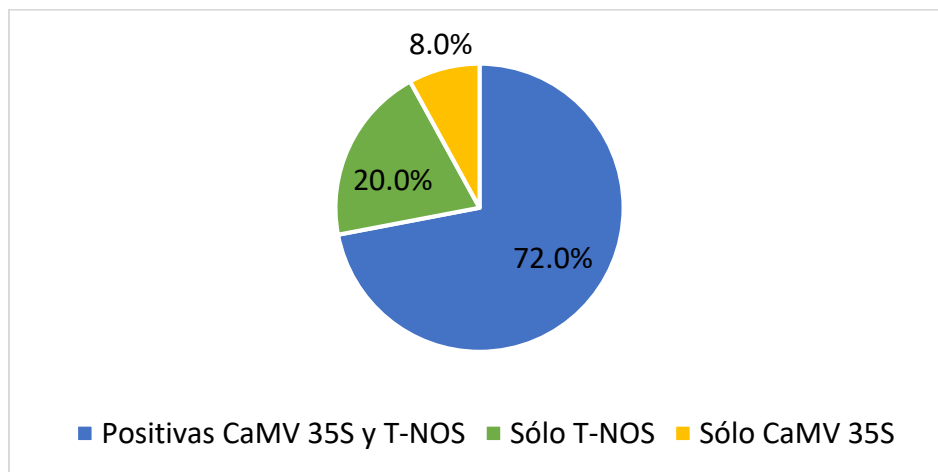
**Figura 24. Resultados de la presencia de las secuencias CaMV 35S y T-NOS en las muestras de harinas positivas al escrutinio de OGMs (n=25).**



#### 6.4.4 Resultados del escrutinio de OGMs en muestras de tostadas de maíz.

El 83% (n=25) de las muestras de tostadas analizadas (n=30) fueron positivas para el escrutinio de OGMs y el 16.7% (n=5) resultaron negativas para ambos marcadores transgénicos.

En la Figura 25 se observa que, de las 25 muestras positivas a la presencia de transgenes, el 72% (n=18) contenían las dos secuencias monitoreadas en el escrutinio, 20% (n=5) sólo contenían el T-NOS y el 8% (n=2) únicamente al promotor CaMV 35S.

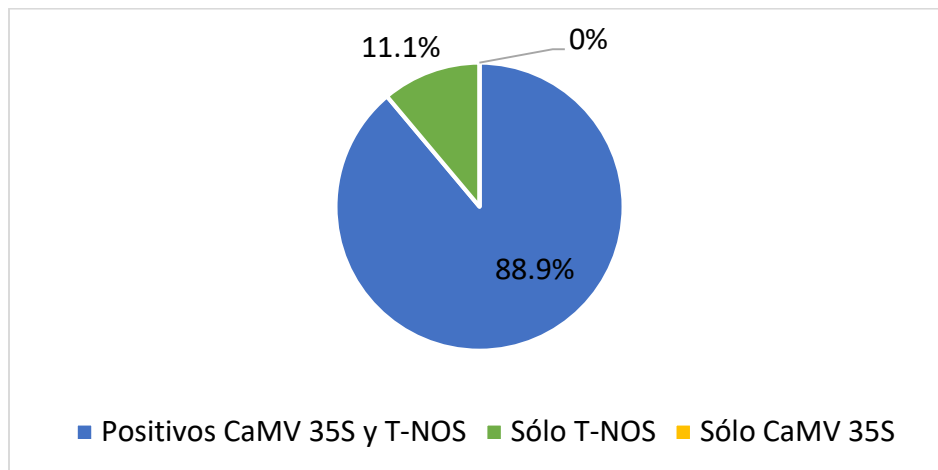


**Figura 25. Resultados de la presencia de las secuencias CaMV 35S y T-NOS en las muestras de tostadas positivas al escrutinio de OGM. (n=25).**

#### 6.4.5 Resultados del escrutinio de OGMs en muestras de cereales.

El 60% (n=9) de las muestras de cereales de maíz analizadas (n=15) resultaron positivas al escrutinio de OGMs y el 40% (n=6) resultaron negativas.

En la Figura 26 se observa que del total de muestras positivas para la presencia de transgenes (n=9), el 11.1% (n=1) presentó únicamente el T-NOS, y el 88.9% (n=8) presentaron ambos marcadores transgénicos (CaMV 35S y T-NOS).



**Figura 26. Resultados de la presencia de las secuencias CaMV 35S y T-NOS en las muestras de cereales positivos al escrutinio de OGMs (n=9).**

### 6.5 Identificación de eventos transgénicos específicos en alimentos de maíz.

En México se han aprobado 68 eventos transgénicos de maíz para alimentación humana y animal. De dichos eventos, 48 de ellos contienen las dos secuencias recombinantes monitoreadas en el escrutinio de OGMs (CaMV 35S y T-NOS), 12 contienen únicamente el promotor CaMV 35S, solamente seis el terminador T-NOS, y sólo dos de los eventos no las contienen (ISAAA, 2015a).

Por lo tanto, monitoreando la presencia del promotor CaMV 35S y el terminador T-NOS en las muestras, se puede abarcar un total de 66 eventos transgénicos aprobados para alimentación humana en nuestro país. Los dos eventos aprobados que no contienen ninguna de estas dos secuencias transgénicas son el evento DAS40278 (tolerancia al herbicida 2,4-D) y el LY038 (modificado para incrementar la producción del aminoácido lisina), por lo que quedarían fuera del alcance de este estudio.

Para poder conocer los eventos específicos presentes en cada matriz alimentaria y por lo tanto los rasgos de resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas, se monitoreó la presencia de seis de los eventos transgénicos específicos de maíz más comunes y más comercializados a nivel mundial: Bt176, Bt11, NK603, MON810, TC1507 y GA21. El evento Bt176 se incluyó en el estudio considerando los estudios relativos a su toxicidad (Glöckner & Séralini, 2016), a pesar de que este evento no se encuentra aprobado para consumo humano en México, se consideró relevante evaluar su presencia en las muestras alimentarias.

En el Anexo III se incluye la lista de los eventos transgénicos aprobados en México para consumo humano, se puede observar que existen eventos transgénicos individuales y una gran mayoría se encuentran como eventos transgénicos apilados.

De los 66 eventos transgénicos que pueden detectarse mediante el escrutinio de OGMs, 49 contienen al menos uno de los siguientes cinco eventos transgénicos monitoreados: Bt11, NK603, MON810, TC1507 y GA21, es decir, se encuentran de forma individual o como eventos apilados.

Los 17 eventos transgénicos restantes, únicamente pueden detectarse mediante el escrutinio de OGMs, pero al no haber sido monitoreados específicamente en este estudio, no se podría identificar qué rasgo transgénico contenía el maíz con el que fue elaborada la muestra alimentaria.

En la Tabla 20 se presentan las características de cada evento transgénico monitoreado en este estudio, como se puede observar, los eventos NK603 y Bt11 contienen tanto al promotor CaMV 35S como al T-NOS, los eventos Bt176, MON810 y TC1507 únicamente contienen la secuencia promotora CaMV 35S y el evento GA21 sólo contiene la secuencia terminadora T-NOS.

**Tabla 20. Características de los eventos transgénicos específicos analizados.**

Evento transgénico	Rasgo(s)	Uso sugerido	Genes Insertados	Promotor CaMV 35S	Terminador T-NOS	Autorización en México*
<b>Bt11</b>	Resistencia a insectos lepidópteros Tolerancia a Glufosinato de amonio	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	cry1Ab pat	Si	Si	2007
<b>Bt176</b>	Resistencia a insectos lepidópteros Tolerancia a Glifosato	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	cry1Ab CP4 epsps	Si	No	No hay aprobación
<b>TC1507</b>	Resistencia a insectos lepidópteros Tolerancia a Glufosinato de amonio	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	Cry1Fa2 pat	Si	No	2003
<b>GA21</b>	Tolerancia a Glifosato	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	CP4 epsps	No	Si	2002
<b>MON810</b>	Resistencia a insectos lepidópteros	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	cry1Ab	Si	No	2002
<b>NK603</b>	Tolerancia a Glifosato	Consumo humano Forraje (alimento ganado)	CP4 epsps	Si	Si	2002

Se analizaron las muestras de alimentos para identificar eventos específicos de maíz mediante PCR en Tiempo Real, los resultados obtenidos para los eventos Bt176, NK603, TC1507, GA21, Bt11 y MON810 se resumen en la Tabla 21.

**Tabla 21. Resultados del monitoreo de secuencias transgénicas en alimentos de maíz. (-) Resultado negativo, corresponde a la ausencia de la secuencia recombinante o evento transgénico correspondiente; (+) Resultado positivo (en rojo), para la secuencia recombinante o el evento transgénico correspondiente.**

Muestra			Escrutinio OGM		Evento específico					
N°	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS	Bt176	NK603	TC1507	GA21	Bt11	MON810
1	Tortilla de tortillería I	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
2	Tortilla de tortillería II	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Tortilla de tortillería III	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Tortilla de tortillería IV	Estado de México	+	+	-	+	+	-	-	-
5	Tortilla de restaurante I	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Tortilla de tortillería V	Colima	+	+	-	-	-	-	-	-
7	Tortilla azul de tienda I	Ciudad de México	+	+	-	-	-	-	-	-
8	Tortilla azul de restaurante II	Ciudad de México	+	+	-	+	-	-	-	-
9	Tortilla artesanal I	Oaxaca	+	+	-	-	-	-	-	-
10	Tortilla de restaurante III	Oaxaca	-	+	-	-	+	-	-	-
11	Tortilla de restaurante IV	Oaxaca	+	+	-	-	-	-	-	-
12	Tortilla de restaurante V	Oaxaca	-	+	-	-	-	-	-	-
13	Tortilla azul de restaurante VI	Oaxaca	+	+	-	-	-	-	-	-
14	Tortilla azul de restaurante VII	Oaxaca	+	+	-	-	-	-	-	-
15	Tortilla de tortillería VI	Oaxaca	+	+	-	+	+	-	-	+
16	Tortilla de restaurante VIII	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	+
17	Tortilla de restaurante IX	Chiapas	-	+	-	-	-	-	-	-
18	Tortilla maíz amarillo	Chiapas	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Tortilla artesanal II	Ciudad de México	-	+	-	-	-	-	-	-
20	Tortilla artesanal maíz criollo III	Oaxaca	-	+	-	-	-	-	-	-
21	Tortilla de restaurante X	San Luis Potosí	+	+	-	-	-	-	-	-

N°	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS	Bt176	NK603	TC1507	GA21	Bt11	MON810
22	Tortilla de tortillería VII	Tlaxcala	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Tortilla orgánica industrial	Nuevo León	-	+	-	-	-	-	-	-
24	Tortilla gourmet industrial	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Tortilla industrial	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
26	Tortilla gourmet industrial II	Morelos	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Tortilla de tortillería VIII	Estado de México	+	+	-	+	+	-	-	+
28	Tortilla de tortillería IX	Estado de México	-	-	-	-	-	-	-	-
29	Tortilla de tortillería X	Estado de México	+	+	-	-	-	-	-	-
30	Tortilla de tortillería XI	Estado de México	+	+	-	+	+	-	-	+
31	Tortilla de tortillería XII	Estado de México	+	+	-	-	-	-	-	-
32	Tortilla de tortillería XIII	Estado de México	-	-	-	-	-	-	-	-
33	Tortilla de tortillería XIV	Estado de México	+	+	-	-	-	-	-	-
34	Tortilla de tortillería XV	Estado de México	+	+	-	-	-	-	-	-
35	Tortilla de tortillería XVI	Estado de México	+	+	-	+	+	-	-	-
36	Churritos chile y limón industriales I	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
37	Churritos chile y limón industriales II	Ciudad de México	+	+	-	-	+	-	-	-
38	Palomitas industriales I	Ciudad de México	-	+	-	+	-	-	-	-
39	Palomitas con mantequilla industriales	Ciudad de México	+	+	-	-	-	-	-	+
40	Tejitas de maíz industriales	Quintana Roo	+	+	-	+	-	-	-	-
41	Gordita artesanal	Colima	+	+	-	+	-	-	-	-
42	Frituras de maíz industriales	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	+
43	Churritos chile y limón industriales III	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	+

N°	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS	Bt176	NK603	TC1507	GA21	Bt11	MON810
44	Galletas de maíz artesanales	Ciudad de México	+	+	-	+	-	-	-	-
45	Totopos artesanales	Oaxaca	-	-	-	-	-	-	-	-
46	Pasta de maíz industrial	Italia	-	+	-	-	-	-	-	-
47	Frituras chile-limón industriales	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
48	Empanizador de maíz industrial	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
49	Tortilla-chips industriales	Ciudad de México	+	+	-	-	+	+	+	+
50	Palomitas de puesto ambulante	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
51	Palomitas industriales II	Ciudad de México	+	+	-	-	-	-	-	-
52	Churritos de maíz industriales I	Ciudad de México	+	+	-	+	+	+	+	+
53	Nachos industriales I	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
54	Frituras industriales sabor pizza	Ciudad de México	+	+	-	-	-	-	-	-
55	Frituras industriales con chile	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
56	Totopos gourmet industriales I	Estados Unidos	+	+	-	+	+	-	-	+
57	Palomitas industriales III	Estados Unidos	-	+	-	+	-	-	-	-
58	Botana de maíz industrial I	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	+
59	Totopos industriales I	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
60	Nachos con chile industriales	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
61	Tostada de maíz industrial	España	-	-	-	-	-	-	-	-
62	Churritos de maíz industriales II	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
63	Palomitas industriales IV	Estados Unidos	+	+	-	-	-	-	-	-

N°	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS	Bt176	NK603	TC1507	GA21	Bt11	MON810
64	Galletas industriales	Estados Unidos	-	+	-	-	-	-	-	-
65	Palomitas industriales V	Estados Unidos	-	+	-	-	-	-	-	-
66	Totopos gourmet industriales II	Estados Unidos	+	+	-	+	+	-	-	+
67	Totopos gourmet industriales III	Estados Unidos	-	-	-	-	-	-	-	-
68	Totopos industriales II	Estados Unidos	+	+	-	+	+	-	-	-
69	Totopos orgánicos industriales	Estados Unidos	+	+	-	+	+	-	-	-
70	Palomitas industriales VI	Estados Unidos	-	-	-	-	-	-	-	-
71	Frituras sabor queso industriales I	Ciudad de México	+	+	-	-	-	-	-	-
72	Frituras con chile industriales I	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
73	Frituras sabor queso industriales II	Ciudad de México	+	+	-	+	+	+	+	+
74	Frituras chile y limón industriales	Ciudad de México	+	+	-	+	+	+	+	+
75	Frituras con chile industriales II	Ciudad de México	-	+	-	-	-	-	-	-
76	Nachos industriales II	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
77	Palomitas industriales VII	Ciudad de México	-	+	-	-	-	-	-	-
78	Churritos de maíz industriales III	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	+
79	Botana de maíz industrial II	Tlaxcala	+	+	-	+	+	-	+	-
80	Totopos salados industriales	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
81	Totopos industriales III	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
82	Harina de maíz industrial I	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	+



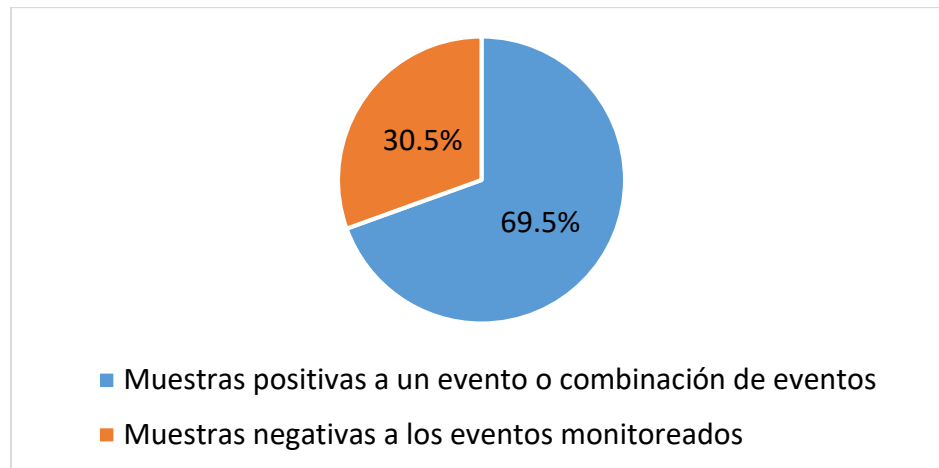
N°	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS	Bt176	NK603	TC1507	GA21	Bt11	MON810
83	Harina de maíz industrial II	Ciudad de México	+	+	-	+	-	-	-	+
84	Harina de tortillería I	Chiapas	+	+	-	+	-	-	-	+
85	Harina de tortillería II	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	+
86	Harina de tortillería III	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	+
87	Harina de tortillería IV	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	-
88	Harina de tortillería V	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	+
89	Harina de maíz azul de tortillería	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	-
90	Harina de tortillería VI	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	+
91	Harina de tortillería VII	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	-
92	Harina de tortillería VIII	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	+
93	Harina de tortillería IX	Michoacán	+	+	-	+	+	-	-	-
94	Harina de tortillería X	Chiapas	-	+	-	-	-	-	-	-
95	Harina de maíz amarillo tortillería	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	+
96	Harina de tortillería XI	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	+
97	Harina de tortillería XII	Chiapas	+	+	-	+	+	-	-	+
98	Atole artesanal rojo en polvo	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
99	Atole artesanal azul en polvo	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
100	Harina de tortillería XIII	Estado de México	+	+	-	-	-	-	-	-
101	Harina de tortillería XIV	Estado de México	+	+	-	+	-	-	-	-
102	Harina de tortillería XV	Estado de México	+	+	-	-	+	-	-	-
103	Harina de tortillería XVI	Estado de México	+	+	-	-	-	-	-	-
104	Harina de tortillería XVII	Estado de México	+	+	-	+	-	-	-	-
105	Harina maíz amarillo industrial	Colombia	+	+	-	+	+	-	+	+

N°	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS	Bt176	NK603	TC1507	GA21	Bt11	MON810
106	Harina maíz dulce amarillo industrial	Colombia	+	+	-	+	+	-	-	-
107	Harina de maíz industrial III	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	+
108	Harina de maíz industrial IV	Ciudad de México	+	+	-	-	+	-	-	-
109	Pinole de maíz tostado	Sinaloa	-	-	-	-	-	-	-	-
110	Pinole de maíz	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
111	Harina de maíz de restaurante	Jalisco	-	-	-	-	-	-	-	-
112	Tostadas horneadas maíz azul industriales	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
113	Tostadas c/ sal de mar industriales	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	+	+
114	Tostadas planas industriales I	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	+
115	Tostadas maíz con nopal industriales	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	+
116	Tostadas industriales I	Ciudad de México	+	+	-	+	-	-	-	-
117	Tostadas industriales II	Ciudad de México	-	+	-	+	-	-	-	+
118	Tostadas industriales III	Ciudad de México	-	+	-	+	-	-	-	+
119	Tostada horneada artesanal	Colima	+	+	-	+	-	-	-	+
120	Tostada artesanal	Colima	+	+	-	+	-	-	-	-
121	Tostada casera artesanal	Colima	+	+	-	+	-	-	-	-
122	Tostadas industriales IV	Colima	+	+	-	+	+	-	-	-
123	Tostadas horneadas industriales	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	+	+
124	Tostadas industriales V	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
125	Tostadas industriales VI	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
126	Tostada de restaurante I	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-

N°	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS	Bt176	NK603	TC1507	GA21	Bt11	MON810
127	Tostadas planas industriales II	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
128	Tostada estilo pozolera industrial	Ciudad de México	-	+	-	-	-	-	-	-
129	Tostadas industriales VII	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
130	Tostadas industriales VIII	Ciudad de México	+	-	-	-	-	-	-	-
131	Tostada de maíz nativo amarillo artesanal	Colima	+	-	-	-	-	-	-	-
132	Tostadas industriales IX	Estado de México	-	+	-	-	-	-	-	-
133	Tostada botanera industrial	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	-	-
134	Tostada de restaurante II	Morelos	-	-	-	-	-	-	-	-
135	Tostadas cevicheras industriales	Jalisco	-	-	-	-	-	-	-	-
136	Tostadas industriales X	Hidalgo	+	+	-	+	+	-	-	-
137	Tostadas industriales XI	Morelos	+	+	-	+	+	-	+	+
138	Tostadas industriales XII	Estado de México	+	+	-	-	-	-	-	-
139	Tostadas industriales XIII	Sinaloa	-	-	-	-	-	-	-	-
140	Tostadas chilapitas industriales	Ciudad de México	+	+	-	-	-	-	-	-
141	Tostadas industriales XIV	Jalisco	-	+	-	-	-	-	-	-
142	Cereal bajo en calorías industrial	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	+	-
143	Cereal para niños industrial I	Ciudad de México	-	+	-	+	+	-	+	+
144	Cereal sabor miel industrial	Ciudad de México	+	+	-	+	+	+	+	+
145	Cereal para niños industrial II	Ciudad de México	+	+	-	+	+	+	+	+
146	Cereal industrial I	Ciudad de México	+	+	-	-	-	-	-	-

N°	Nombre	Origen	CaMV 35S	T-NOS	Bt176	NK603	TC1507	GA21	Bt11	MON810
147	Cereal con chocolate industrial	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
148	Cereal para niños industrial III	Ciudad de México	+	+	-	+	+	+	+	-
149	Cereal industrial II	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
150	Cereal para niños industrial IV	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
151	Cereal para niños industrial V	Ciudad de México	+	+	-	+	+	+	+	+
152	Cereal para niños industrial VI	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
153	Cereal industrial III	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
154	Cereal industrial IV	Ciudad de México	-	-	-	-	-	-	-	-
155	Cereal industrial V	Ciudad de México	+	+	-	-	+	-	+	-
156	Cereal industrial VI	Ciudad de México	+	+	-	+	+	-	+	+

De las 118 muestras que resultaron positivas para la presencia de las secuencias transgénicas CaMV 35S y/o T-NOS, el 69.5% (n=82) resultó positivo para la presencia de uno o más de los seis eventos específicos monitoreados. En la mayoría de los casos se encontró más de un evento específico por muestra. Por otro lado, el 30.5% (n=36) no contenía ninguno de los eventos transgénicos monitoreados (Figura 27).



**Figura 27. Presencia de eventos transgénicos específicos en las muestras de alimentos que resultaron positivas al escrutinio de OGMs (n=118).**

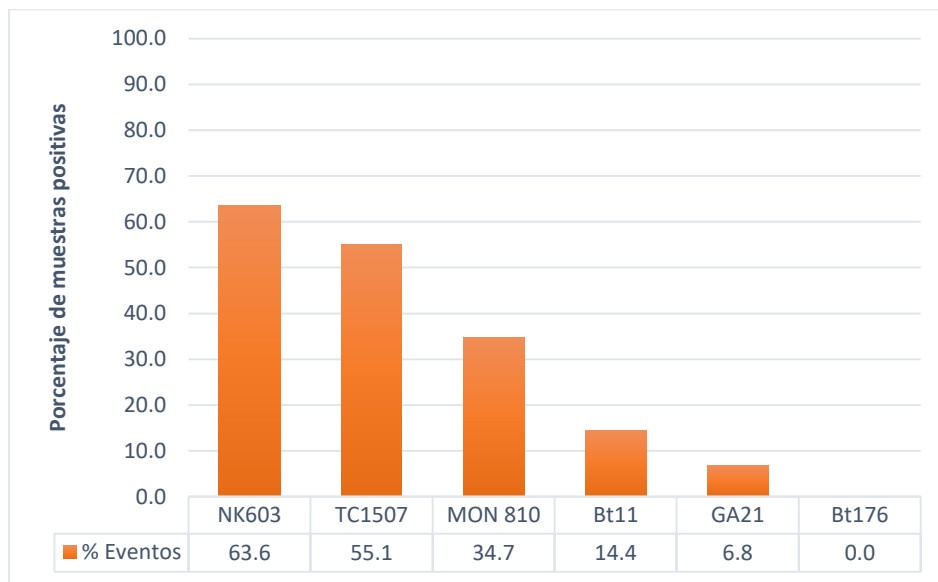
El 30.5% (n=36) de las muestras positivas para la presencia del promotor CaMV 35S y/o T-NOS, resultaron negativas para la presencia de los seis eventos transgénicos monitoreados (Tabla 21, muestras: 6,7,9,11,12,13,14,17,19,20,21,23,29,31,33,34,46,51,54,63,64,65,71,75,77,94,100,103,128,130,131,132,138,140,141 y 146).

Es posible que dichas muestras alimentarias contengan alguno de los 17 diferentes eventos transgénicos aprobados en México que no fueron monitoreados, pero que contienen los elementos recombinantes CaMV 35S y/o T-NOS (Tabla 22).

**Tabla 22. Eventos transgénicos de maíz disponibles en México no considerados en este estudio que contienen al promotor CaMV 35s y/o al T-NOS.**

<b>Eventos transgénicos que contienen sólo el promotor CaMV 35S.</b>	
<b>Nombre del evento transgénico de maíz.</b>	<b>Rasgo(s)</b>
4114	Resistencia a insectos coleópteros y lepidópteros. Tolerancia a glufosinato.
59122	Resistencia a insectos coleópteros. Tolerancia a glufosinato.
98140	Tolerancia a glifosato, sulfonilureas e imidazolinonas.
98140 x 59122	Tolerancia a glifosato, sulfonilureas e imidazolinonas. Resistencia a insectos coleópteros. Tolerancia a glufosinato.
T25	Tolerancia a glufosinato.
<b>Eventos transgénicos que contienen sólo el terminador T-NOS.</b>	
<b>Nombre del evento transgénico de maíz</b>	<b>Rasgo(s)</b>
3272	Producción de una enzima alfa-amilasa termoestable.
5307	Resistencia a insectos coleópteros y lepidópteros.
MIR162	Resistencia a insectos lepidópteros.
MIR604	Resistencia a insectos coleópteros.
<b>Eventos transgénicos que contienen CaMV 35S y T-NOS.</b>	
<b>Nombre del evento transgénico de maíz</b>	<b>Rasgo(s)</b>
MON863	Resistencia a insectos coleópteros.
MON87427	Tolerancia a glifosato.
MON87427 x MON89034 x MON88017	Tolerancia a glifosato. Resistencia a insectos lepidópteros y coleópteros.
MON87460	Tolerancia a estrés por sequía.
MON87460 x MON89034 x MON88017	Tolerancia a estrés por sequía. Resistencia a insectos lepidópteros y coleópteros. Tolerancia a glifosato.
MON88017	Resistencia a insectos coleópteros. Tolerancia a glifosato.
MON89034	Resistencia a insectos lepidópteros.
MON89034 x MON88017	Resistencia a insectos coleópteros y lepidópteros. Tolerancia a glifosato.

El evento transgénico más frecuentemente detectado fue la línea NK603, que confiere el rasgo de tolerancia a glifosato, resultando positivas el 63.6% (n=75) del total de las muestras que previamente habían resultado positivas para los marcadores transgénicos CaMV 35S y T-NOS (n= 118). El evento transgénico TC1507 se encontró en el 55.1% (n=65), el evento MON810 en un 34.7% (n=41), el evento Bt11 en 14.4% (n=17) y el evento GA21 en un 6.8% (n=8) del total de muestras positivas para los marcadores transgénicos CaMV 35S y T-NOS. El evento Bt176 no fue identificado en ninguna de las muestras alimentarias analizadas (Figura 28).



**Figura 28. Porcentaje de muestras positivas a los eventos específicos monitoreados.**

De las muestras de alimentos que resultaron positivas para el escrutinio de OGMs y que contenían al menos un evento transgénico específico, se enlistan en orden ascendente: el 38.5% (n=10) de las muestras de tortillas, el 72.0% (n=18) de las muestras de tostadas, el 72.7% (n=24) de las muestras de botanas, el 88.0% (n=22) de las muestras de harina y finalmente el 88.9% (n=8) de las muestras de cereales (Tabla 23).

**Tabla 23. Presencia de los eventos transgénicos específicos presentes por categoría de alimento.**

Tipo de muestra	Muestras positivas al escrutinio de OGMs	Positivas para al menos un evento transgénico	Presencia de al menos un evento transgénico en las muestras (%)
Cereales	9	8	88.9
Harinas	25	22	88.0
Botanas	33	24	72.7
Tostadas	25	18	72.0
Tortillas	26	10	38.5

En la Tabla 24 se resumen los resultados de la presencia de los eventos transgénicos específicos encontrados por tipo de alimento.

**Tabla 24. Presencia de los eventos transgénicos específicos de maíz por categoría de alimento. Se muestra el número de muestras positivas a cada evento y la presencia de dicho evento en el total de las muestras por categoría.**

Tipo de Alimento	Bt176 (+)	NK603 (+)	TC1507 (+)	GA21 (+)	Bt11 (+)	MON 810 (+)
Tortillas n=35	0 [-]	9 [25.7]	9 [25.7]	0 [-]	0 [-]	4 [11.4]
Botanas n=46	0 [-]	21 [45.7]	18 [39.1]	4 [8.7]	5 [10.9]	11 [23.9]
Harinas n=30	0 [-]	20 [66.7]	18 [60.0]	0 [-]	1 [3.3]	13 [43.3]
Tostadas n=30	0 [-]	18 [60.0]	12 [40.0]	0 [-]	3 [10.0]	8 [26.7]
Cereales n=15	0 [-]	7 [46.7]	8 [53.3]	4 [26.7]	8 [53.3]	5 [33.3]

La distribución de las muestras positivas para los eventos específicos de maíz no fue homogénea en las diferentes categorías de alimentos.

El evento NK603 fue el más frecuente en la categoría de harinas, siendo el 66.7% (n=20) de las muestras positivas para este marcador, muestras que sólo estuvo presente en el 25.7% (n=9) de las muestras de tortillas (Tabla 24). Para los demás eventos, también se observó una distribución heterogénea en la presencia de los eventos transgénicos monitoreados. Al examinar el número total de los diferentes eventos transgénicos por



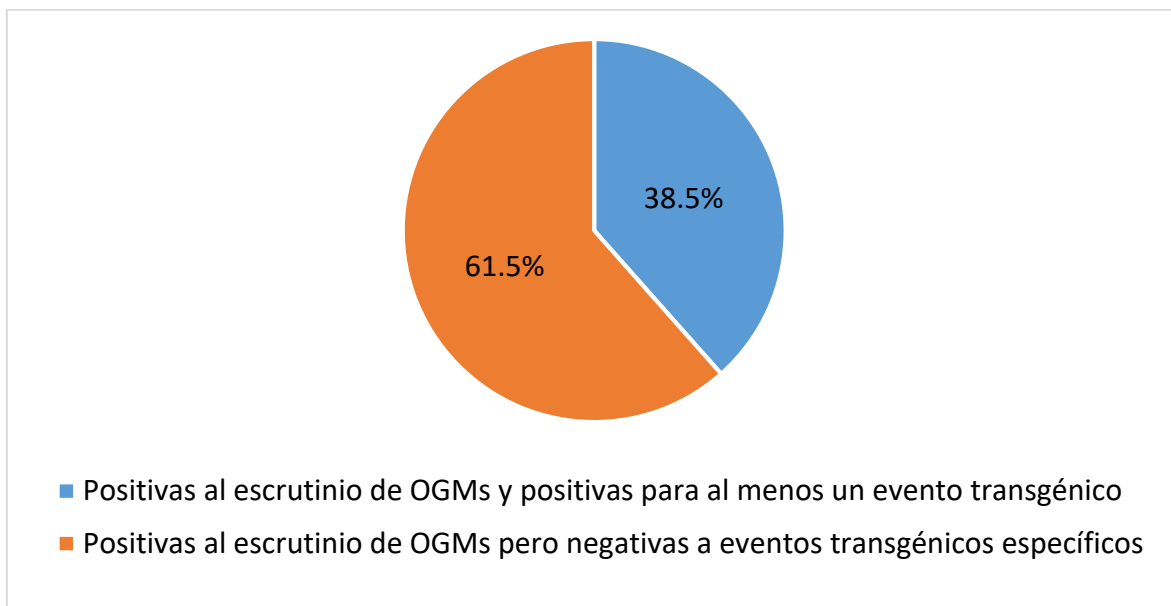
categoría de alimento, los cereales mostraron el mayor número de diferentes eventos transgénicos, seguidos de las muestras de harina, tostadas, botanas y tortillas.

A continuación, se muestra un análisis de la presencia de los eventos transgénicos específicos por categoría de alimento.

### 6.5.1 Identificación de eventos transgénicos específicos en muestras de tortillas.

Se analizaron 35 muestras diferentes de tortillas; a partir del escrutinio de OGMs, el 74.3% (n=26) de las muestras resultaron positivas y el 25.7% (n=9) de las muestras resultaron negativas para los marcadores transgénicos CaMV 35S y/o T-NOS. Lo que implica que, teóricamente de cada 100 muestras disponibles en el mercado, alrededor de 74 contienen maíz genéticamente modificado.

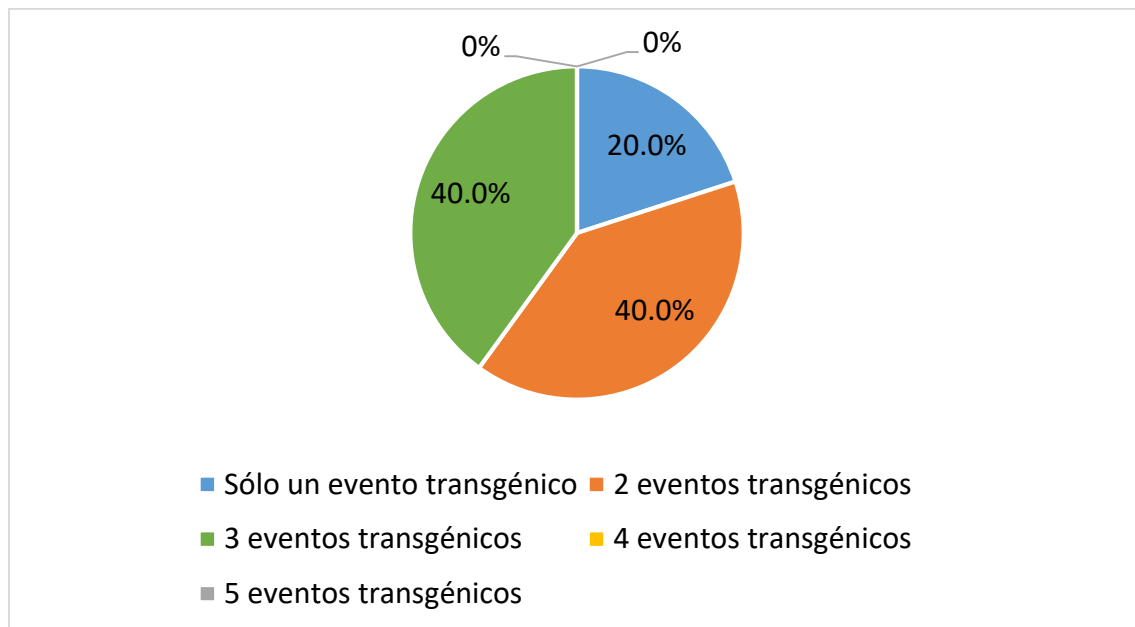
Posteriormente, al realizarse el monitoreo de secuencias específicas de las 26 muestras positivas, el 61.5% (n=16) no contenían ninguno de los seis eventos transgénicos monitoreados en este estudio, sin embargo, el 38.5% (n=10) de las muestras positivas al escrutinio de OGMs sí presentaron al menos uno de estos (Figura 29).



**Figura 29. Resultados de la presencia de secuencias transgénicas específicas en muestras de tortillas positivas al escrutinio de OGMs (n=25).**

De las 10 muestras que resultaron positivas al escrutinio de OGMs y que resultaron positivas al menos a un evento específico, el 20% (n=2) presentaron sólo un evento

transgénico, el 20% (n=4) presentaron dos eventos transgénicos y 20% (n=4) más resultaron positivas para una combinación de tres eventos transgénicos; ninguna de las muestras resultó positiva para cuatro o cinco eventos transgénicos distintos (Figura 30).



**Figura 30. Resultados del número de eventos transgénicos específicos encontrados simultáneamente en las muestras de tortillas positivas al escrutinio de OGMs (n=10).**

En la Tabla 25 se resume el análisis del número de muestras en las que se detectó por lo menos un evento transgénico o la presencia de más de uno de estos en las muestras de tortilla (Frecuencia absoluta), y de la probabilidad de obtener una muestra con algún evento transgénico o combinación de eventos, la cual se obtiene calculando la razón entre la frecuencia absoluta y el total de muestras de tortillas analizadas (Frecuencia relativa).

Debido a que no se monitoreó el total de los eventos transgénicos aprobados en México que contienen los rasgos de resistencia a insectos y/o tolerancia a herbicidas (Tabla 22), no es posible realizar una estimación precisa sobre la proporción en la que estos rasgos se presentan en los productos de maíz disponibles en el mercado mexicano.

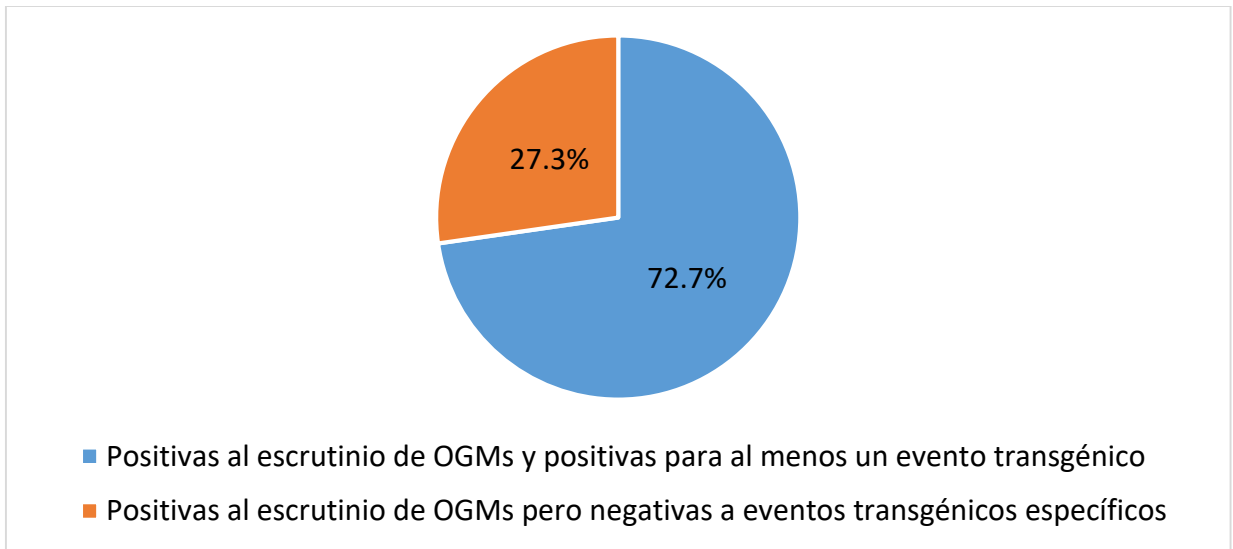
**Tabla 25. Presencia de eventos transgénicos y combinaciones de estos en las muestras de tortillas (T.H. = tolerancia al herbicida, R.I. = resistencia a insectos).**

Evento transgénico o combinación de eventos.	Rasgo(s)	Frecuencia absoluta	%Frecuencia relativa
<b>Un evento</b>			
NK603	T.H. Glifosato	1	2.9
TC1507	R.I. / T.H. Glufosinato	1	2.9
Total		2	5.7
<b>Dos eventos</b>			
NK603/TC1507	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	4	11.4
Total		4	11.4
<b>Tres eventos</b>			
NK603/TC1507/MON810	R.I./ T. H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	4	11.4
Total		4	11.4

### 6.5.2 Identificación de eventos transgénicos específicos en botanas de maíz.

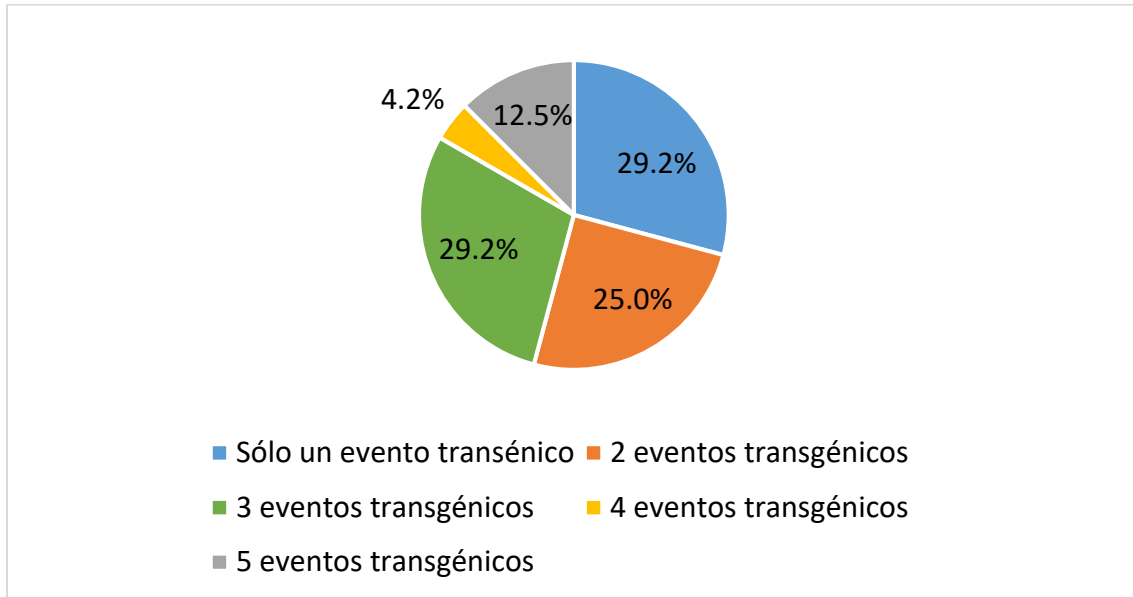
Con respecto al análisis de las botanas elaboradas con maíz (n=46), se encontró el 71.7% (n=33) de las muestras fueron positivas a la presencia del promotor CaMV 35S y/o T-NOS y que el 28.3% (n=13) de las muestras resultaron negativas a la presencia de dichos marcadores transgénicos.

Del 71.7% (n=33) de las muestras que resultaron positivas en el escrutinio de OGMs, en el 27.3% (n=9) no se detectaron los eventos transgénicos específicos monitoreados en esta tesis, pero el 72.7% (n=24) sí presentaron al menos uno de ellos (Figura 31).



**Figura 31. Resultados de la presencia de secuencias transgénicas específicas en muestras de botanas de maíz positivas al escrutinio de OGMs (n=33).**

En la Figura 33 se muestra que del 72.7% (n=24) de las muestras de botanas que resultaron positivas para al menos un evento transgénico monitoreado, el 29.2% (n=7) resultaron positivas para sólo un evento transgénico, el 25% (n=6) presentaron una combinación de dos eventos transgénicos específicos, el 29.2% (n=7) una combinación de tres eventos transgénicos, el 4.2% (n=1) una combinación de cuatro eventos y finalmente el 12.5% (n=3) resultaron positivos a cinco eventos transgénicos específicos diferentes.



**Figura 32. Resultados del número de eventos transgénicos específicos encontrados simultáneamente en las muestras de botanas de maíz positivas al escrutinio de OGMs (n=24).**

En la Tabla 26 se resumen las frecuencias encontradas para cada evento transgénico o combinaciones de eventos y la frecuencia relativa o probabilidad de encontrar una muestra de botana con cada combinación y los rasgos correspondientes a los transgenes encontrados.

**Tabla 26. Eventos y combinaciones de eventos encontrados en las muestras de botanas (R. I= Resistencia a insectos. T.H= Tolerancia al herbicida.)**

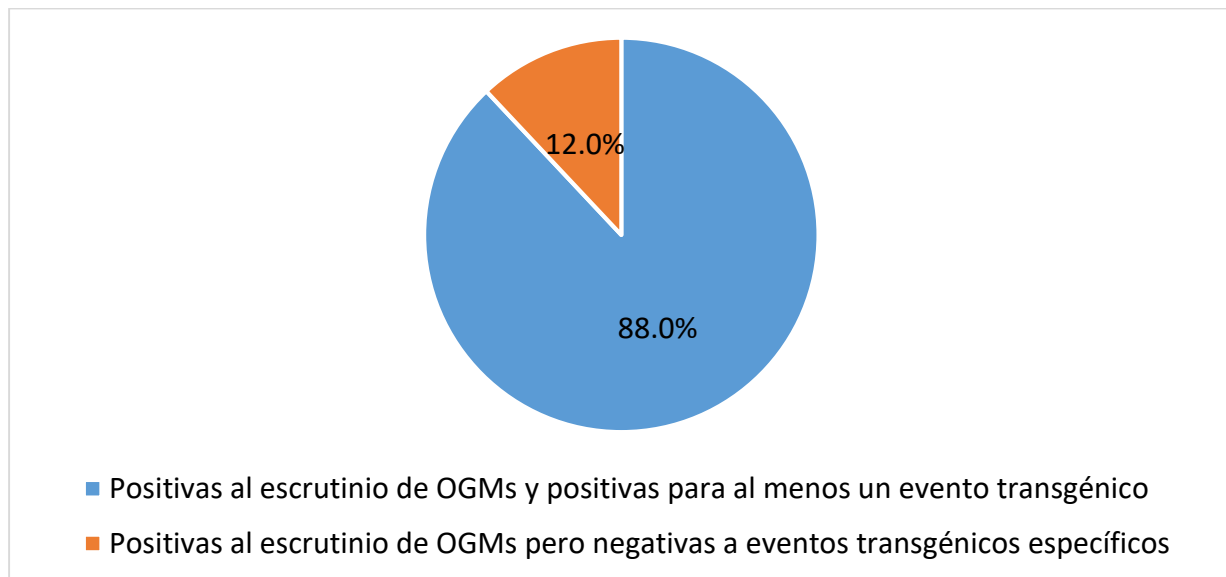
<b>Evento o combinación de eventos.</b>	<b>Rasgo(s)</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>% Frecuencia relativa</b>
<b>Un evento</b>			
NK603	T.H. Glifosato	5	10.9
TC1507	R.I. / T.H. Glufosinato	1	2.2
MON810	R.I.	1	2.2
Total		7	15.2
<b>Dos eventos</b>			
NK603/TC1507	R.I./ T.H Glufosinato/ T.H. Glifosato	6	13.0
Total		6	13.0
<b>Tres eventos</b>			
NK603/TC1507/MON810	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	6	13.0
NK603/TC1507/Bt11	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	1	2.2
Total		7	15.2
<b>Cuatro eventos</b>			
TC1507/GA21/Bt11/MON810	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	1	2.2
Total		1	2.2
<b>Cinco eventos</b>			
NK603/TC1507/GA21/BT11/MON810	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	3	6.5
Total		3	6.5

La probabilidad de encontrar una muestra de botanas elaboradas con maíz GM que contenga más de un evento es alta ya que de las 46 muestras analizadas, en 26 se detectó más de un evento transgénico, combinando así los rasgos de resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas.

### 6.5.3 Identificación de eventos transgénicos específicos en harinas de maíz.

De las muestras de harina analizadas (n=30), el 83.3% (n=25) resultó positivo para el escrutinio de OGMs (presencia de CaMV 35S y/o T-NOS), pero 12% (n=3) de estas últimas, no contenían alguno de los eventos monitoreados en este estudio.

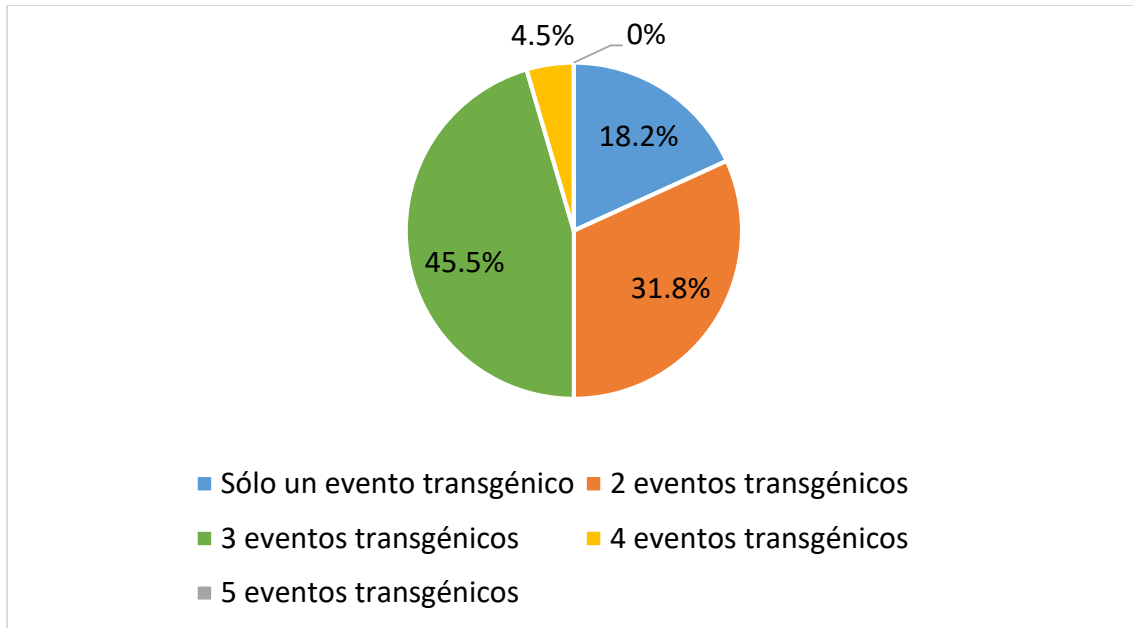
Del 83.3% (n=25) de las muestras que resultaron positivas a la presencia del promotor CaMV 35S y/o T-NOS, el 88% (n= 22) resultó positivo para al menos uno de los eventos transgénicos monitoreados y el 12% (n= 3) resultó negativo para todos los eventos transgénicos específicos monitoreados (Figura 33).



**Figura 33. Resultados de la presencia de eventos transgénicos específicos en harinas de maíz positivas al escrutinio de OGMs (n=25).**

De las 22 muestras que contenían al menos un evento transgénico específico, se encontró que el 18.2% (n=4) fueron positivas para sólo un evento transgénico específico, el 31.8% (n=7) resultó positivo para dos eventos, el 45.5% (n=10) resultó positivo para tres diferentes eventos transgénicos específicos y finalmente el 4.5% (n=1), resultó

positiva para cuatro eventos transgénicos específicos de maíz distintos; ninguna de las muestras resultó positiva para cinco eventos de forma simultánea (Figura 34).



**Figura 34. Resultados del número de eventos transgénicos específicos encontrados simultáneamente en las muestras de harina de maíz positivas al escrutinio de OGMs (n=22).**

En la Tabla 27, se resumen las frecuencias encontradas para cada evento transgénico o combinaciones de eventos y la frecuencia relativa o probabilidad, de encontrar una muestra de harina de maíz con cada combinación de eventos transgénicos y los rasgos correspondientes a los transgenes encontrados.



**Tabla 27. Eventos transgénicos y combinaciones de eventos encontrados en las muestras de harinas (R. I= Resistencia a insectos T.H= Tolerancia al herbicida).**

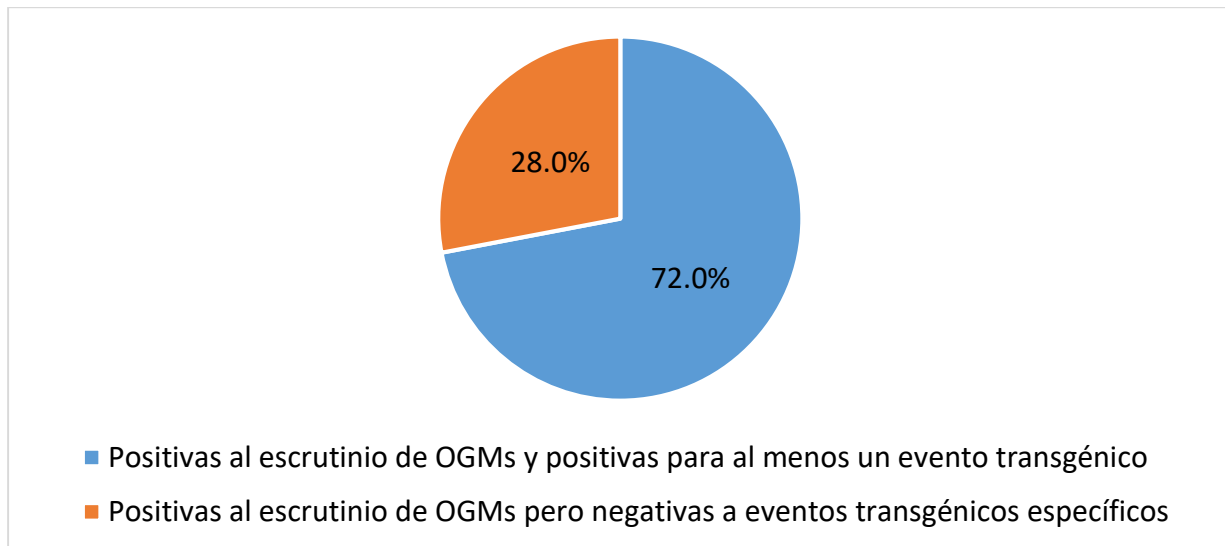
<b>Evento o combinación de eventos.</b>	<b>Rasgo(s)</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>%Frecuencia Relativa</b>
<b>Un evento</b>			
NK603	T.H. Glifosato	2	6.7
TC1507	R.I. / T.H. Glufosinato	2	6.7
Total		4	13.3
<b>2 eventos</b>			
NK603/MON810	R.I. / T.H. Glifosato	2	6.7
NK603/TC1507	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	5	16.7
Total		7	23.3
<b>3 eventos</b>			
NK603/TC1507/MON810	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	10	33.3
Total		10	33.3
<b>4 eventos</b>			
NK603/TC1507/Bt11/MON810	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	1	3.3
Total		1	3.3

Como se puede observar en la combinación que se presentó con mayor frecuencia (NK603/TC1507/MON810), están presentes simultáneamente los rasgos de resistencia a insectos y tolerancia a los herbicidas glufosinato y glifosato.

#### 6.5.4 Identificación de eventos transgénicos específicos en tostadas de maíz.

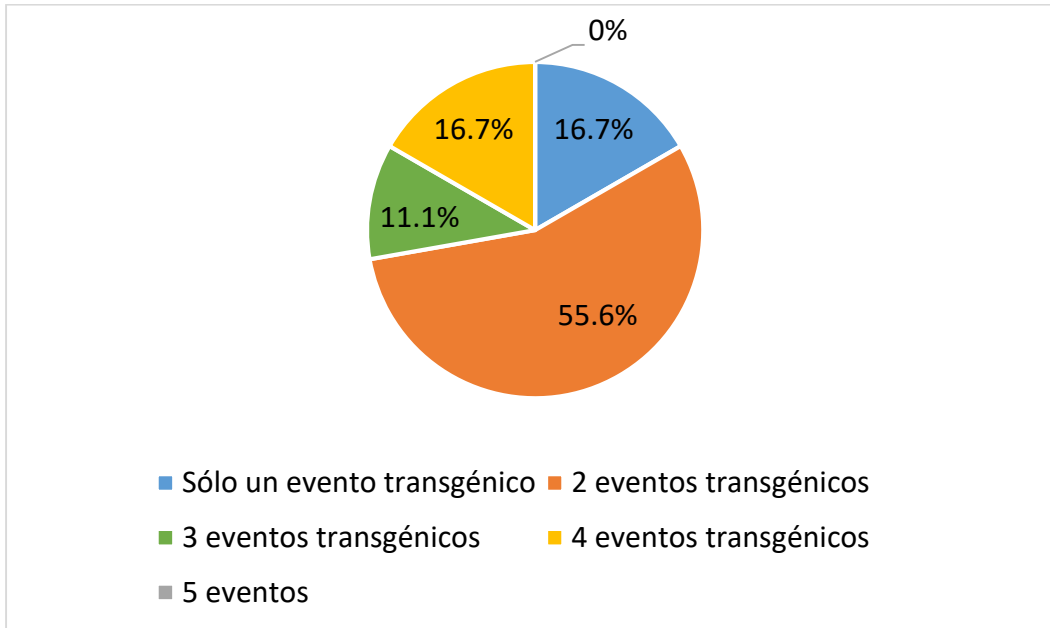
Con respecto a los resultados del monitoreo de secuencias transgénicas específicas en tostadas de maíz se encontró lo siguiente.

De las 30 muestras analizadas el 83% (n=25) resultó positivo a la presencia de secuencias transgénicas (CaMV 35S y T-NOS) y 16.7% (n=5) resultó negativo. De estas 25 muestras, el 72% (n=18) contenía al menos uno de los seis eventos transgénicos incluidos en este estudio y el 28% (n=7) no contenían alguno de los eventos transgénicos monitoreados (Figura 35).



**Figura 35. Resultados de la presencia de secuencias transgénicas específicas en las muestras de tostadas de maíz positivas al escrutinio de OGMs (n=25).**

En la Figura 36 se observa que, de las 18 muestras que contenían al menos un evento transgénico específico, el 16.7% (n=3) contenía sólo un evento transgénico, el 55.6% (n=10) presentó dos eventos transgénicos, el 11.1% (n=2) tres eventos transgénicos y el 16.7% (n=3) de las muestras presentó hasta cuatro eventos transgénicos diferentes; ninguna de las muestras resultó positiva para cinco eventos distintos de manera simultánea.



**Figura 36. Resultados del número de eventos transgénicos específicos simultáneos en las muestras de tostadas de maíz positivas al escrutinio de OGMs (n=18).**

En la Tabla 28 se resumen las frecuencias encontradas para cada evento transgénico o combinaciones de eventos y la frecuencia relativa o probabilidad, de encontrar, una muestra de tostada con cada combinación y los rasgos correspondientes a los transgenes encontrados.

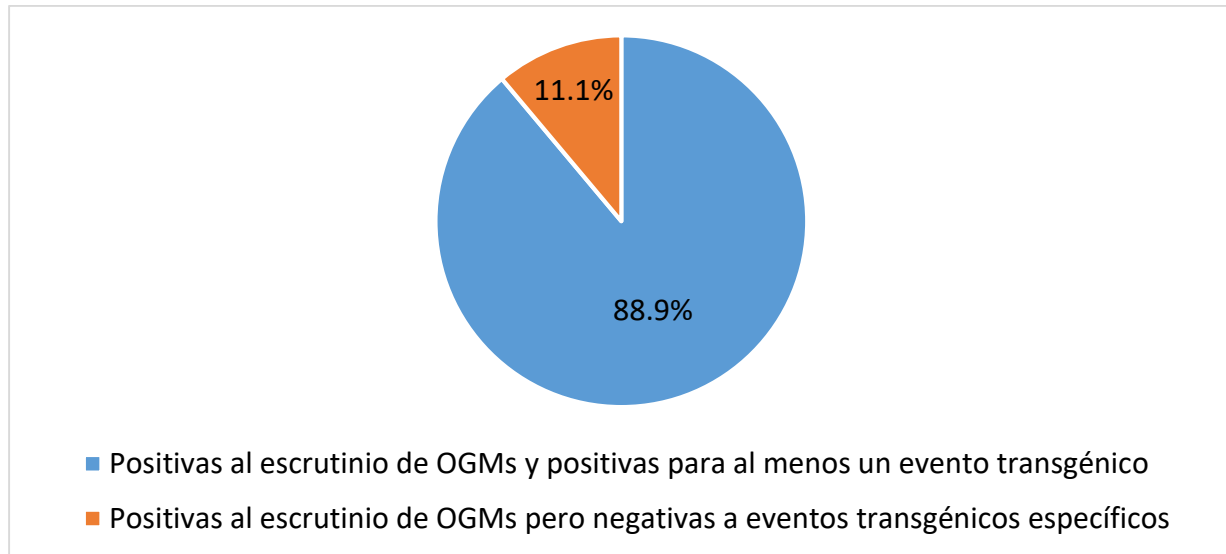
**Tabla 28. Eventos y combinaciones de eventos encontrados en las muestras de tostadas. (R. I= Resistencia a insectos. T.H= Tolerancia al herbicida.)**

<b>Evento o combinación de eventos.</b>	<b>Rasgo(s)</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>% Frecuencia relativa</b>
<b>Sólo un evento</b>			
NK603	T.H. Glifosato	3	10.0
Total		3	10.0
<b>Dos eventos</b>			
NK603/TC1507	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	7	23.3
NK603/MON810	R.I. / T.H. Glifosato	3	10.0
Total		10	33.3
<b>Tres eventos</b>			
NK603/TC1507/MON810	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	2	6.7
Total		2	6.7
<b>Cuatro eventos</b>			
NK603/TC1507/Bt11/MON810	R.I./ T.H. Glufosinato/ T.H. Glifosato	3	10.0
Total		3	10.0

En este tipo de alimento se encontraron con mayor frecuencia muestras que contenían una combinación de dos eventos, combinando los rasgos de resistencia a insectos y tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato.

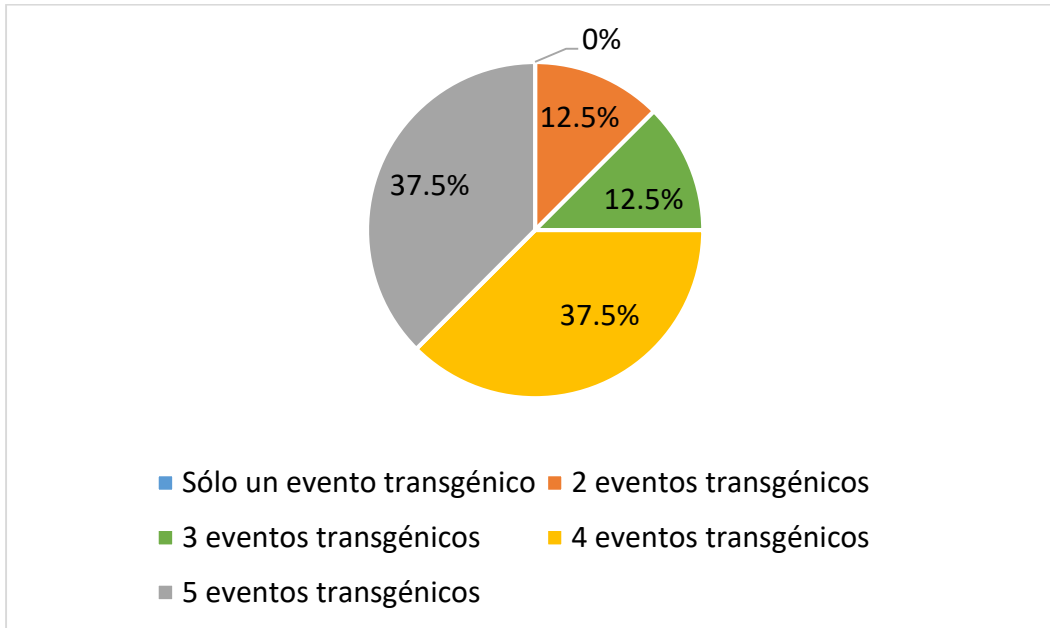
#### 6.4.5 Identificación de eventos transgénicos específicos en cereales de maíz.

Por último, las muestras de cereales resultaron positivas a la presencia de marcadores transgénicos (CaMV 35S y T-NOS) en un 60%, es decir 9 de 15 muestras. De las 9 muestras positivas para el escrutinio de OGMs, el 88.9% (n=8) de las muestras sí contenían alguno eventos transgénicos específicos y sólo el 11.1% (n=1) no presentó ninguna de las seis secuencias transgénicas específicas monitoreadas. (Figura 37).



**Figura 37. Resultados de la presencia de secuencias transgénicas específicas en cereales de maíz (n=15).**

En la Figura 38 se muestra que, de las 8 muestras que habían resultado positivas al escrutinio de OGMs y al menos a un evento específico, el 12.5% (n=1) contenía dos eventos transgénicos, 12.5% (n=1) presentaba tres eventos transgénicos, 37.5% (n=3) contenía una combinación de cuatro eventos transgénicos y finalmente, 37.5% (n=3) presentó simultáneamente cinco de los seis eventos transgénicos monitoreados en este estudio; ninguna muestra resultó positiva para sólo un evento transgénico específico.



**Figura 38. Resultados del número de eventos transgénicos simultáneos en las muestras de cereales (n=8).**

En la Tabla 29 se resume el análisis de las frecuencias encontradas para cada evento transgénico o combinaciones de eventos y la frecuencia relativa o probabilidad, de encontrar, una muestra de cereal con cada combinación de eventos transgénicos y los rasgos correspondientes a los transgenes encontrados.

**Tabla 29. Eventos y combinaciones de eventos encontrados en las muestras de cereales. (R. I= Resistencia a insectos. T.H= Tolerancia al herbicida.)**

<b>Evento o combinación de eventos.</b>	<b>Rasgo(s)</b>	<b>Frecuencia absoluta</b>	<b>% Frecuencia relativa</b>
<b>Dos eventos</b>			
TC1507/Bt11	R.I. / T.H. Glufosinato	1	6.7
Total		1	6.7
<b>Tres eventos</b>			
NK603/TC1507/Bt11	R.I. / T.H. Glufosinato / T.H. Glifosato	1	6.7
Total		1	6.7
<b>Cuatro eventos</b>			
NK603/TC1507/Bt11/ MON810	R.I. / T.H. Glufosinato / T.H. Glifosato	2	13.3
NK603/TC1507/GA21/ Bt11	R.I. / T.H. Glufosinato / T.H. Glifosato	1	6.7
Total		3	20.0
<b>Cinco eventos</b>			
NK603/TC1507/GA21/ Bt11/MON810	R.I. / T.H. Glufosinato / T.H. Glifosato	3	20.0
Total		3	20.0

En este tipo de muestra se identificó con mayor frecuencia la presencia combinada de cinco eventos transgénicos en una misma muestra, por lo que se presentaban los tres rasgos transgénicos presentes mayoritariamente en los cultivos transgénicos: la resistencia a insectos y tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato.

## **6.6 Cuantificación de material transgénico presente en las muestras alimentarias (cuantificación de CaMV 35S).**

Aunque no se realizó la cuantificación de porcentaje transgénico para todas las muestras en las que previamente se determinó la presencia de maíz genéticamente modificado, se analizaron 9 muestras de tortillas, 10 de harinas y 10 muestras de tostadas, provenientes de la Ciudad de México, Chiapas, Estado de México.

Los resultados de la cuantificación de OGMs en 29 diferentes muestras alimentarias se muestran en la Tabla 30.

El 93.1% (n=27) de las muestras cuantificadas contenían más de 1% de contenido transgénico. La cuantificación de CaMV 35S mostró que el 100% (n=9) de las muestras de tortillas contienen más de 1% de contenido transgénico, el 80% (n=8) de las muestras de harina analizadas contienen más de 1% de contenido transgénico y el 100% (n=10) de las muestras de tostadas contienen más de 1% de contenido transgénico. Sólo una muestra de harina de maíz amarillo, proveniente de Colombia disponible en los supermercados mexicanos, sí presentaba en su etiqueta la leyenda 'Este producto contiene organismos modificados genéticamente' y contenía 8.41% de contenido transgénico.

Si se considerara el criterio regulatorio de la Unión Europea para el etiquetado de alimentos que contengan ingredientes transgénicos en cantidades superiores al 1%, 27 de las 29 muestras alimentarias cuantificadas en este estudio deberían mostrar un aviso que indique que han sido elaboradas con ingredientes transgénicos (maíz). Dado que el contenido de CaMV 35S cuantificado en los diferentes tipos de muestras alimentarias es elevado (intervalo desde 0.18% hasta 14.18%), y tomando en cuenta que el maíz proveniente de Estados Unidos no se etiqueta como genéticamente modificado, se puede inferir que dicho maíz se utiliza en la cadena alimentaria del maíz en México, que comienza con las empresas transnacionales que lo comercializan, continúa con las empresas harineras que distribuyen este producto a través de todo el territorio nacional en la mayoría las tortillerías, así como en las compañías que elaboran una gran cantidad de alimentos procesados a base de maíz.



**Tabla 30. Cuantificación del porcentaje de OGMs en muestras alimentarias.**

MUESTRA			GEN REFERENCIA (hmgA)		OGM (Promotor 35S)		%GM exp.
N°	NOMBRE	ORIGEN	Ct	No. Copias	Ct	No. Copias	(OGM/Ref)*100
4	Tortilla de tortillería IV	Estado de México	31,30	1372,96	31,85	170,02	12.38
15	Tortilla de tortillería VI	Oaxaca	30,51	2356,51	31,50	215,47	9.14
25	Tortilla industrial	Ciudad de México	31,28	6026,77	32,14	133,41	2.21
29	Tortilla de tortillería X	Estado de México	29,98	3395,08	30,77	352,00	10.37
30	Tortilla de tortillería XI	Estado de México	30,87	1840,38	32,43	114,79	6.24
31	Tortilla de tortillería XII	Estado de México	30,51	2351,23	30,85	333,31	14.18
33	Tortilla de tortillería XIV	Estado de México	32,44	2706,31	32,80	85,01	3.14
34	Tortilla de tortillería XV	Estado de México	31,07	6947,49	30,98	291,25	4.19
35	Tortilla de tortillería XVI	Estado de México	30,72	8824,59	31,60	191,24	2.17
84	Harina de tortillería I	Chiapas	29,18	25346,99	28,25	1853,15	7.31
89	Harina de maíz azul de tortillería	Chiapas	31,48	5235,48	36,08	9,28	0.18
90	Harina de tortillería VI	Chiapas	29,53	20026,45	29,17	992,91	4.96
91	Harina de tortillería VII	Chiapas	28,68	35784,02	27,57	2928,60	8.18
95	Harina de maíz amarillo tortillería	Chiapas	32,48	2639,97	32,26	122,38	4.64
96	Harina de tortillería XI	Chiapas	28,43	42471,62	27,64	2791,36	6.57
97	Harina de tortillería XII	Chiapas	28,33	45431,64	27,60	2875,46	6.33
102	Harina de tortillería XV	Estado de México	31,14	6622,77	32,51	103,46	1.56
105	Harina maíz amarillo	Colombia	29,87	15836,43	28,74	1331,36	8.41

MUESTRA			GEN REFERENCIA (hmga)		OGM (Promotor 35S)		%GM exp.
N°	NOMBRE	ORIGEN	Ct	No. Copias	Ct	No. Copias	(OGM/Ref)*100
108	Harina de maiz comercial IV	Ciudad de México	31,90	3932,57	34,35	29,82	0.76
119	Tostada horneada artesanal	Colima	30,30	2728,84	32,51	108,62	3.98
120	Tostada artesanal	Colima	30,88	1827,08	34,29	32,88	1.80
121	Tostada casera artesanal	Colima	31,24	1434,99	34,89	21,95	1.53
122	Tostadas industriales IV	Colima	29,86	3665,36	33,01	77,71	2.12
123	Tostadas horneadas industriales	Ciudad de México	30,47	2420,26	32,41	116,34	4.81
124	Tostadas industriales V	Ciudad de México	27,97	13359,81	30,28	487,91	3.65
125	Tostadas industriales VI	Ciudad de México	30,25	2815,58	31,01	298,93	10.62
133	Tostada botanera industrial	Ciudad de México	30,90	1801,64	33,44	58,18	3.23
136	Tostadas Industriales X	Hidalgo	31,79	983,31	33,00	77,99	7.93
137	Tostadas industriales XI	Morelos	30,53	2324,50	33,43	58,50	2.52

### **6.7 Determinación y cuantificación de glufosinato de amonio, glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) en alimentos de maíz.**

Un total de 16 muestras de alimentos elaborados con maíz que resultaron positivos para eventos transgénicos de tolerancia a herbicidas (glifosato y glufosinato) se analizaron para determinar y cuantificar la presencia de glufosinato de amonio, glifosato y su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA). Dichas muestras se analizaron en un laboratorio certificado para la detección de transgenes en diversas matrices, así como de presencia de herbicidas, en Alemania (EuroFins). De las 16 muestras analizadas, cinco eran botanas, cuatro harinas, cuatro tostadas y tres cereales. El 50% de las muestras analizadas resultó positiva para la presencia del herbicida glifosato (Tabla 31).

**Tabla 31. Resultados de la detección y cuantificación de glifosato y AMPA en las muestras que resultaron positivas.**

Muestra	Nombre	Categoría	Origen	Glifosato [mg/kg]	AMPA [mg/kg]	Glufosinato de amonio [mg/kg]	CaMV 35S	T-NOS	NK603	GA21	TC1507
56	Totopos gourmet industriales	Botanas	Estados Unidos	<b>0.014</b>	<0.01	<0.01	+	+	+	-	+
68	Totopos industriales	Botanas	Estados Unidos	<b>0.17</b>	<b>0.017</b>	<0.01	+	+	+	-	+
69	Totopos orgánicos industriales	Botanas	Estados Unidos	<0.01	<0.01	<0.01	+	+	+	-	+
72	Frituras con chile industriales	Botanas	Ciudad de México	<0.01	<0.01	<0.01	+	+	+	-	+
73	Frituras industriales	Botanas	Ciudad de México	<b>0.019</b>	<0.01	<0.01	+	+	+	+	+
82	Harina industrial	Harina	Ciudad de México	<0.01	<0.01	<0.01	+	+	+	-	+
85	Harina industrial	Harina	Ciudad de México	<0.01	<0.01	<0.01	+	+	-	-	+
105	Harina maíz industrial	Harina	Colombia	<b>0.01 ± 0.005</b>	<0.01	<0.01	+	+	+	-	+
106	Harina maíz industrial	Harina	Colombia	<b>0.045</b>	<b>0.015</b>	<0.01	+	+	+	-	+
113	Tostadas industriales	Tostadas	Ciudad de México	<0.01	<0.01	<0.01	+	+	+	-	+
133	Tostada industrial	Tostadas	Ciudad de México	<b>0.011</b>	<0.01	<0.01	+	+	+	-	+
136	Tostadas industriales	Tostadas	Hidalgo	<0.01	<0.01	<0.01	+	+	+	-	+
137	Tostadas industriales	Tostadas	Morelos	<0.01	<0.01	<0.01	+	+	+	-	+
151	Cereal para niños industrial	Cereal	Ciudad de México	<b>0.047</b>	<0.01	<0.01	+	+	+	+	+
155	Cereal industrial	Cereal	Ciudad de México	<b>0.01</b>	<0.01	<0.01	+	+	-	-	+
156	Cereal industrial	Cereal	Ciudad de México	<0.01	<0.01	<0.01	+	+	+	-	+

Como se puede observar en la Tabla 31, se encontraron residuos de glifosato en ocho de las 16 muestras analizadas (Muestras: 56, 68, 105, 106, 133, 151, 155). Dos de las muestras positivas para glifosato también resultaron positivas para la presencia de AMPA (Muestras: 68 y 106).

En la detección de eventos transgénicos específicos, las muestras 56, 68, correspondientes a botanas, las muestras 105, 106 correspondientes a harinas y la muestra de tostada número 133 resultaron positivas para los eventos NK603 y TC1507, que confieren tolerancia a glifosato y glufosinato de amonio, respectivamente, en la cuantificación de dichos herbicidas sólo resultaron positivas para glifosato. Por otro lado, la muestra de botana número 73 y la muestra de cereal número 151 resultaron positivas para los eventos NK603, TC1507 y el evento GA21, este último también confiere tolerancia al herbicida glifosato, las tres muestras mencionadas resultaron positivas para dicho herbicida. Finalmente, la muestra 155, correspondiente a una muestra de cereal para desayuno resultó positiva para el evento TC507 de tolerancia a glufosinato de amonio, sin embargo, resultó positiva a la presencia de glifosato.

Las 16 muestras analizadas habían resultado positivas para el evento transgénico TC1507, que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Sin embargo, todas las muestras analizadas resultaron negativas para la presencia de dicho herbicida. En el resto de las muestras (n=8) que habían resultado positivas para la presencia de algún evento transgénico de tolerancia a herbicidas, no fue posible detectar la presencia de glifosato, AMPA y glufosinato de amonio.

## 7. DISCUSIÓN

Dado que en México se importan alrededor de 11 millones de toneladas de maíz desde Estados Unidos, considerando que el 92% del maíz sembrado en dicho país es genéticamente modificado y que no es segregado del maíz convencional, que en México se encuentran aprobados 68 eventos transgénicos de maíz y que desde 2001 se ha detectado la presencia de maíz transgénico en varios estados del país, se deseaba probar la presencia de secuencias transgénicas de maíz en productos alimentarios elaborados con dicho grano comercializados en el país. Si adicionalmente se considera la inconsistencia en los esfuerzos de biomonitorio de granos de importación por parte de las entidades mexicanas encargadas de la sanidad, calidad e inocuidad alimentarias, se consideró altamente probable que el maíz transgénico de importación esté alcanzando la cadena de producción agroalimentaria humana y que residuos de herbicidas como el glifosato estén presentes en los alimentos.

En el presente trabajo se evaluaron una gran cantidad de productos alimentarios de maíz con el objetivo de tener una buena representación de las diferentes formas en las que dicho grano es consumido en centros urbanos del país, donde vive alrededor del 78% de la población (INEGI, 2010). Se monitoreó la presencia de dos secuencias recombinantes ampliamente utilizadas en ingeniería genética y en la generación de los cultivos transgénicos (el promotor CaMV 35S y el terminador T-NOS) y seis eventos transgénicos específicos de maíz liberados en Estados Unidos, algunos desde hace más de 20 años (ISAAA, 2015b), cinco de ellos liberados para consumo en México entre 2002 y 2007 (COFEPRIS, 2015), y que por lo tanto pueden estar potencialmente presentes en los alimentos elaborados con maíz.

En la literatura, existen trabajos que se habían enfocado en la puesta a punto de las técnicas moleculares para detectar y cuantificar secuencias transgénicas en alimentos procesados de maíz, soya y otros cultivos GM (Ermini et al., 2004; Quirasco & Schoel, 2008; Rabiei *et al.*, 2013).

También se han publicado trabajos que han evaluado el impacto del procesamiento con calor en la detección de soya y maíz transgénico (Vijayakumar *et al.*, 2009) así como de los efectos de la nixtamalización y el procesamiento térmico en la detección de eventos

transgénicos en productos de maíz elaborados bajo condiciones de laboratorio (Quirasco *et al.*, 2004).

Se ha observado que el tipo de matriz alimentaria y los cambios fisicoquímicos que sufren los alimentos tienen un efecto directo tanto en la integridad del ADN como en la eficiencia de su extracción. Se ha demostrado que, en los productos nixtamalizados, se recupera una menor cantidad de ADN: en la harina de maíz se recupera cerca del 68% del material genético, mientras que en productos que además han sido sometidos a altas temperaturas como las tortillas (200°C) se recupera cerca del 30% y en productos fritos se puede recuperar entre 9 y 15% del ADN en relación a lo que se obtiene de la extracción de ADN de maíz sin procesar (Quirasco *et al.*, 2004).

El presente trabajo no se enfocó en realizar una comparación que relacionara el tipo de muestra y la calidad del ADN obtenido con la capacidad de realizar los análisis moleculares. Sin embargo, con base en la literatura y en los resultados experimentales se concluyó que a pesar de que se obtengan concentraciones menores de ADN extraído en matrices alimentarias altamente procesadas, es posible detectar tanto las secuencias endógenas maíz (gen *hmga*), como las secuencias transgénicas. Las muestras analizadas cumplieron con las condiciones necesarias para realizar posteriormente la detección de las secuencias transgénicas de maíz, corroborando en primer lugar la pureza del ADN obtenido, estimada mediante la absorbancia de luz UV a 260 nm y la amplificación del gen endógeno *hmga*, cuya presencia se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Este es el primer trabajo en el que se analiza el contenido de secuencias transgénicas de maíz en un gran número de productos elaborados con dicho grano disponibles comercialmente en México, país que además es centro de origen y diversificación del cultivo.

Se encontró que el 75.6% del total de muestras analizadas, contenía al menos alguno de los dos elementos transgénicos CaMV 35S y T-NOS. A pesar de que se encontró maíz GM con mayor frecuencia en las muestras de harinas y tostadas, no existía diferencia significativa en la incidencia de dichas secuencias transgénicas por el tipo de alimento.

Por otro lado, se confirmó la presencia de eventos transgénicos específicos de maíz en la mayoría de los productos industriales analizados. Desde 2003, la COFEPRIS ha

aprobado un gran número de eventos transgénicos, que han sido aprobados y sembrados en otros países, como adecuados para consumo humano y animal en México (Anexo III).

Se encontraron eventos transgénicos específicos (de resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas o ambos) en el 69.5% de las muestras que previamente resultaron positivas al escrutinio de OGMs. Los eventos transgénicos mayormente representados en los alimentos, fueron NK603 y TC1507, los cuales contienen el rasgo de tolerancia a los herbicidas glifosato y glufosinato de amonio, respectivamente; seguido del evento MON810, de resistencia a insectos. En menor frecuencia se encontraron los eventos Bt11, tanto de resistencia a insectos y tolerancia a glufosinato de amonio y, finalmente el evento GA21 de tolerancia a glifosato.

En todas las categorías de alimentos analizados se encontraron con mayor frecuencia combinaciones de dos o más eventos transgénicos simultáneos por muestra, resultando en la coexistencia de los rasgos de resistencia a insectos, tolerancia a glifosato y glufosinato de amonio en la mayoría de las muestras que contenían maíz transgénico.

Una explicación sobre dichos resultados se relaciona con el hecho de que las líneas de maíz con eventos apilados originalmente derivados de eventos individuales, han comenzado a ser comúnmente utilizados en la producción de maíz en Estados Unidos (USDA, 2016).

Una de las limitaciones de este estudio es que no es posible determinar si las combinaciones de eventos específicos de maíz encontradas en las muestras, se deben a eventos transgénicos apilados o a combinaciones de eventos individuales que son utilizados para producir alimentos derivados de maíz. Sin embargo, no puede descartarse que las muestras hayan sido elaboradas con maíz que contuviera eventos transgénicos apilados.

Los eventos transgénicos específicos monitoreados en este trabajo, con excepción de Bt176, representan la mayoría de eventos liberados en México en pruebas experimentales y pruebas piloto entre 2009 y 2013 (SENASICA, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013). Este también es el caso para Estados Unidos, país desde el cual México importa maíz (ISAAA, 2015b) y para Sudáfrica, país desde el cual se importó más de un millón de toneladas en 2012 (Rubio, 2015) .



Aunque el evento transgénico Bt176 no está aprobado para consumo humano en nuestro país, se monitoreó debido a la evidencia científica sobre su toxicidad. Vacas que recibieron una dieta alta en maíz Bt176, presentaron una mortalidad de hasta 10% precedido de parálisis, fiebre, falla renal y problemas epiteliales (Glöckner & Séralini, 2016). No se determinó si la toxina Cry1Ab, presente en este tipo de maíz, ocasionó de manera directa los efectos tóxicos en dichos animales, pero existe evidencia de toxicidad en otros organismos como las catarinas (Hilbeck et al., 2012), las abejas (Ramirez-Romero et al., 2008), además de la comprobada citotoxicidad (*in vitro*) en células hepáticas humanas (R. Mesnage, Clair, et al., 2013). En el presente trabajo, el evento Bt176 no fue identificado en ninguna de las muestras analizadas.

Cabe mencionar que otro de los eventos que sí fueron monitoreados en este estudio, el MON810 (con rasgo de resistencia a insectos), contiene la misma toxina insecticida que el evento Bt176, Cry1Ab (ISAAA, 2015b). Para el maíz MON810 también se ha encontrado evidencia, en modelos animales, de daños a la salud tales como daño renal (de Vendômois et al., 2009), hepático y cardiaco (Gab-Alla, 2012), reacciones inmunológicas y alérgicas (Andreassen et al., 2014).

En este estudio, del total de las muestras que contenían maíz genéticamente modificado, el 34.7% (n=41), contenía el evento transgénico MON810. Las muestras en las que se encontró este evento con mayor frecuencia fueron las harinas (n=13), seguido de las botanas de maíz (n=11), las tostadas (n=8) y los cereales para desayuno (n=5) y finalmente las tortillas (n=4).

El evento Bt11 también contiene la toxina insecticida Cry1Ab y adicionalmente contiene el gen que confiere tolerancia a glufosinato de amonio (ISAAA, 2015b). De las muestras que contenían maíz transgénico, el 14.4% (n=17), contenía el evento Bt11 de resistencia a insectos. Las muestras que presentaron con mayor frecuencia dicho evento fueron los cereales para desayuno (n=8), las botanas de maíz (n=5), las tostadas (n=3) y por último las harinas (n=1), no se encontró ninguna muestra de tortilla que contuviera el evento Bt11.

El evento TC1507, contiene los rasgos de resistencia a insectos y tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. De las muestras alimentarias que contenían maíz GM, el 55.1% (n=65) de las muestras contenían este evento transgénico. Las muestras de harina

(n=18), así como las de botanas (n=18) fueron las categorías de alimentos en los que se encontró de forma más frecuente en evento TC1507, seguido de las muestras de tostadas (n=12), las muestras de tortillas (n=9), y las muestras de cereales de maíz (n=8).

Existe evidencia científica sobre la toxicidad en modelos animales del evento transgénico NK603, que fue el más frecuente en las muestras analizadas. Se han reportado daños crónicos en riñón, hígado, desbalance hormonal y tumores mamarios en ratas alimentadas con este maíz, con y sin aplicación del herbicida Roundup® (G.-E. Séralini et al., 2014). Encontramos que, de las muestras que resultaron positivas a la presencia de maíz transgénico, el evento NK603 está presente en el 63.6% (n=75) de las muestras. La categoría alimentaria en la que más frecuentemente se encontró el evento NK603 fue la de botanas de maíz (n=21), seguido de las harinas (n=20), tostadas (n=18), tortillas (n=9), y finalmente los cereales (n=7).

El evento transgénico GA21, que contiene el rasgo de tolerancia al herbicida glifosato, fue el menos representado en todas las categorías de alimentos que contenían maíz transgénico con el 6.8% (n=8). Las categorías de alimentos en los que se encontró dicho evento transgénico más frecuentemente fueron las botanas de maíz (n=4), y los cereales (n=4), no se encontraron muestras de tortillas, tostadas ni harinas que contuvieran el evento transgénico GA21.

En el presente trabajo también se determinó, de manera cuantitativa, la presencia de material transgénico (cuantificación de CaMV 35S) en 29 muestras de alimentos (Tortillas n=9, Harinas n=10, Tostadas n=10), en el 93.1% de los casos se encontró más de 1% de dicha secuencia transgénica, las muestras de tortillas mostraron el mayor porcentaje de contenido transgénico. Si en México se considerara el criterio aplicado en la Unión Europea, el cual indica que deben ser etiquetados los alimentos con un contenido de OGMs igual o superior a 1% (DOUE, 2002b), muchos de los productos alimentarios altamente consumidos en México como las tortillas tendrían que ser etiquetados con la leyenda: ‘Contiene Organismos Genéticamente Modificados’, que de acuerdo a los resultados de este estudio, contienen más de 1% de secuencias recombinantes.

Este estudio se enfocó principalmente en monitorear y cuantificar la presencia de maíz transgénico en productos alimentarios disponibles en grandes superficies comerciales (supermercados, tiendas de conveniencia), cuya presencia en los grandes centros

urbanos continúa creciendo (GRAIN, 2015b) y por lo tanto ofrecen productos alimentarios procesados a grandes sectores de la población urbana a precios accesibles para este sector de la población. En este trabajo, se encontraron productos (por ejemplo tortillas, harinas y tostadas de maíz), que son ofrecidos en dichos puntos de venta, cuyo contenido de maíz transgénico va desde 1 a 14% (m/m), lo que indica que la población urbana de México, estimada en casi 93 millones de personas en el último censo (INEGI, 2010), está consumiendo de manera inadvertida maíz transgénico que puede contener proteínas transgénicas, en los alimentos que consume cotidianamente. Es evidente que el contenido de maíz transgénico sobrepasa los niveles establecidos por la Unión Europea, por lo que con seguridad no se trata de alimentos elaborados con maíz con niveles bajos de contaminación sino de productos elaborados directamente con maíz transgénico mezclado con maíz convencional.

Finalmente, en el presente trabajo, se analizaron 16 muestras para detectar residuos de glifosato, AMPA y glufosinato de amonio en un laboratorio certificado externo (EuroFins). La mitad de dichas muestras (Botanas n=3, Harinas n=2, Tostadas n=1, Cereales n=2) contenían residuos de glifosato, mientras que en dos de ellas (Botanas n=1, Harinas n=1) se encontró el metabolito AMPA y ninguna de las 16 muestras resultó positiva para la presencia de glufosinato de amonio.

De las 118 muestras de alimentos que fueron positivas para al menos un marcador transgénico, los eventos tolerantes a glifosato, NK603 y GA21 representan casi el 64% de los positivos. Aunque en esta fase del estudio se cuantificaron pocas muestras, los resultados obtenidos son un indicio de la presencia generalizada de agrotóxicos en la cadena alimentaria de maíz en México, lo que indicaría la contaminación de alimentos procesados con herbicidas como el glifosato.

Estos resultados, plantean por lo menos dos escenarios sobre el origen del maíz utilizado para elaborar los productos (tortillas, tostadas, harinas, cereales y botanas). El primer escenario podría ser que el maíz con el que se elaboran dichos productos es principalmente el importado de Estados Unidos y, por lo tanto, se confirma que las instituciones encargadas de la inocuidad alimentaria han fallado en restringir su uso únicamente para alimento animal. El segundo escenario podría sugerir que los productos están elaborados con maíz sembrado en México, que podría ser transgénico y que ha sido asperjado con glifosato.

La presencia de maíz transgénico en la cadena alimentaria mexicana plantea, de acuerdo a los resultados obtenidos, una situación grave que podría comprometer tanto la salud de la población como aspectos económicos y sociales, relacionados con la producción, siembra, comercialización y consumo de maíz en México, por lo que se considera relevante discutir algunos de estos puntos.

### **7.1 El contexto socioeconómico del consumo de maíz en México.**

La presencia de variedades de maíz transgénico en los alimentos mexicanos tiene su origen en las condiciones económicas y políticas que han llevado a la importación de maíz en México. Desde la firma del TLCAN con Estados Unidos y Canadá en 1994, se liberaron gradualmente los aranceles de los cultivos básicos, hasta llegar en 2008 a la apertura total del mercado y con ello a la dependencia de nuestra agricultura de las estrategias de expansión comercial de Estados Unidos. De 1994 a 2007 las importaciones de maíz se incrementaron a la elevada tasa del 8.6%. Desde entonces, se consolidó una dependencia estructural de granos básicos hasta llegar a importar en 2013, el 94% de la soya consumida en el país, el 85% del arroz, el 61% del trigo, 20% del frijol y el 36% del maíz (Rubio, 2013).

A finales del 2010 y principios del 2011, ocurrió en México un desastre meteorológico por las fuertes heladas que afectaron la producción de maíz blanco en Sinaloa (Rubio, 2012). Las pérdidas y el aumento en el precio del maíz nacional llevaron a la necesidad de importar maíz blanco de Sudáfrica como un hecho inédito, y de enero a noviembre de 2012 se importaron poco más de un millón de toneladas de dicho grano (Rubio, 2015). Información del ministerio de agricultura del país africano indica que el tipo de maíz que se importó desde Sudáfrica en el año 2013 es maíz transgénico de las variedades Bt11, MON810, NK603, GA21 y MON810 X NK603 (DAFF, 2013). Sin embargo, no se ha podido encontrar información del uso o destino final de ese maíz en México.

Para 2013 se importaban alrededor de 11 millones de toneladas anuales de maíz amarillo proveniente de Estados Unidos que supuestamente se utilizarían para alimento de ganado y no para consumo humano (Forbes, 2013).

Con el TLCAN se ha beneficiado ampliamente a las empresas agroalimentarias transnacionales, que importan y distribuyen maíz, así como a las empresas que lo

compran como insumo para producir alimentos procesados elaborados con dicho cereal (Rubio, 2015).

Las empresas agroalimentarias concentran la distribución y comercialización de los granos y tienen un carácter oligopólico, pues 20 de ellas controlan el mercado agroalimentario mexicano, mientras que cuatro controlan el 66% de la oferta del maíz: Maseca, Cargill, Minsa y Archer Daniel's Midland (Rubio, 2015). En 2014, nueve compañías acaparaban 91% del programa de apoyos para la comercialización de maíz de la Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios (ASERCA), La empresa Gruma S.A. de C.V, poseedora de Maseca es la principal beneficiaria por el gobierno federal, que obtuvo alrededor de 217 millones de pesos y Minsa es la segunda acaparadora de apoyos, con alrededor de 119 millones de pesos (Ramírez, 2015), también recibieron apoyos la transnacional Cargill, Bachoco y la Compañía Nacional Almacenadora S.A. de C.V., subsidiaria de Grupo Maseca (Rosas, 2014).

La industria harinera privada, mayormente representadas por las empresas Gruma S.A. de C.V, y Minsa S.A de C.V, ha jugado un importante papel en la transformación de la producción de tortilla, que previamente se elaboraba a partir del nixtamal con grano de maíz hacia la forma 'harinizada'. El gobierno mexicano favoreció a dichas industrias con subsidios estatales, mientras que disminuyeron los apoyos a los pequeños molineros, dejándolos con escasas posibilidades de recuperar su antigua posición (Massieu *et al.*, 2002). Desde la década de los noventa, las importaciones provenientes de Estados Unidos principalmente atendieron la demanda de maíz para fines industriales, desarrollándose el consumo de productos elaborados con harina de maíz (botanas, tostadas, cereales y principalmente, tortilla de harina de maíz) (Massieu *et al.*, 2002).

Los supermercados y las tiendas de conveniencia han sido el medio por el que las compañías alimentarias (nacionales y transnacionales) han acercado sus productos tanto a la población urbana como a la población rural con menor poder adquisitivo (GRAIN, 2015b). Los productos disponibles en dichos establecimientos son en su inmensa mayoría alimentos procesados, debido a la alta disponibilidad de dichos alimentos y al relativo bajo costo económico de los mismos, la población consume cada vez más este tipo de productos, transformando la dieta de manera importante, basada previamente en

alimentos tradicionales que cubrían las necesidades nutricionales reales, hacia el consumo de bebidas azucaradas, y alimentos procesados de alta densidad energética con un gran contenido de grasas saturadas y carbohidratos (GRAIN, 2015b).

De esta manera, se ha inducido un cambio en los patrones de consumo entre la población mexicana que actualmente se manifiesta en los niveles de salud y nutrición de la población y un incremento en la venta de alimentos procesados, teniendo un aumento de 5-10% entre 1995 y 2003 (Hawkes et al., 2009), reflejado en un incremento en el consumo de botanas industrializadas de maíz de 1.8 g/día en el año 2000 a 11 g/día en 2012 (D. López, 2014) y un incremento en 12% la obesidad y sobrepeso en el país entre el 2000 y el 2006 (García-Urigüen, 2012).

## **7.2 Promesas, hechos y riesgos de los alimentos transgénicos.**

Una de las promesas de la tecnología transgénica es que los cultivos GM pueden aumentar la seguridad alimentaria en todo el mundo; la realidad es que los cultivos GM se producen a gran escala como productos de exportación en un puñado de países desarrollados y emergentes, lo que refuerza el modelo de agricultura industrial que se dedica a producir grandes volúmenes de materias primas para los mercados mundiales de la industria de alimentos, en su mayoría procesados y por lo tanto dichos cultivos no se han utilizado ni diseñado con la finalidad de atender las necesidades de las comunidades que no tienen acceso a recursos para producir alimentos nutritivos (Greenpeace, 2015b).

En el año en el que se plantaron las primeras semillas GM, había 800 millones de personas en situación de hambre; actualmente, con millones de hectáreas de producción de cultivos transgénicos, 1000 millones de personas sufren de hambre, por lo que este tipo de agricultura ha fallado en cumplir sus promesas y realmente no están “alimentando al mundo” (GRAIN, 2013).

El reporte más reciente publicado en el periódico New York Times muestra, con base en datos de la Organización de las Naciones Unidas, que los cultivos transgénicos han incrementado el uso de herbicidas de manera significativa, pero sin haber aumentado el rendimiento desde su introducción hace 20 años (Hakim, 2016).

Los datos de la FAO muestran claramente que el mundo produce la comida suficiente para alimentar a toda la población año con año (FAO, 2013). Sin embargo el hambre prevalece, esto se debe a que la inseguridad alimentaria no es una cuestión de productividad, sino de acceso a recursos y tierras cultivables, cuyas causas son la pobreza y la exclusión (GRAIN, 2013). Además, la cadena alimentaria industrial utiliza alrededor del 70% de los recursos agrícolas a nivel mundial, para producir sólo el 30% del suministro de alimentos y por otro lado desperdicia dos tercios de la producción de alimentos; mientras que los campesinos que producen alimentos a nivel mundial, utilizan el 30% de los recursos agrícolas para producir el 70% de los alimentos, fomentando la diversidad mediante el cultivo de millones de variedades de cientos de cultivos (ETC Group, 2014).

Por otra parte, se ha sugerido a partir de las modificaciones genéticas, podrían ocurrir efectos adversos sobre las mismas plantas transgénicas, sobre las poblaciones de sus contrapartes no transgénicas y sobre organismos no blanco, debido a la generación de nuevos compuestos o proteínas inadvertidas.

Los efectos no intencionados se dan a partir de mutaciones aleatorias que suceden durante la transformación y el cultivo de tejidos de la planta, o por efectos pleiotrópicos de la proteína introducida; actualmente no existen pruebas estandarizadas para evaluar estos cambios en las plantas GM, pero diversos estudios consideran que para realizar un análisis de riesgos completo se requiere una visión genómica más amplia, utilizando metodologías para evaluar perfiles “ómicos”, es decir, se debe hacer uso de disciplinas como la genómica, proteómica, transcriptómica y metabolómica (Ladics *et al.*, 2015).

El uso de estas disciplinas genera información completa y detallada de los perfiles genómicos, de expresión de genes, de proteínas y metabolitos de las plantas analizadas, tanto de los eventos transgénicos como de sus contrapartes no transgénicos. Conociendo estos perfiles se puede evaluar si la ausencia o presencia de algún metabolito o proteína, así como de la expresión de algunos genes en la planta genéticamente modificada representa algún riesgo para la salud o el medio ambiente (European Commission *et al.*, 2008).

Una de las cuestiones que se discuten sobre los alimentos GM, es la introducción aleatoria de las construcciones transgénicas en el ADN del organismo receptor (Álvarez-Buylla *et al.*, 2013) . Un ejemplo es la integración de la secuencia GM cerca de retrotransposones o secuencias repetitivas, ya que al introducirse un promotor transgénico dentro o cerca de éstos elementos puede conducir a alteraciones de los patrones de expresión de los genes localizados cerca o incluso lejos del inserto, así como también puede promover la sobreexpresión del transgén (Turrent *et al.*, 2013).

Los efectos no intencionados que pueden generarse en la planta, podrían depender del número de veces en las que la construcción de genes fue añadida al genoma de la célula, de la arquitectura del fragmento insertado y de la naturaleza bioquímica y funcional del rasgo introducido; la introducción del transgén puede influenciar el funcionamiento de las secuencias flanqueantes, su efecto puede ser mutagénico y puede resultar en una pérdida o ganancia de función además de poder generar otros posibles fenotipos (Filipecki *et al.*, 2006).

El proceso de transgénesis puede promover mecanismos mutagénicos relacionados con el estrés, un ejemplo de estos son los cambios epigenéticos como metilación del ADN y modificaciones en las histonas; los cambios son la hipometilación del ADN, que da lugar a activación de genes e inestabilidad cromosómica e hipermetilación del ADN, llevando consigo silenciamiento de genes, reestructuración de la cromatina y silenciamiento de ARN asociado (Álvarez-Buylla *et al.*, 2013).

Por otra parte, debido al contexto genómico en el que se inserta un transgén, este puede variar en sus propiedades, o bien que la integración de ADN foráneo puede ser la fuente indirecta de nuevos ARN y proteínas recombinantes (Rang *et al.*, 2005).

Otra de las preocupaciones ha sido la posibilidad de que el promotor 35S sea transferido de las plantas GM a otros organismos a través de procesos de transferencia horizontal de ADN ya que el promotor posee un *hot-spot* de recombinación, hecho que incrementa su probabilidad de llevar a cabo una transferencia horizontal exitosa (Kohli *et al.*, 1999). Sin embargo, en los análisis de riesgos no se ha abordado adecuadamente el hecho de que este promotor sea capaz de activar genes de especies evolutivamente distantes.



Los posibles efectos del uso del promotor 35S CaMV en la transformación de plantas deben seguir investigándose, al igual que otras secuencias y sus productos (proteínas) usadas en construcciones transgénicas.

Existe evidencia científica sobre diferencias en la expresión de genes endógenos cuando dos líneas de maíz transgénico se cruzan para generar un evento apilado; en un estudio reciente, el contenido de algunas proteínas no transgénicas en variedades GM apiladas no estaba comprendido en el intervalo de variabilidad natural de la línea no transgénica de maíz (Agapito-Tenfen et al., 2014).

Hasta ahora no se ha comprobado que los alimentos transgénicos sean seguros para la alimentación humana y la industria biotecnológica se niega a aceptar los estudios que demuestran los potenciales problemas para la salud humana por el consumo de los mismos (Alavez, V., Álvarez-Buylla, 2013). Se han llevado a cabo revisiones sobre los numerosos estudios de los posibles efectos adversos de los cultivos transgénicos como arroz, soya, trigo y maíz; se ha encontrado que existe un cierto equilibrio entre el número de investigaciones que afirman que los cultivos GM son equivalentes a los cultivos convencionales y el número de investigaciones que aún levantan serias preocupaciones sobre el consumo de plantas transgénicas (Domingo, 2016).

En dicha revisión, se concluye que cada producto transgénico debe ser evaluado con los estudios apropiados que indiquen el nivel de seguridad asociados a ellos y que existe una necesidad de establecer guías detalladas que permitan la generación de estudios científicos comparables y reproducibles; además, los estudios a largo plazo son claramente necesarios de modo que se pueda garantizar que el consumo de plantas GM no implica un daño a la salud de los consumidores.

Debe destacarse que las investigaciones más recientes en las que no se observaron efectos adversos, eran estudios subcrónicos (con una duración de 90 días), sin embargo, cuando se han conducido estudios a largo plazo como el de (G.-E. Séralini et al., 2014) los resultados han sido tremendamente controversiales dentro de la comunidad científica. Además, estos estudios a largo plazo deberían llevarse a cabo bajo el auspicio de los gobiernos, o de las autoridades sanitarias correspondientes, en paralelo con laboratorios independientes, en los cuales se incluyeran los efectos por el consumo a largo plazo de

plantas transgénicas tales como mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, entre otras (Domingo, 2016).

La tecnología que acompaña a los cultivos transgénicos, como son los herbicidas, también es considerada como riesgosa para la salud humana y animal. Alrededor del 89% del maíz GM cultivado en Estados Unidos es transgénico tolerante a herbicidas (Fernandez-Cornejo, 2013). Los herbicidas a base de glifosato son los agroquímicos más ampliamente utilizados a nivel mundial (Benbrook, 2016).

Con la generación de malezas resistentes al herbicida glifosato y la creciente adopción de cultivos tolerantes a éste ha habido un importante incremento del herbicida en el ambiente y los alimentos. Este aumento tan dramático podría plantear mayor riesgo de defectos de nacimiento en humanos (Arbuckle *et al.*, 2001; Garry *et al.*, 2002) y otros problemas reproductivos (Schreinemachers, 2003), más impactos severos en los ecosistemas acuáticos (Bernards, 2012) y daño a cultivos y plantas cercanas (Benbrook, 2012).

Aún no existe evidencia suficiente para determinar si los efectos tóxicos observados de los herbicidas a base de glifosato en modelos animales, células humanas (*in vitro*) e incluso en humanos (Benedetti *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 2008; Garry *et al.*, 2002; Mesnage *et al.*, 2013; Mesnage *et al.*, 2015) se deben sólo al glifosato, a los adyuvantes presentes en las formulaciones comerciales, o si ambos componentes actúan de manera sinérgica o aditiva.

Dentro de los estándares internacionales del Codex Alimentarius actualizados por última vez en 2006, el glifosato residual y su metabolito, principal, el ácido aminometil-fosfónico (AMPA), son permitidos para consumo humano en una concentración máxima de 5 ppm (Codex Alimentarius, 2016). Evidencia científica ha sugerido toxicidad hepática y renal en ratas, causada por el herbicida en dosis menores a los niveles residuales permitidos (Mesnage *et al.*, 2015) mientras también se han documentado enfermedades neurodegenerativas, cáncer y malformaciones en modelos animales con anfibios y mamíferos (Antonioni *et al.*, 2012; Guyton *et al.*, 2015; Paganelli *et al.*, 2010; Samsel & Seneff, 2013). Con esta evidencia, el glifosato ha sido recientemente reclasificado como

probable carcinogénico en humanos por la Organización Mundial de la Salud (Cuhra, 2015; EFSA, 2015).

En México la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios del gobierno de México (COFEPRIS), incluye al glifosato en su catálogo de hojas de seguridad de sustancias utilizadas como herbicidas o plaguicidas, considerándolo un herbicida con grado IV de toxicidad (ligeramente tóxico), con  $DL_{50}$  (oral en ratas) mayor a 5000 mg/kg, ingesta diaria admisible (IDA) de 0,3 mg/kg (COFEPRIS, 2009). Con respecto a los efectos a la salud por exposición aguda lo clasifica como ligeramente irritante dérmico y oral, y severo irritante de los ojos. Mientras que, en exposición crónica, según la COFEPRIS, no se han encontrado efectos en la salud en los estudios realizados en animales. Es evidente que, con base en la nueva clasificación establecida por la OMS, la información sobre el glifosato debería ser actualizada y aplicada en el país para evitar consecuencias a la salud pública.

El límite máximo residual (LMR) de glifosato en maíz según Salazar y colaboradores, es de 0,1 mg/kg (Salazar & Aldana, 2011). En este estudio se encontraron residuos de glifosato en una de las muestras de botanas en una concentración de 0.17 mg/kg, la cual se encuentra ligeramente por encima del límite máximo residual para maíz sin procesar sugerido por dichos autores.

Sin embargo, en México aún no existe una norma que exija información sobre residuos de glifosato en estos cultivos y tampoco hay límites establecidos sobre residuos en alimentos procesados, por lo que no se puede conocer la cantidad de glifosato que se consumen a través de los alimentos (por ejemplo, las tortillas).

La evidencia de casos clínicos en el sur del continente (p. ej. Argentina, Paraguay) se debe a la exposición a glifosato en zonas agrícolas donde se cultiva maíz y soya GM. En México ya se ha cultivado soya transgénica tolerante a dicho herbicida, precisamente en estados del sureste como Campeche y Yucatán (Milenio Novedades, 2015; Santana, 2016), por lo que de sembrarse maíz transgénico se podrían esperar más problemas a nivel de salud pública debido a que en nuestro país se consumen grandes cantidades de maíz en comparación con otros países, el cual, de acuerdo a los resultados en este estudio se consume a través de productos procesados con potencial presencia de glifosato, su metabolito AMPA, entre otros agrotóxicos.

### **7.3 Regulación y etiquetado de los alimentos que contienen organismos transgénicos.**

En derecho ambiental, el principio precautorio o de cautela es la herramienta más importante, que tiene la bioseguridad para la toma de decisiones y para tratar con niveles altos de incertidumbre; hace posible que el órgano que toma las decisiones, actúe en los casos que no se cuenta con la información científica y técnica suficiente y/o necesaria, o cuando no existe un consenso de los efectos que produciría en el medio ambiente la realización de determinada actividad (González, 2012). El principio de precaución es imprescindible para la toma de decisiones que se relacionan con el medio ambiente y la salud humana, ya que los daños y consecuencias adversas pueden ser irreparables; permite que se tomen medidas y acciones preventivas y se logre finalmente identificar las fuentes de incertidumbre y obtener información relevante para el manejo de riesgos a partir de investigaciones científicas (Pirondini *et al.*, 2010).

Además de considerar de manera preponderante el principio precautorio, el análisis de riesgo debería llevarse a cabo para cada variedad con eventos transgénicos apilados que se libera utilizando técnicas analíticas más detalladas como la proteómica y metabolómica para evaluar si las diferencias entre las variedades transgénicas y las variedades convencionales representan un riesgo toxicológico, nutricional o de alergenicidad (De Schrijver *et al.*, 2007).

Actualmente, en México, no se realiza una evaluación sistemática a nivel gubernamental de los riesgos potenciales de los eventos transgénicos apilados, sino que se autorizan con base en los análisis previos sobre las líneas transgénicas individuales en las que se ha probado su 'seguridad' para el consumo humano (De Schrijver *et al.*, 2007).

Por otro lado, el concepto de equivalencia sustancial, se basa en el concepto de que un alimento convencional, con una historia de uso seguro puede funcionar como un elemento con el cual comparar cuando se está evaluando la seguridad de un nuevo alimento, la seguridad del alimento incluye aspectos nutricionales y toxicológicos (FAO, 1995).

Los análisis realizados por las mismas empresas biotecnológicas o las industrias alimentarias para evaluar la equivalencia sustancial de los alimentos transgénicos se enfoca en la composición en términos de, cantidad de proteína, carbohidratos, vitaminas,

minerales, aminoácidos, ácidos grasos, fibra, cenizas, isoflavonas y lecitinas (Millstone *et al.*, 1999).

Los cultivos transgénicos sí tienen una composición química diferente a sus contrapartes no transgénicas, de otra forma no serían susceptibles de patentarse y, por ejemplo no podrían soportar aplicaciones de glifosato ni tampoco producirían toxinas insecticidas (Millstone *et al.*, 1999). Además, la equivalencia sustancial no considera toxinas y antinutrientes desconocidos, y otros peligros que se pueden generar por la introducción de nuevos genes ya sea en diferentes variables biológicas relevantes: bioquímicas, inmunológicas y toxicológicas (Friends of the Earth, 2003).

En los países que restringen la siembra y/o consumo de los organismos transgénicos se sigue el enfoque de la Unión Europea basado en el principio precautorio; el cual establece que cualquier producto elaborado con, o derivado de algún cultivo transgénico está sujeto a regulación específica y al 'derecho a saber' del consumidor; y es por eso que los productos GM se examinan más rigurosamente que los obtenidos por otros métodos, hasta que no se conozcan todos los riesgos que puede conllevar el uso y consumo de los mismos (Diario Oficial de la Unión Europea, 2002a, 2002b).

Los países menos restrictivos en cuanto a la regulación de OGMs, se basan en la equivalencia sustancial, establecida por los Estados Unidos (Vigani & Olper, 2013).

Debido a que la FDA y la USDA no han establecido ningún requerimiento obligatorio sobre el etiquetado, así como tampoco lo han hecho las autoridades mexicanas, las compañías de alimentos pueden vender alimentos transgénicos sin que los consumidores puedan identificarlos, lo que se contrapone con el principio ético sobre el derecho de los consumidores de saber qué tipo de producto están comprando y de tomar decisiones informadas (Dizon *et al.*, 2016).

Los países en desarrollo como México, tienden a tomar ventaja de la falta de regulación definida, adoptando la llamada estrategia de 'esperar y observar', sin tomar una posición clara sobre la restricción y manteniéndose abiertos tanto al mercado de los Estados Unidos, como al de la Unión Europea; siendo que México depende de la importación de maíz desde Estados Unidos, su posición con respecto a la regulación de los OGMs

permanece inclinada hacia la legislación establecida en dicho país. (Vigani & Olper, 2013).

Al no existir el etiquetado de alimentos transgénicos, los consumidores pierden derechos tan básicos como el de la información, al no conocer cuando un producto está elaborado con cultivos GM, también el derecho a elegir si desea o no consumir un producto basándose en la información de la que dispone (Du, 2014).

En Estados Unidos existe un conocido movimiento denominado 'Just Label It' ('Sólo etiquétenlo') a favor del etiquetado de los alimentos transgénicos o que contienen OGMs. Una de las razones por las que este grupo apoya el etiquetado es por los posibles efectos crónicos que los OGMs podrían causar a la salud, ya que como no se etiquetan los alimentos transgénicos en dicho país, los científicos encuentran muy complicado estudiar los vínculos entre el consumo de estos alimentos y los problemas de salud de la población (Hirshberg, 2013). Según una encuesta realizada por el grupo Mellman, el 88% de los estadounidenses apoyan dicho etiquetado. Los resultados del estudio se basaron en resultados de encuestas previas (National Research Center, 2008; National Research Center, 2014).

En el mismo país, se realizó un estudio con consumidores para evaluar diferentes tipos de etiquetado. La investigación concluyó que la etiqueta evaluada como la más adecuada y con mayor credibilidad así como una mayor intención de compra era la que correspondía a: No-GM, certificado por la FDA que incluía información de contacto que serviría para dirigir a los consumidores hacia mayores detalles sobre el proceso de certificación; un producto con dicha etiqueta se percibía como uno que tiene menores impactos sobre la salud a largo plazo (Roe & Teisl, 2007). Según los autores, estos resultados se justifican por el hecho de que los consumidores estadounidenses consideran a la FDA como más adecuada debido a su papel en la regulación de productos alimentarios y por su capacidad para realizar una revisión científica. Por lo que, en el caso de México, se debería evaluar cuál organismo gubernamental sería el adecuado para regular el etiquetado de los alimentos, así como los costos asociados de implementar el etiquetado.

Para que la información del etiquetado sea comunicada al consumidor esta debe ser adecuada y debe tener credibilidad. (Roe & Teisl, 2007). Los costos relativos de cada tipo de etiqueta dependerían de la prevalencia de productos que contienen OGMs o de los que están libres de ellos y de los requerimientos técnicos de las pruebas de laboratorio y la segregación de los mismos (Roe & Teisl, 2007).

Entre dichos costos se encuentra la trazabilidad, que es un instrumento utilizado por algunos países para garantizar, que en caso de que se produzca cualquier efecto inesperado para la salud y el medio ambiente se pueda retirar eficientemente del mercado algún producto GM de la alimentación humana y animal e involucra a todos los actores de la cadena alimentaria, recolectando la historia, uso y ubicación de un producto por medio de información registrada (Vigani & Olper, 2013). Los agricultores deben cumplir un almacenamiento y cosecha certificados, mientras que los operadores y los minoristas deben mantener la información en la identificación del producto, comunicándola por números de lote. Esta información deberá conservarse durante un período largo (5 años de vigilancia posterior a la comercialización), y debe estar disponible para los solicitantes. Todos estos requisitos inducen un aumento de los gastos para la cadena de producción y suministro (Vigani & Olper, 2013).

Aunque en México existe una comisión de bioseguridad desde hace más de 13 años, con un laboratorio nacional enfocado en la detección de transgenes (CIBIOGEM) y una agencia dedicada a la evaluación de riesgos sanitarios de productos y servicios que se comercializan en México (COFEPRIS), en los sitios de internet de dichas comisiones no existe información disponible sobre la vigilancia y el monitoreo que supuestamente realizan actualmente sobre las variedades de maíz GM autorizadas en el país. Como ya se discutió, COFEPRIS ha autorizado la importación de 68 cultivos transgénicos para consumo humano, basándose únicamente en los análisis de seguridad presentados por las compañías interesadas (COFEPRIS, 2008) sin realizar ninguna prueba de seguridad adicional e independiente que obedezca al contexto agrícola y a los patrones de uso y consumo de maíz y otros cultivos de importancia en México (Bourges, 2013).

#### **7.4 Alternativas a la tecnología transgénica.**

Los grupos étnicos de México son guardianes de la enorme riqueza de germoplasma de los maíces nativos, preservándolos mediante la agricultura tradicional. Las variedades

adaptadas localmente presentan cualidades importantes para la agricultura campesina, tales como alta resistencia a enfermedades y plagas, tolerancia a la sequía y tolerancia al frío o al calor, dependiendo de la región de cultivo. También se encuentran adaptadas a suelos pobres en nutrientes y bajo condiciones de almacenamiento suelen durar más tiempo, tales características son muy apreciadas por los agricultores (Kato *et al.*, 2013). Por otro lado, se han comprobado científicamente diversos beneficios que el consumo de alimentos elaborados con maíces nativos proveen al organismo debido a su alto contenido de fibra, compuestos antioxidantes y antimutagénicos como antocianinas, compuestos fenólicos y carotenoides (Fernández-Suárez *et al.*, 2013).

El agroecosistema milpa produce un gran porcentaje de los alimentos; se ha logrado obtener la misma cantidad de alimento en una hectárea plantada con el sistema de milpa que con maíz en monocultivo (Altieri & Nicholls, 2005). Además, en el sistema de milpa se obtienen niveles más estables de producción total por unidad de área, se asegura un nivel de vida aceptable para los pequeños productores y se garantiza la protección de los suelos, la conservación y el mejoramiento de la biodiversidad debido a que no se utilizan tantos insumos sintéticos que modifican el agroecosistema (Altieri & Nicholls, 2005).

Investigadores especializados en maíz consideran que, en lugar de adoptar la tecnología transgénica, en México deberían crearse programas de mejoramiento genético participativo dentro de un marco de mejoramiento genético evolutivo para adaptar las razas nativas al cambio climático manteniendo a la vez, la misma biodiversidad que las hace resilientes a los flujos ambientales (Sánchez-Aldana, 2010).

Los consumidores mexicanos por el momento tenemos como alternativa para evitar consumir alimentos transgénicos, elegir alimentos frescos y evitar los alimentos industrializados que pueden contener ingredientes transgénicos. Como ejemplo de estos están los productos orgánicos, que respetan al ambiente en su proceso de elaboración y son más sanos y seguros debido a que no contienen agrotóxicos y los productos certificados reconocidos internacionalmente no utilizan transgénicos o derivados de estos; existen también productos de comercio justo que combinan el cuidado del ambiente con el empoderamiento de las comunidades campesinas a través de la repartición equitativa de las ganancias y de la toma de decisiones.



Este tipo de productos se pueden encontrar en los mercados orgánicos, alternativos, agroecológicos, solitarios y otras denominaciones. Para el caso de México, se ha observado una muy rápida evolución en la producción orgánica. En 1996 se tenía una superficie de cultivos orgánicos de 21 mil 265 hectáreas, para el año 2012 llegó a 512 mil 246. Los empleos directos generados por esta producción pasaron de 13 mil 785 a 245 mil (Rudiño, 2016).

Los productos orgánicos son un nicho de mercado emergente tanto en México como en el extranjero; en Estados Unidos, surgió desde 2014 una empresa llamada Masienda, la cual importa maíz nativo de la más alta calidad y de distintas variedades, desde México. Su misión se basa en promover la biodiversidad agrícola, y la sostenibilidad mediante el apoyo a los pequeños agricultores de nuestro país. Dicha empresa tiene como principal cliente restaurantes que ofrecen productos mexicanos, sin embargo, planean ofrecer un catálogo de productos de maíz con valor agregado, como tortilla, masa y botanas ([www.masienda.com](http://www.masienda.com)).

Adicionalmente, países como China han frenado su consumo de maíz GM y se han interesado en el maíz blanco no transgénico producido en México, lo cual ha abierto un nuevo mercado para los productores de Sinaloa, que ya han enviado más de un millón de toneladas de maíz desde 2015 (SAGARPA, 2015d).

A pesar de que México ocupa los primeros lugares en producción agroalimentaria (Grupo Fórmula, 2015), la producción de maíz transgénico en Estados Unidos ya amenaza nuestra seguridad y soberanía alimentaria; al no poder cumplir la demanda interna, México tiene la necesidad de importar más de 11 millones de toneladas de maíz. De seguir permitiéndose la entrada de maíz transgénico para consumo humano y en el supuesto de que se etiquetaran los alimentos GM, se estaría abriendo un nuevo debate sobre la producción de maíz transgénico dentro del territorio nacional, para dejar de importarlo de Estados Unidos. Esto conllevaría un uso intensivo de agroquímicos y un modelo estricto de monocultivo que afecta la fertilidad de los suelos y reduce la biodiversidad; también se estaría vulnerando el derecho al patrimonio común de los mexicanos que representa la siembra del maíz nativo, se perdería el derecho a una alimentación sana e inocua que actualmente provee el maíz nativo mexicano el cual además de estar libre de secuencias transgénicas, proporciona beneficios a la salud (Fernández *et al.*, 2013).

La conservación de las variedades nativas además de poseer un reservorio genético de importancia para enfrentar plagas y el cambio climático (Boege, 2009) el maíz nativo es protagonista de cientos de platillos y preparaciones culinarias que han sido consideradas Patrimonio Cultural Inmaterial de la Humanidad (UNESCO, 2010). De perderse estas variedades por la potencial siembra masiva de variedades de maíz transgénica, se perdería también la cultura que aún podemos hallar en torno al maíz.

En un país donde cerca de 28 millones de personas sufren pobreza alimentaria (Rosas, 2015) y el 70% de la población es obesa o tiene sobrepeso (Forbes, 2015), la solución a estos problemas no está en el fortalecimiento de la agricultura industrial que implica a los cultivos transgénicos, tampoco se necesitan realizar alianzas con las industrias que producen alimentos procesados con alta densidad energética, como se hizo con la Cruzada contra el Hambre del Gobierno Federal (GRAIN, 2015b), sino llevar a cabo estrategias que enfrenten efectivamente el hambre y la desnutrición que se enfoque en la consolidación de programas para el campo que apoyen a los campesinos y los agricultores en pequeña escala, ya que son ellos son los actores que mejor abastecen a las poblaciones rurales y urbanas con alimentos sanos y nutritivos, impulsando también los vinculen con los consumidores.

Este, es el primer estudio formal que hasta esta fecha documenta la presencia, frecuencia y composición de algunos de los eventos transgénicos de maíz más comunes en diversos productos alimentarios altamente consumidos por la población mexicana, que es la mayor consumidora de maíz en el mundo y que diariamente se alimenta de este cultivo principalmente en forma de tortilla, está consumiendo, sin saberlo, cantidades importantes de maíz transgénico y residuos de herbicidas a base de glifosato.

## 8. CONCLUSIONES

- El presente estudio confirma la presencia de maíz transgénico en diversos productos alimentarios elaborados con maíz (tortillas, harinas, tostadas, botanas y cereales) altamente consumidos por la población mexicana.
- Se identificó y cuantificó la presencia de eventos transgénicos en los alimentos elaborados con maíz más consumidos en el país, encontrándose que el 69.5% de las muestras contienen maíz genéticamente modificado con los rasgos de resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas y ambos rasgos de forma simultánea, lo que indica un uso generalizado de estas variedades de maíz en la cadena alimenticia.
- La población urbana mexicana, estimada en 93 millones de personas, sólo tiene acceso, de acuerdo a las muestras aquí analizadas, a alimentos de maíz que contienen maíz genéticamente modificado como componente principal, en porcentajes de 1 a 14%
- Se encontraron residuos del herbicida glifosato en un subgrupo de muestras, hasta donde se conoce, en México no existen límites para la presencia de glifosato en alimentos procesados, pero claramente la presencia de glifosato en los alimentos consumidos ampliamente en el país, representa un riesgo sin precedentes a la población, cuyo alimento base es el maíz.
- Este es el primer trabajo que aporta datos sobre la presencia de maíz transgénico en un gran número de alimentos procesados de consumo masivo en una población, los resultados sugieren que una gran parte de las importaciones de maíz que son parcial o completamente transgénicas están terminando en la cadena alimentaria de maíz en México debido a que los eventos transgénicos de maíz monitoreados en este estudio representan la mayoría de los eventos aprobados por las autoridades sanitarias mexicanas como adecuadas para el consumo humano, que al mismo tiempo coinciden con los eventos aprobados en Estados Unidos y Sudáfrica, desde donde México ha importado maíz.

## Bibliografía

- Abbas, H. K. (2005). Bt corn. In *Aflatoxins and Food Safety* (pp. 464–466). Chicago: CRC Press.
- Abel, S. (2015). Dow AgroSciences Company Petition for Determination of Nonregulated Status of 2, 4-D- and Glufosinate-Resistant DAS-81910-7 Cotton. Retrieved from [https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/13\\_26201p\\_fea.pdf](https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/13_26201p_fea.pdf)
- Agapito-Tenfen, S. Z., Vilperte, V., Benevenuto, R. F., Rover, C. M., Traavik, T. I., & Nodari, R. O. (2014). Effect of stacking insecticidal cry and herbicide tolerance epsps transgenes on transgenic maize proteome. *BMC Plant Biology*, *14*, 346. <http://doi.org/10.1186/s12870-014-0346-8>
- Aguayo-Rojas, J., Mora-Rochín, S., Cuevas-Rodríguez, E. O., Serna-Saldivar, S. O., Gutierrez-Uribe, J. a., Reyes-Moreno, C., & Milán-Carrillo, J. (2012). Phytochemicals and Antioxidant Capacity of Tortillas Obtained after Lime-Cooking Extrusion Process of Whole Pigmented Mexican Maize. *Plant Foods for Human Nutrition*, *67*, 178–185. <http://doi.org/10.1007/s11130-012-0288-y>
- Ahmed, F. E. (2002). Detection of genetically modified organisms in foods. *Trends in Biotechnology*, *20*(5), 215–223.
- Alavez, V., Álvarez-Buylla, et. al. (2013). Las líneas de maíz transgénico disponibles para la agricultura: promesas, hechos y potencial en el contexto de México. In *El maíz en peligro ante los transgénicos*. (p. 61). México, D.F.: UNAM, Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad.
- Altieri, M., & Nicholls, C. (2005). *Agroecology and the Search for a Truly Sustainable Agriculture* (First edit). México, D.F.: United Nations Environment Programme.
- Álvarez-Buylla, E., Piñeyro-Nelson, A., Turrent, A., Wegier, A. (2013). Incertidumbre, riesgos y peligros de la liberación de maíz transgénico en México. In *El maíz en peligro ante los transgénicos*. (p. 111–163.). México, D.F.: UNAM, Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad.
- Álvarez-Buylla E., Carrillo-Truba C., Olivé-León, Piñeyro-Nelson, A. (2013). Introducción. In *El maíz en peligro ante los transgénicos*. (pp. 15–24). México, D.F.: UNAM, Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad.
- America, W. S. S. of. (2012). International survey of herbicide resistant weeds. Retrieved from <http://www.weedscience.org/In.asp>
- Andreassen, M., Rocca, E., Bøhn, T., Wikmark, O.-G., van den Berg, J., Løvik, M., ... Nygaard, U. C. (2014). Humoral and cellular immune responses in mice after airway administration of Bacillus thuringiensis Cry1Ab and MON810 cry1Ab-transgenic maize. *Food and Agricultural Immunology*, *26*(4), 521–537. <http://doi.org/10.1080/09540105.2014.988128>
- Anklam, E., Gadani, F., Heinze, P., Pijnenburg, H., & Van Eede, G. Den. (2002). Analytical methods for detection and determination of genetically modified organisms in agricultural crops and plant-derived food products. *European Food Research and Technology*, *214*(1), 3–26. <http://doi.org/10.1007/s002170100415>
- Antoniou, M., Brack, P., Carrasco, A., Fagan, J., Kageyama, P., & Leifert, C. (2010). GM SOY Sustainable? Responsible? *GLS Bank*. Bochum, Germany: GLS Bank. Retrieved from [www.gls.de](http://www.gls.de)
- Antoniou, M., Habib, M., Howard, C., Jennings, R., Leifert, C., Nodari, R., ... Fagan, J. (2012). Teratogenic Effects of Glyphosate-Based Herbicides: Divergence of Regulatory Decisions from Scientific Evidence. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, *54*(6), 1–13.

<http://doi.org/10.4172/2161-0525.S4-006>

- Arbuckle, T. E., Lin, Z., & Mery, L. S. (2001). An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environmental Health Perspectives*, 109(8), 851–857. <http://doi.org/10.1289/ehp.01109851>
- Arleo, M. (2015). *Detección y cuantificación de Organismos Genéticamente Modificados en cultivos de maíz y alimentos derivados, mediante análisis molecular*. Universidad de la República, Montevideo.
- ARS-USDA, CIMMYT, Pioneer Hi-Bred International Inc., U. A. L. M. (Perú). (1991). *Final Report 1991. LAMP, Latin American Maize Programme*. Lima, Peru.
- Arumuganathan, K., & Earle, E. (1991). Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9(3), 208–218. <http://doi.org/10.1007/BF02672016>
- ASERCA. (2015). Informe de resultados al primer trimestre 2015. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Balbuena, M., Tison, L. (2015). Effects of sublethal doses of glyphosate on honeybee navigation. *Journal of Experimental Biology*, (218), 2799–2805. Retrieved from <http://jeb.biologists.org/content/218/17/2799.article-info>
- Banco Mundial. (2005). *La pobreza rural en México*. Retrieved from [http://siteresources.worldbank.org/INTMEXICO/Resources/La\\_Pobreza\\_Rural\\_en\\_Mexico.pdf](http://siteresources.worldbank.org/INTMEXICO/Resources/La_Pobreza_Rural_en_Mexico.pdf)
- Bannert, M. (2006). Simulation of transgenic pollen dispersal by use of different grain colour maize. Diss. ETH No. 16508. *Institute of Plant Sciences Group Agronomy and Plant Breeding, PhD(16508)*, 92. <http://doi.org/doi:10.3929/ethz-a-005219771>
- Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Mbongolo-Mbella, G., Roosens, N., Sneyers, M., Leunda-Casi, A., & Van den Bulcke, M. (2010). SYBR® Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products. *European Food Research and Technology*, 230(3), 383–393.
- Barbau-Piednoir, E., Stragier, P., Roosens, N., Mazzara, M., Savini, C., Van den Eede, G., & Van den Bulcke, M. (2014). Inter-laboratory Testing of GMO Detection by Combinatory SYBR® Green PCR Screening (CoSYPS). *Food Analytical Methods*, 1–10.
- Barbau-Piednoir, E., Lievens, A., Mbongolo-Mbella, G., Roosens, N., Sneyers, M., Leunda-Casi, A., & Van den Bulcke, M. (2009). SYBR® Green qPCR screening methods for the presence of “35S promoter” and “NOS terminator” elements in food and feed products. *European Food Research and Technology*, 230(3), 383–393. <http://doi.org/10.1007/s00217-009-1170-5>
- Bauer-Panskus, Andreas, Hamberger Sylvia, Schumm, Mirjam, Then, C. (2015). *Testbiotech: Escape of genetically engineered organisms and unintentional transboundary movements: Overview of recent and upcoming cases and the new risks form SynBio organisms*. Munich: Testbiotech. Retrieved from [www.testbiotech.org](http://www.testbiotech.org)
- Bauer-Panskus, A., Hamberger, S., & Then, C. (2013). *Transgene escape. Global atlas of uncontrolled spread of genetically engineered plants*. Munich: Testbiotech. Retrieved from [www.testbiotech.org](http://www.testbiotech.org)
- Beadle, G. W. (1980). The ancestry of corn. *Scientific American*. <http://doi.org/10.1038/scientificamerican0180-112>
- Bellon, M. R., Berthaud, J., Agropolis, A., & B, F. J. (2004). Agricultural Ethics Transgenic Maize and the Evolution of Landrace Diversity in Mexico . The Importance of Farmers ’ Behavior. *Society*, 134(March), 883–888. <http://doi.org/10.1104/pp.103.038331.relatives>.

- Benachour, N., & Séralini, G. (2009). Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22(1), 97–105. <http://doi.org/10.1021/tx800218n>
- Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C., & Séralini, G. E. (2007). Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53(1), 126–133. <http://doi.org/10.1007/s00244-006-0154-8>
- Benbrook, C. M. (2012). Impacts of genetically engineered crops on pesticide use in the U.S. -- the first sixteen years. *Environmental Sciences Europe*, 24(1), 24. <http://doi.org/10.1186/2190-4715-24-24>
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe*, 28(3), 1–42. <http://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Benedetti, A. L., Vituri, C. D. L., Trentin, A. G., Domingues, M. A. C., & Alvarez-Silva, M. (2004). The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. *Toxicology Letters*, 153(2), 227–232. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.008>
- Benítez-Leite, S., Macchi, M., & Acosta, M. (2009). Malformaciones Congénitas Asociadas a Agrotóxicos. *Revista Chilena de Pediatría*, 80(4), 111–121. <http://doi.org/10.4067/S0370-41062009000400010>
- Bennetzen, J. (2009). *Handbook of Maize: Its Biology*. (J. L. Bennetzen & S. C. Hake, Eds.). New York, NY: Springer New York. <http://doi.org/10.1007/978-0-387-79418-1>
- Bernards ML, Crespo RJ, Kruger GR, Gaussoin R, T. P. (2012). A waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) population resistant to 2,4-D. *Weed Sci*, (60), 379–384.
- Bernstein, I. L., Bernstein, J. A., Miller, M., Tierzieva, S., Bernstein, D. I., Lummus, Z., ... Seligy, V. L. (1999). Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 107(7), 575–582. <http://doi.org/10.1289/ehp.99107575>
- Bertheau, Y. (2012). *Genetically Modified and Non-Genetically Modified Food Supply Chains: Co-Existence and Traceability*. (F. Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Ed.). Oxford.
- BfR. (2014). The BfR (German Federal Agency) has finalised its draft report for the re-evaluation of glyphosate. Retrieved from <http://www.bfr.bund.de/en/>
- Blake, M. (2005). Dating the Initial Spread of *Zea mays*. In *Genetic Analysis*. Vancouver, British Columbia.
- Boege, E. (2009, March). Centros de origen, pueblos indígenas y diversificación del maíz. *Ciencias*, 92–93, 18–28.
- Bøhn, T. (2014). How “extreme levels” of Roundup in food became the industry norm. Retrieved March 28, 2016, from <https://www.independentsciencenews.org/news/how-extreme-levels-of-roundup-in-food-became-the-industry-norm/>
- Bourges, H. (2013). El maíz: su importancia en la alimentación de la población mexicana. In *El maíz en peligro ante los transgénicos*. (Primera ed, pp. 231–248). México, D.F.: UNAM, Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad.
- Bradshaw LD, Padgett SR, Kimball SL, W. B. (1997). Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Tech*, (11), 189–198.
- Brändli, D., & Reinacher, S. (2012). Herbicides found in Human Urine. *Ithaka Journal Viticulture Ecology Climate-Farming*, 1, 270–272. Retrieved from <http://www.ithaka-journal.net/druckversionen/e052012-herbicides-urine.pdf>

- Brown, W. L. and M. M. G. . (1977). Races of corn. *American Society of Agronomy, Inc.*, (18), 49–88.
- Burgeff, C., Huerta, E., Acevedo, F., & Sarukh??n, J. (2014). How much can GMO and Non-GMO cultivars coexist in a megadiverse country? *AgBioForum*, 17(1), 90–101.
- Carrière, Y., Crickmore, N., & Tabashnik, B. E. (2015). Optimizing pyramided transgenic Bt crops for sustainable pest management. *Nature Biotechnology*, 33(2), 161–168.  
<http://doi.org/10.1038/nbt.3099>
- Casabe, N., Piola, L., Fuchs, J., Oneto, M. L., Pamparato, L., Basack, S., ... Kesten, E. (2007). Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments*, 7(4), 232–239. <http://doi.org/10.1065/jss2007.04.224>
- CEC. (2004). *The Effects of Transgenic Maize in Mexico. Maize & Biodiversity*. Québec: Commission for Environmental Cooperation. Retrieved from <http://www3.cec.org/islandora/en/item/2152-maize-and-biodiversity-effects-transgenic-maize-in-mexico-key-findings-and-en.pdf>
- CEN, E. C. for S. (2005). ISO 21571. Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction. Retrieved from [www.iso.org](http://www.iso.org)
- CEN European Comitee for Standarization. (2005). ISO 21570. Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Quantitative nucleic acid based methods. Geneva: International Organization for Standarizaton. Retrieved from [www.iso.org](http://www.iso.org)
- Center, N. R. (2008). *Food-Labeling Poll 2008*. Retrieved from <http://4bgr3aepis44c9bxt1ulxsyq.wpengine.netdna-cdn.com/wp-content/uploads/2015/02/foodpoll2008.pdf>
- CERA. (2015). GM Crop Database, Center for Environmental Risk Assessment. Retrieved from <http://www.cera-gmc.org/GMCropDatabase>
- Chang, F., Simcik, M. F., & Capel, P. D. (2011). Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 30(3), 548–55. <http://doi.org/10.1002/etc.431>
- Chen, J., Hua, G., Jurat-Fuentes, J. L., Abdullah, M. A., & Adang, M. J. (2007). Synergism of Bacillus thuringiensis toxins by a fragment of a toxin-binding cadherin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(35), 13901–6.  
<http://doi.org/10.1073/pnas.0706011104>
- CNNExpansión. (2016). Juez autoriza sembrar maíz transgénico en México. CNN. Retrieved from <http://cnnespanol.cnn.com/2016/03/14/juez-autoriza-sembrar-maiz-transgenico-en-mexico/>
- Co-Extra, E. C. (2006). *GM and non-GM supply chains: thie CO-EXistence and TRAceability: Review on the world wide authorization of gene stacked GMOs in relation to cGS and wGS and the basis for definition of corresponding unique genetic markers*. Retrieved from <http://www.coextra.eu/deliverables/deliverable1215.pdf>
- COFEPRIS. (2008). Procedimiento de Evaluación de Inocuidad de Organismos Genéticamente Modificados destinados al uso o consumo humano, procesamiento de alimentos, biorremediación y salud pública. Retrieved from [http://conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/sistema\\_nacional/registro/protocolo\\_evaluacion\\_riesgo\\_ogms3.pdf](http://conacyt.gob.mx/cibiogem/images/cibiogem/sistema_nacional/registro/protocolo_evaluacion_riesgo_ogms3.pdf)
- COFEPRIS. (2009). Hoja de Datos Glifosato. Retrieved from [http://www.cofepris.gob.mx/CAS/establecimientos\\_y\\_productos](http://www.cofepris.gob.mx/CAS/establecimientos_y_productos)

- COFEPRIS. (2015). Lista de evaluación de inocuidad caso por caso de los OGMs. Retrieved from <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/OGMS/Lista.aspx>
- Comission, E. (2015). No Title. Retrieved from [http://ec.europa.eu/dgs/health\\_food-safety/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/index_en.htm)
- Comm-, E., Food, E., Authority, S., Food, U. N., Organisation, A., Additives, F., ... Sweet, J. (2008). Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food and Chemical Toxicology*, 46(SUPPL. 1). <http://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.008>
- Compass, G. (2015). Glossary. Retrieved from <http://www.gmo-compass.org/eng/glossary/>
- CONABIO. (2012). Razas de maíz en México. Retrieved May 27, 2016, from <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maices/razas2012.html>
- CONABIO. (2015). Centros de origen y diversificación. Retrieved May 27, 2016, from <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/centrosOrigen/centrosOrig.html>
- CONABIO-INE-INIFAP. (2011). *Proyecto Global de Maíces Nativos: Informe de gestión. Primera versión*. Retrieved from [http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/InformedeGestion\\_V1.pdf](http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/InformedeGestion_V1.pdf)
- Cooper, G. (2000). The Development and Causes of Cancer. Available from: In *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
- Cottenet, G., Blancpain, C., Sonnard, V., & Chuah, P. F. (2013). Development and validation of a multiplex real-time PCR method to simultaneously detect 47 targets for the identification of genetically modified organisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(21), 6831–6844.
- Cruz, M. S., Gómez, M. M., Ortiz, M. E., Entzana, a. M., Suárez, C. Y., & Santillán, V. (2012). Situación actual y perspectivas del maíz en México 1996-2012., 130.
- Cuhra, M. (2015). Glyphosate nontoxicity: the genesis of a scientific fact. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 15(May), 89–96. <http://doi.org/10.4024/08CU15A.jbpc.15.03>
- Cuhra, M., Bøhn, T., & Cuhra, P. (2016). Glyphosate: Too Much of a Good Thing? *Frontiers in Environmental Science*, 4(April), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fenvs.2016.00028>
- DAFF. (2013). GMO Permits 2013. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries. Republic of South Africa. Retrieved from [http://www.nda.agric.za/doaDev/sideMenu/biosafety/doc/GMO permits - 2013\(no marker\).pdf](http://www.nda.agric.za/doaDev/sideMenu/biosafety/doc/GMO%20permits%202013(no%20marker).pdf)
- De Liz Oliveira, V. L., Cattani, D., Heinz Rieg, C. E., Pierozan, P., Zanatta, L., Benedetti Parisotto, E., ... Zamoner, A. (2013). Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 335–346. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.043>
- De Roos, A. J., Blair, A., Rusiecki, J. A., Hoppin, J. A., Svec, M., Dosemeci, M., ... Alavanja, M. C. (2005). Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives*, 113(1), 49–54. <http://doi.org/10.1289/ehp.7340>
- De Schrijver, A., Devos, Y., Van den Bulcke, M., Cadot, P., De Loose, M., Reheul, D., & Sneyers, M. (2007). Risk assessment of GM stacked events obtained from crosses between GM events. *Trends in Food Science and Technology*, 18(2), 101–109. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.09.002>



- de Vendômois, J. S., Roullier, F., Cellier, D., & Séralini, G. E. (2009). A comparison of the effects of three GM corn varieties on mammalian health. *International Journal of Biological Sciences*, 5(7), 706–726. <http://doi.org/10.7150/ijbs.5.706>
- De Wolf, J., Duchateau, L., Verbeke, G., & Schrevels, E. (2010). Discovering transgenic elite events: Using information from early screening trials for improving experimental design. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 15(3), 403–415. <http://doi.org/10.1007/s13253-010-0022-x>
- Dell, R. B. (2000). Use of Animals in Scientific Research, Education and Testing. *Loss, Grief & Care*, 8(3–4), 37–40. [http://doi.org/10.1300/J132v08n03\\_08](http://doi.org/10.1300/J132v08n03_08)
- Devos, Y, Meihls, L, Hibbard, B. (2013). *Resistance evolution to the first generation of genetically modified Diabrotica -active Bt -maize events by western corn rootworm : management and monitoring considerations*. Parma, Italy. <http://doi.org/10.1007/s11248-012-9657-4>
- Dizon, F., Costa, S., Rock, C., Harris, A., Husk, C., & Mei, J. (2016). Genetically Modified ( GM ) Foods and Ethical Eating, 81(2). <http://doi.org/10.1111/1750-3841.13191>
- Doebley, J. (1990). Molecular evidence and the evolution of maize. *Econ. Bot.*, 44(SUPPL.), 6–27.
- Domingo, J. L. (2016). Safety assessment of GM plants: An updated review of the scientific literature. *Food and Chemical Toxicology*, 95, 12–18. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.013>
- Doolittle, W.E., & Mabry, O. B. (2006). Environmental Mosaics, Agricultural Diversity, and the Evolutionary Adoption of Maize. In *Histories of maize: Multidisciplinary approaches to the prehistory, linguistics, biogeography, domestication, and evolution of maize*. (p. 109). Oxford: Elsevier Inc. Retrieved from <http://shell.cas.usf.edu/~rtykot/Histories of Maize TOC and Intro.pdf>
- DOUE. (2003a). Reglamento (CE) N° 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. Diario Oficial de la Unión Europea. Retrieved from [http://www.uclm.es/Actividades/repositorio/pdf/doc\\_3082\\_3607.pdf](http://www.uclm.es/Actividades/repositorio/pdf/doc_3082_3607.pdf)
- DOUE. (2003b). REGLAMENTO (CE) No 1830/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de septiembre de 2003 relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos. Diario Oficial de la Unión Europea. Retrieved from <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Publicaciones/CDs2006/CDBioseg/pdf/UE04.pdf>
- Doyle J. J., D. J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem*, (19), 11–15.
- Du, L. (2014). GMO Labelling and the Consumer’s Right to Know: A Comparative Review of the Legal Bases for the Consumer’s Right to Genetically Modified Food Labelling. *McGill Journal of Law and Health*, 1–42.
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2009). Glyphosate-resistant crops and weeds: Now and in the future. *AgBioForum*, 12(3–4), 346–357.
- Dutt, M., Dhekney, S. a, Soriano, L., Kandel, R., & Grosser, J. W. (2014). Temporal and spatial control of gene expression in horticultural crops. *Horticulture Research*, 1(August), 14047. <http://doi.org/10.1038/hortres.2014.47>
- Dyer, G. A., Serratos-Hernández, J. A., Perales, H. R., Gepts, P., Piñeyro-Nelson, A., Chávez, A., ... Alvarez-Buylla, E. R. (2009). Dispersal of transgenes through maize seed systems in Mexico. *PLoS ONE*, 4(5),

e5734. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005734>

- Economía, S. de. (2013). *Alimentos Procesados*. México, D.F. Retrieved from <http://embamex.sre.gob.mx/rusia/images/stories/Comercio/procesadospromexico.pdf>
- EFSA. (2015). EFSA explains the carcinogenicity assessment of glyphosate, 2008(1272), 1–6. Retrieved from [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/4302\\_glyphosate\\_complementary.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/4302_glyphosate_complementary.pdf)
- Ellstrand, N. C. (2003a). *Dangerous liaisons?: when cultivated plants mate with their wild relatives*. Chicago: JHU Press.
- Ellstrand, N. C. (2003b). Going to “Great Lengths” to Prevent the Escape of Genes That Produce Specialty Chemicals. *Plant Physiology*, 132(August), 1770–1774. <http://doi.org/Doi 10.1104/Pp.103.025908>
- Eriksson, M., Hardell, L., Carlberg, M., & Akerman, M. (2008). Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *International Journal of Cancer*, 123(7), 1657–1663. <http://doi.org/10.1002/ijc.23589>
- Ermini, A. N. G., Anetti, A. L. Z., Alati, C. L. S., Ossi, S. T. R., Chmid, S. E. S., & Archelli, R. O. M. (2004). Development of a Seven-Target Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of Transgenic Soybean and Maize in Feeds and Foods.
- Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2003). Agrobacterium tumefaciens as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), 380–386. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00162-6](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00162-6)
- Esteva, G. (2003). Los árboles de las culturas mexicanas. In *Sin Maíz No Hay País*. (pp. 17–28). México, D.F.: Consejo Nacional para la Cultura y las Artes.
- Estrada, B. C., Vidal, V. A., Cruz, B., & Cruz, C. (2010). Aptitud combinatoria general y específica del contenido de azúcares en maíces criollos eloteros. *Rev. Fitotec. Mex.*, 33(4), 57–61.
- ETC Group. (2014). *With Climate Chaos , Who Will Feed Us ? The Industrial Food Chain or The Peasant Food Web?* Action Group on Erosion, Technology and Concentration. Retrieved from [www.etcgroup.org](http://www.etcgroup.org)
- Ezcurra, E., Ortiz, S., Soberon Mainero, J. (2001). Evidence of gene flow from transgenic maize to local varieties in Mexico. *LMOs and the Environment: Proceedings of an International Conference, OECD, Durham, North Carolina*, 289–295.
- FAO. (1995). Application of the principles of substantial equivalence to the safety evaluations of foods or food components from plants derived by modern biotechnology. Retrieved from [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58909/1/WHO\\_FNU\\_FOS\\_95.1.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58909/1/WHO_FNU_FOS_95.1.pdf)
- FAO. (2011). Preocupa aumento del precio del maíz blanco en Centroamérica y México. Retrieved January 20, 2016, from <http://www.fao.org/americas/noticias/ver/es/c/229453/>
- FAO. (2013). *Food wastage footprint. Impacts on natural resources. Summary Report. Food wastage footprint Impacts on natural resources*. FAO. <http://doi.org/ISBN 978-92-5-107752-8>
- FAO. (2016). Pesticides Database Search. Retrieved from [http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/commodities-detail/en/?lang=en&c\\_id=156](http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/commodities-detail/en/?lang=en&c_id=156)
- Federici, V. (2010). Genetically Modified Food and Informed Consumer Choice: Comparing U.S. and E.U. Labeling Laws. *International Law*, 2(35), 515–561.
- Fedoroff, N. V. (1993). Barbara McClintock. *Evolucion Biologica Bogota*, 7(0), 1–19. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90088-0](http://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90088-0)

- Fernandez-Cornejo, J. (2013). Recent trends in GE adoption. *Adoption of Genetically Engineered Crops in the U.S.* Retrieved from <http://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-us/recent-trends-in-ge-adoption.aspx#.U5DFkvldUbl>
- Fernández-Suárez, R., Morales-Chávez, L. A., & Gálvez-Mariscal, A. (2013). Importance of Mexican Maize Landraces in the National Diet. an Essential Review. *Rev. Fitotec. Mex.*, 36(3–A), 275–283.
- Fernandez, M. R., Zentner, R. P., Basnyat, P., Gehl, D., Selles, F., & Huber, D. (2009). Glyphosate associations with cereal diseases caused by *Fusarium* spp. in the Canadian Prairies. *European Journal of Agronomy*, 31(3), 133–143. <http://doi.org/10.1016/j.eja.2009.07.003>
- Filipecki, M., & Malepszy, S. (2006). Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *Journal of Applied Genetics*, 47(4), 277–286. <http://doi.org/10.1007/BF03194637>
- Flores, Y. A. C., Herrera, R. R., Aguilar, C. N., Carlos, J., & Esquivel, C. (2007). Nuevos métodos para la detección de residuos de organismos genéticamente modificados en alimentos basados en el ADN. *BioTecnología*, 11(236), 28–36. Retrieved from [http://www.smbb.com.mx/revista/Revista\\_2007\\_2/Alimentos\\_ADN.pdf](http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2007_2/Alimentos_ADN.pdf)
- FOEE. (2013a). *Human contamination by glyphosate*. Brussels. Retrieved from [www.foeeurope.org](http://www.foeeurope.org)
- FOEE. (2013b). *The environmental impacts of glyphosate*. Brussels: Friends of the Earth Europe. Retrieved from [www.foeeurope.org](http://www.foeeurope.org)
- Forbes. (2013, November 14). Maíz transgénico deberá esperar nueva oportunidad en México. México, D.F. Retrieved from <http://www.forbes.com.mx/maiz-transgenico-debera-esperar-nueva-oportunidad-en-mexico/>
- Forbes. (2015, February 13). Obesidad, un problema 5,500 mdd para México. México, D.F. Retrieved from <http://www.forbes.com.mx/obesidad-un-problema-de-5500-mdd-para-mexico/#gs.bhiYSYA>
- Fórmula, G. (2015, January 14). México entre 10 principales países en producción de alimentos, según la CNC. México, D.F. Retrieved from <http://www.radioformula.com.mx/notas.asp?Idn=471029&idFC=2015>
- Frayssinet, F. (2015). Campaign Against Glyphosate Steps Up in Latin America. Buenos Aires: Inter Press Service. Retrieved from <http://www.globalissues.org/news/2015/04/28/20928>
- Friends of the Earth. (2003). *Briefing: Genetically modified crops and food*. London. Retrieved from [www.foe.co.uk](http://www.foe.co.uk)
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M., & Schönbrunn, E. (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13010–13015. <http://doi.org/10.1073/pnas.0603638103>
- Futuyma, D. J. (2009). Evolution. *Integrative and Comparative Biology*, 49(6), 711–723.
- Gab-Alla, A. A. (2012). Morphological and Biochemical Changes in Male Rats Fed on Genetically Modified Corn (Ajeeb YG). *Journal of American Science*, 8(9), 1117–1123.
- Gaines, T. A., Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S. T., Shaner, D. L., ... Leach, J. E., Westra, P. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(3), 1029–1034. <http://doi.org/10.1073/pnas.0906649107>
- García-Urigüen, P. (2012). *La alimentación de los mexicanos. Cambios sociales y económicos, y su impacto en los hábitos alimenticios*. (Primera Ed). México, D.F.: Cámara Nacional de la Industria de Transformación.

- García, J. A., & Ramírez, R. (2014). El mercado de la semilla mejorada de maíz (*Zea mays* L.) en México. Un análisis del saldo comercial por entidad federativa. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 37(1), 69–77.
- Garry, V. F., Harkins, M. E., Erickson, L. L., Long-Simpson, L. K., Holland, S. E., & Burroughs, B. L. (2002). Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. *Environmental Health Perspectives*, 110 Suppl(April), 441–9. <http://doi.org/10.1289/ehp.02110s3441>
- Gasparic, M. B., Tengs, T., La Paz, J. L., Holst-Jensen, A., Pla, M., Esteve, T. & Gruden, K. (2010). Comparison of nine different real-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 2023–2029.
- Gassmann, A. J., Petzold-Maxwell, J. L., Clifton, E. H., Dunbar, M. W., Hoffmann, A. M., Ingber, D. A., & Keweshan, R. S. (2014). Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(14), 5141–5146. <http://doi.org/10.1073/pnas.1317179111>
- Gillam, C. (2013). Why doesn't the USDA test for residues on food from Monsanto's Cancer Causing Glyphosate. *EcoWatch*. 14. Retrieved from <http://ecowatch.com/2016/01/14/food-residue-monsanto-glyphosate/>
- Glöckner, G., & Séralini, G.-éric. (2016). Pathology reports on the first cows fed with Bt176 maize ( 1997 – 2002 ). *Scholarly Journal of Agricultural Science*, 6(January), 1–8.
- González, O. (2012). *El principio precautorio o de cautela y los cultivos genéticamente modificados dentro del marco jurídico nacional*. Facultad de Estudios Superiores Acatlán.
- GRAIN. (2013). *GMOs: Fooling, "feeding" the world for 20 years*. Barcelona. Retrieved from [www.grain.org](http://www.grain.org)
- GRAIN. (2015a). *Las leyes de semillas que criminalizan campesinas y campesinos: resistencias y luchas*. Barcelona. Retrieved from [www.viacampesina.org](http://www.viacampesina.org)
- GRAIN. (2015b, February). Libre comercio y la epidemia de comida chatarra en México. *A Contrapelo*, 2–9. Retrieved from [www.grain.org/article/categories/13-a-contrapelo](http://www.grain.org/article/categories/13-a-contrapelo)
- Grassini, P., & Cassman, K. G. (2012). High-yield maize with large net energy yield and small global warming intensity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), 1074–9. <http://doi.org/10.1073/pnas.1116364109>
- Greenpeace. (2009, March 7). Calderón entrega maíz a monopolios. *Greenpeace México*. México, D.F. Retrieved from [http://www.greenpeace.org/mexico/es/Noticias/2009/Marzo/maiz\\_monopolios/](http://www.greenpeace.org/mexico/es/Noticias/2009/Marzo/maiz_monopolios/)
- Greenpeace. (2015a). Mapa de cultivos transgénicos en España. Retrieved from <http://www.greenpeace.org/espana/es/Trabajamos-en/Transgenicos/mapa-de-espana/>
- Greenpeace. (2015b). Twenty Years of Failure: Why GM crops have failed to deliver on their promises, (November). Retrieved from <http://www.greenpeace.org/international/en/publications/Campaign-reports/Agriculture/Twenty-Years-of-Failure/>
- Griffiths, K., Partis, M. L., & Croan, D. (2002). *Review of Technologies for Detecting Genetically Modified Materials in Commodities and Food*. Retrieved from [www.foodstandards.gov.au](http://www.foodstandards.gov.au)
- Gurian-Sherman, D. (2009). *Failure to Yield, Evaluating the Performance of Genetically Engineered Crops. Union of concerned Scientists report*. Cambridge, MA. Retrieved from [www.ucsusa.org](http://www.ucsusa.org)
- Gurian-Sherman, D., & Mellon, M. (2013). *The Rise of Superweeds — and What to Do About It*. Union of

*Concerned Scientists*. Retrieved from [www.ucsusa.org/superweeds](http://www.ucsusa.org/superweeds)

- Gutierrez-López, M. (2015). Resultados de la red de ensayos de variedades de maíz y girasol en Aragón. Campaña 2014. *Informaciones Técnicas*.
- Gutierrez, A. P., Ponti, L., Herren, H. R., Baumgärtner, J., & Kenmore, P. E. (2015). Deconstructing Indian cotton: weather, yields, and suicides. *Environmental Sciences Europe*, 27(1), 12. <http://doi.org/10.1186/s12302-015-0043-8>
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., ... Zeise, L. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet Oncology*, 16(5), 490–491. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)
- Haberer, G., Young, S., Bharti, A. K., Gundlach, H., Raymond, C., Fuks, G., ... Messing, J. (2005). Structure and architecture of the maize genome. *Plant Physiology*, 139(4), 1612–24. <http://doi.org/10.1104/pp.105.068718>
- Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., ... Shirai, T. (2001). Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Letters*, 171(1), 17–25. [http://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00510-9](http://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00510-9)
- Hakim, D. (2016). Uncertain Harvest: Doubts About the Promised Bounty of Genetically Modified Crops. *The New York Times*. London. Retrieved from [http://www.nytimes.com/2016/10/30/business/gmo-promise-falls-short.html?\\_r=0](http://www.nytimes.com/2016/10/30/business/gmo-promise-falls-short.html?_r=0)
- Hanley, S., Edwards, D., Stevenson, D., Haines, S., Hegarty, M., Schuch, W., & Edwards, K. J. (2000). Identification of transposon-tagged genes by the random sequencing of Mutator-tagged DNA fragments from *Zea mays*. *The Plant Journal*, 22(4), 557–556. <http://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00830.x>
- Harlan, J. R. y J. M. J. de W. (1971). Toward a rational classification of cultivated plants. *Taxon*, 20(4), 509–517.
- Hawkes, C., Chopra, M., & Friel, S. (2009). Globalization, Trade, and the Nutrition Transition. *Globalization and Health: Pathways, Evidence and Policy*, 92, 235–62. <http://doi.org/10.1038/ejcn.2011.135>
- Herbert, L. H., Vazquez, D. E., Arenas, A., & Farina, W. M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *The Journal of Experimental Biology*, (217), 3457–3464. <http://doi.org/10.1242/jeb.109520>
- Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Esteve, T., Prat, S., & Pla, M. (2003). Development of melting temperature-based SYBR Green I polymerase chain reaction methods for multiplex genetically modified organism detection. *Analytical Biochemistry*, 323(2), 164–170.
- Hernandez, M., Duplan, M. N., Berthier, G., Vaitilingom, M., Hauser, W., Freyer, R., ... Bertheau, Y. (2004). Development and comparison of four real-time polymerase chain reaction systems for specific detection and quantification of *Zea mays* L. *J Agric. Food Chem.*, 52(15), 4632–4637.
- Hiei, Y., Ishida, Y., & Komari, T. (2014). Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science*, 5(November), 1–8. <http://doi.org/10.3389/fpls.2014.00628>
- Hilbeck, A., McMillan, J. M., Meier, M., Humbel, A., Schläpfer-Miller, J., & Trtikova, M. (2012). A

- controversy re-visited: Is the coccinellid *Adalia bipunctata* adversely affected by Bt toxins? *Environmental Sciences Europe*, 24(1), 10. <http://doi.org/10.1186/2190-4715-24-10>
- Hilbeck, A., Meier, M. S., & Raps, A. (2000). *Review on Non-Target Organisms and Bt-Plants*. Zurich. Retrieved from <http://www.greenpeace.org/international/Global/international/planet-2/report/2000/3/review-on-non-target-organisms.pdf>
- Hilbeck, A., & Otto, M. (2015). Specificity and Combinatorial Effects of *Bacillus Thuringiensis* Cry Toxins in the Context of GMO Environmental Risk Assessment. *Frontiers in Environmental Science*, 3(November), 1–18. <http://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00071>
- Hirshberg, G. (2013). Why Labeling Makes Sense. Retrieved from <http://www.justlabelit.org/right-to-know-center/why-labeling-makes-sense/>
- Ho, Mae-Wan; Ryan, Angela; Cummins, J. (1999). Cauliflower Mosaic Viral Promoter - A Recipe for Disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11, 194–197. <http://doi.org/10.1080/08910609908540827>
- Holden, M. J., Levine, M., Scholdberg, T., Haynes, R. J., & Jenkins, G. R. (2010). The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 2175–2187. <http://doi.org/10.1007/s00216-009-3186-x>
- Holst-Jensen, A., De Loose, M., & Van Den Eede, G. (2006). Coherence between legal requirements and approaches for detection of genetically modified organisms (GMOs) and their derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2799–2809. <http://doi.org/10.1021/jf052849a>
- Höss, S., Menzel, R., Gessler, F., Nguyen, H. T., Jehle, J. A., & Traunspurger, W. (2013). Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins) produced by genetically modified maize (Bt maize) on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 178, 147–51. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.002>
- Huber, I., Block, A., Sebah, D., Debode, F., Morisset, D., Grohmann, L. & Busch, U. (2013). Development and validation of duplex, triplex, and pentaplex real-time PCR screening assays for the detection of genetically modified organisms in food and feed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(43), 10293–10301.
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M., & Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*. A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31–50. <http://doi.org/10.4161/bbug.1.1.10519>
- IHCP. (2010). GMO testing requirements and approaches world-wide. Ispra, Italy: Institute for Health and Consumer Protection, European Commission. Retrieved from [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/docsworkshops/Croatia\\_29\\_30\\_Sep\\_2010/GMO\\_testing\\_requirements\\_VandenEede\\_Croatia.pdf](http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/docsworkshops/Croatia_29_30_Sep_2010/GMO_testing_requirements_VandenEede_Croatia.pdf)
- INEGI. (2010). Población rural y urbana. Retrieved March 7, 2016, from [http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/rur\\_urb.aspx?tema=P](http://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/rur_urb.aspx?tema=P)
- International Agency for Research on Cancer/World Health Organization. (2015). *IARC Monographs Volume 112 : evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides*. IARC Monographs (Vol. 112). Lyon, France.
- ISAAA. (2015a). Climate Change and its Effect in Agriculture. Retrieved June 14, 2016, from <http://www.isaaa.org/>
- ISAAA. (2015b). GM Approval database. Retrieved from <http://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp>

- Iversen, M., Grønsberg, I. M., van den Berg, J., Fischer, K., Aheto, D. W., & Bøhn, T. (2014). Detection of transgenes in local maize varieties of small-scale farmers in eastern cape, South Africa. *PLoS One*, *9*(12), 1–19. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0116147>
- JRC. (2011). *Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods. European Network of GMO Laboratories*. Italy. <http://doi.org/10.2788/88038>
- Jugend, B. F. G. F. U. (2007). *Risk Assessment of “stacked events.” Bundesministerium für Gesundheit*. Wien. Retrieved from [www.bmgfj.gv.at](http://www.bmgfj.gv.at)
- Kato, A., Ortega, P.R., Boege, E., Wegier, A., Serratos, H., Alavez, V., Jardón, B., Moyers, L., Ortega, D. (2013). El maíz, aspectos biológicos: Sistemas agrícolas tradicionales con Maíz. In *El maíz en peligro ante los transgénicos*. (Primera ed, pp. 25–53). México, D.F.: UNAM, Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad.
- Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. . M., Serratos, J. A., & Bye, R. A. (2009). *Origen y diversificación del maíz. Origen y diversificación del maíz*. (Primera Ed). México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Key, S., Ma, J. K.-C., & Drake, P. M. (2008). Genetically modified plants and human health. *J R Soc Med*, *101*(6), 290–298. <http://doi.org/10.1258/jrsm.2008.070372>
- Klümper, W, Qaim, M. (2014). A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. *PLoS ONE*, *9*(11). Retrieved from <http://rightbiotech.tumblr.com/post/103665842150/correlation-is-not-causation>
- Kohli, A., Griffiths, S., Palacios, N., Twyman, R. M., Vain, P., Laurie, D. A., & Christou, P. (1999). Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *Plant Journal*, *17*(6), 591–601. <http://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00399.x>
- Koller, V. J., F??rhacker, M., Nersesyan, A., Mi????k, M., Eisenbauer, M., & Knasmueller, S. (2012). Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Archives of Toxicology*, *86*(5), 805–813. <http://doi.org/10.1007/s00204-012-0804-8>
- Kremer, R. J., & Means, N. E. (2009). Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *European Journal of Agronomy*, *31*(3), 153–161. <http://doi.org/10.1016/j.eja.2009.06.004>
- Krüger, M., Schrödl, W., Neuhaus, J., & Shehata, A. A. (2013). Field Investigations of Glyphosate in Urine of Danish Dairy Cows. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, *3*(5), 1000186. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.4172/2161-0525.1000186>
- Laboratories, B.-R. (2012). Biotechnology Explorer GMO investigator kit: A quantitative Real Time PCR Extension. Retrieved from [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/16625\\_05.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lse/literature/16625_05.pdf)
- Ladics, G. S., Bartholomaeus, A., Bregitzer, P., Doerrler, N. G., Gray, A., Holzhauser, T., ... Glenn, K. (2015). Genetic basis and detection of unintended effects in genetically modified crop plants. *Transgenic Research*, 587–603. <http://doi.org/10.1007/s11248-015-9867-7>
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A., & Virkel, G. (2012). Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *34*(3), 811–818. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.005>
- Latham, J., Wilson, A. (2008). Bee learning behaviour affected by GMO toxin. Retrieved from

<https://www.independentsciencenews.org/news/bee-learning-behaviour/>

- Lazos E, M. C. (2011). Análisis del contexto social y biocultural de las colectas de maíces nativos en México. Retrieved June 11, 2016, from <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/pdf/proyecto/>
- LBOGM. (2005). Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. México, D.F.: Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. Retrieved from <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/LBOGM.pdf>
- Lopez-Martinez, L. X., Oliart-Ros, R. M., Valerio-Alfaro, G., Lee, C.-H., Parkin, K. L., & Garcia, H. S. (2009). Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *LWT - Food Science and Technology*, 42(6), 1187–1192. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.10.010>
- López, D. (2014, December). Consumo de productos y subproductos de maíz en México. *Enlace*, 5(17).
- López, M., Mallorquín, P., & Vega, M. (2003). *Tecnologías moleculares de trazabilidad alimentaria. Informe de Vigilancia Tecnológica*. (S. Enriquez, Ed.). Madrid, España: Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica, Universidad Autónoma de Madrid. Retrieved from [http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/TRAZABILIDAD\\_ALIMENTARIA.pdf](http://www.argenbio.org/adf/uploads/pdf/TRAZABILIDAD_ALIMENTARIA.pdf)
- López Andreo, M. (2013). *Identificación y cuantificación de especies en productos alimenticios mediante PCR en tiempo real*. Universidad Complutense de Madrid.
- Lorch, A., & Then, C. (2007). *How much Bt toxin do genetically engineered MON810 maize plants actually produce? Bt concentration in field plants from Germany and Spain*. Greenpeace Report. Hamburg, Germany. Retrieved from [https://www.testbiotech.org/sites/default/files/How much Bt toxin produced in MON810\\_Greenpeace.pdf](https://www.testbiotech.org/sites/default/files/How%20much%20Bt%20toxin%20produced%20in%20MON810_Greenpeace.pdf)
- Losey, J. E., Rayor, L. S., & Carter, M. E. (1999). Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399(May), 6–7.
- Markoulatos, P., Siafakas, N., Papathoma, a, Nerantzis, E., Betzios, B., Dourtoglou, V., & Moncany, M. (2004). Qualitative and quantitative detection of protein and genetic traits in genetically modified food. *Food Reviews International*, 20(3), 275–296. <http://doi.org/10.1081/lfri-200029418>
- Marquez, E., & Schafer, K. (2016). *Kids Frontline. How pesticides are undermining the health of rural children*. Oakland: Pesticide Action Network (PAN) North America. Retrieved from <https://www.panna.org/sites/default/files/KOF-report-final.pdf>
- Martínez, M. del P. (2015, March 25). Cumplen transgénicos una década perdida. *El Economista*. México, D.F. Retrieved from <http://eleconomista.com.mx/industrias/2015/03/25/cumplen-transgenicos-decada-perdida>
- Mason, G., Provero, P., Vaira, A. M., & Accotto, G. P. (2002). Estimating the number of integrations in transformed plants by quantitative real-time PCR. *BMC Biotechnology*, 2(1), 20. Retrieved from <https://bmcbiotechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6750-2-20>
- Massieu, T. Y., Lechuga, M. J. (2002). El maíz en México: biodiversidad y cambios en el consumo. *Análisis Económico*, 17(36), 281–303.
- Matsuoka, Y., Vigouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez G, J., Buckler, E., & Doebley, J. (2002). A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 6080–6084. <http://doi.org/10.1073/pnas.052125199>
- Mazzara, M., Cordeil, S., & Van den Eede, G. (2004). Event-specific method for the quantitation of maize



- line NK 603 using real-time PCR Validation Report, 1/10. Retrieved from [http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603report\\_mm.pdf](http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/summaries/NK603report_mm.pdf)
- Mendoza, E. (2015, January 18). Transnacionales liberan, por “accidente” 800 toneladas de transgénicos. *Contralínea*. México, D.F. Retrieved from <http://www.contralinea.com.mx/archivo-revista/index.php/2015/01/18/trasnacionales-liberan-por-accidente-800-toneladas-de-transgenicos/>
- Mera-Ovando, L. M. (2009). Aspectos socioeconómicos y culturales. In *Origen y diversificación del maíz*. (Primera Ed). México, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Mercer, K. L., & Wainwright, J. D. (2008). Gene flow from transgenic maize to landraces in Mexico: An analysis. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 123(1–3), 109–115. <http://doi.org/10.1016/j.agee.2007.05.007>
- Mesnage, R., Arno, M., Costanzo, M., Malatesta, M., Séralini, G.-E., & Antoniou, M. N. (2015). Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. *Environmental Health : A Global Access Science Source*, 14(1), 70. <http://doi.org/10.1186/s12940-015-0056-1>
- Mesnage, R., Bernay, B., & Séralini, G. E. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*, 314(2–3), 122–128. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>
- Mesnage, R., Clair, E., Gress, S., Then, C., Székács, A., & Séralini, G. E. (2013). Cytotoxicity on human cells of Cry1Ab and Cry1Ac Bt insecticidal toxins alone or with a glyphosate-based herbicide. *Journal of Applied Toxicology*, 33(7), 695–699. <http://doi.org/10.1002/jat.2712>
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133–153. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
- Milenio Novedades. (2015, November 4). SCJN dice no a Monsanto para siembra de soya transgénica en Yucatán. México, D.F.: Milenio. Retrieved from <http://sipse.com/milenio/suprema-corte-rechaza-permiso-monsanto-siembra-soya-trasgenica-peninsula-de-yucatan-177163.html>
- Millstone, E., Brunner, E., & Mayer, S. (1999). Beyond “substantial equivalence.” *Nature*, 401(6753), 525–526. <http://doi.org/10.1038/44006>
- Mohan, S., Ma, P. W. K., Williams, W. P., & Luthe, D. S. (2008). A naturally occurring plant cysteine protease possesses remarkable toxicity against insect pests and synergizes *Bacillus thuringiensis* toxin. *PLoS ONE*, 3(3), 1–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0001786>
- Monaco, Thomas J., Weller, S. C. (2002). *Weed Science: principles and practices*. (4th Editio). New York, NY.: John Wiley & Sons, Inc.
- Mora-Rochin, S., Gutiérrez-Urbe, J. a., Serna-Saldivar, S. O., Sánchez-Peña, P., Reyes-Moreno, C., & Milán-Carrillo, J. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of tortillas produced from pigmented maize processed by conventional nixtamalization or extrusion cooking. *Journal of Cereal Science*, 52(3), 502–508. <http://doi.org/10.1016/j.jcs.2010.08.010>
- Moreno, L. (2014). *Dependencia de México a las importaciones de Maíz en la era del TLCAN*. El Colegio de la Frontera Norte.
- Moreno, Y. S., Chávez, F. J. C., Díaz, S. A., Castillo, F., Investigaciones, N. De, & Grande, Z. (2012). Granos

- de maíces pigmentados de Chiapas, características físicas, contenido de antocianinas y valor nutracéutico. *Rev. Fitotec. Mex.*, 35(1), 33–41.
- Morin, X. K. (2008). Genetically modified food from crops: progress, pawns, and possibilities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(3), 333–340. <http://doi.org/10.1007/s00216-008-2313-4>
- Mortensen, D. A., Egan, J. F., Maxwell, B. D., Ryan, M. R., & Smith, R. G. (2012). Navigating a Critical Juncture for Sustainable Weed Management. *BioScience*, 62(1), 75–84. <http://doi.org/10.1525/bio.2012.62.1.12>
- Mulwa, R. M. S., & Mwanza, L. M. (2006). Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. *African Journal of Biotechnology*, 5(5), 396–404.
- National Research Center. (2014). Consumer Support for Standardization and Labeling of Genetically Engineered Food - 2014 Nationally-Representative Phone Survey. Retrieved from <http://www.centerforfoodsafety.org/issues/976/ge-food-labeling/us-polls-on-ge-food-labeling>
- Nuffield BioEthics. (2014). Animal use in toxicity studies. In *The Ethics of Research Involving Animals*. London: Nuffield Council on Bioethics.
- Ocamo, D., Cotter, J. (2013). *White Corn in the Philippines: Contaminated with Genetically Modified Corn Varieties*. Retrieved from [www.greenpeace.org](http://www.greenpeace.org)
- Oki, T., Masuda, M., Furuta, S., Nishiba, Y., Terahara, N., & Suda, I. (2002). Involvement of Anthocyanins and other Phenolic Compounds in Radical-Scavenging Activity of Purple-Fleshed Sweet Potato Cultivars. *Food Chem. Toxicol.*, 67(5), 1752–1756. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08718.x>
- Olorunsogo, O. (1990). Modification of the transport of protons and Ca<sup>2+</sup> ions across mitochondrial coupling membrane by N-(phosphonomethyl)glycine. *Toxicology*, 61(2), 205–209.
- Olorunsogo, O. O., Bababunmi, E. A., & Bassir, O. (1979). Effect of glyphosate on rat liver mitochondria in vivo. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 22(1), 357–364. <http://doi.org/10.1007/BF02026955>
- Ortega-Paczka, R. (2003). La diversidad del maíz en México. In C. M. G Esteva (Ed.), *Sin Maíz No Hay País*. (p. 123–154.). México, D.F.: Culturas Populares de México.
- Ortega Paczka, R. A., J. J. Sánchez G., F. Castillo G., y J. M. H. C. (1991). Estado actual de los estudios sobre maíces nativos de México. In *Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México*. (pp. 161–185). Soc.Mex. de Fitogenética, A. C., Chapingo.
- Ortíz-García, S. (2005). Absence of detectable transgenes in local landraces of maize in Oaxaca, México. *PNAS*, 102(50), 12338–12343.
- Owen, M. D. K. (2008). Weed species shifts in glyphosate-resistant crops. *Pest Management Science*, 64(April 2008), 377–387. <http://doi.org/10.1002/ps>
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., Lo, S. L., & Carrasco, E. (2010). Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. *Chemical Research in Toxicology*, 23(10), 1586–1595.
- Pesticide Residues in Food and Feed. (2016). Codex Alimentarius. Retrieved from <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pesticide-mrls/en/>
- Pimentel, D., Westra, L., Noss, R. F. (2000). *Ecological integrity: integrating environment, conservation, and health*. Washington: Island Press.

- Piñeyro-Nelson, A., Van Heerwaarden, J., Perales, H. R., Serratos-Hernández, J. A., Rangel, A., Hufford, M. B., ... Álvarez-Buylla, E. R. (2009). Transgenes in Mexican maize: Molecular evidence and methodological considerations for GMO detection in landrace populations. *Molecular Ecology*, *18*(4), 750–761. <http://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03993.x>
- Pirondini, A., Marmiroli, N. (2010). Environmental risk assessment in GMO analysis. *Rivista Di Biologia*, *103*(2–3), 371–402.
- Pleasants, J. M., & Oberhauser, K. S. (2013). Milkweed loss in agricultural fields because of herbicide use: effect on the monarch butterfly population. *Insect Conservation and Diversity*, *6*(2), 135–144. <http://doi.org/10.1111/j.1752-4598.2012.00196.x>
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., & Siehl, D. (2011). Molecular basis of glyphosate resistance: Different approaches through protein engineering. *Febs J.*, *278*(16), 2753–2766. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted>
- Poulsen, M. S., Rytting, E., Mose, T., & Knudsen, L. E. (2009). Modeling placental transport: Correlation of in vitro BeWo cell permeability and ex vivo human placental perfusion. *Toxicology in Vitro*, *23*(7), 1380–1386. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.07.028>
- Que, Q., Chilton, M.-D. M., de Fontes, C. M., He, C., Nuccio, M., Zhu, T., ... Shi, L. (2010). Trait stacking in transgenic crops: challenges and opportunities. *GM Crops*, *1*(4), 220–9. <http://doi.org/10.4161/gmcr.1.4.13439>
- Querci, M., Jermini, M., Van den Eede, G. (2007). *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos*. Luxemburgo: Joint Research Centre European Comission. Retrieved from <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual ES/User Manual ES full.pdf>
- Querci, M., Van Den Bulcke, M., Žel, J., Van Den Eede, G., & Broll, H. (2010). New approaches in GMO detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *396*(6), 1991–2002. <http://doi.org/10.1007/s00216-009-3237-3>
- Quirasco, M., Schoel, B., Plasencia, J., Fagan, J., Gálvez, A. (2004). Suitability of Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for cry9C Detection in Mexican Corn Tortillas: Fate of DNA and Protein After Alkaline Cooking. *Journal of AOAC International*, *87*(3), 639–646.
- Quirasco, M., & Schoel, B. (2008). Real-time and conventional PCR detection of Liberty Link<sup>®</sup> rice varieties and transgenic soy in rice sampled in the Mexican and American retail markets. *Anal Bioanal Chem*, (392), 395–404. <http://doi.org/10.1007/s00216-008-2265-8>
- Quist, D., & Chapela, I. H. (2001). Transgenic DNA introgressed into traditional maize landraces in Oaxaca, Mexico. *Nature*, *414*(6863), 541–543. <http://doi.org/10.1038/35107068>
- Rabiei, M., Mehdizadeh, M., & Rastegar, H. (2013). Detection of Genetically Modified Maize in Processed Foods Sold Commercially in Iran by Qualitative PCR, *12*(July 2012), 25–30.
- Ramírez-Romero, R., Desneux, N., Decourtye, A., Chaffiol, A., & Pham-Delègue, M. H. (2008). Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *70*(2), 327–333. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.12.002>
- Ramírez, E. (2015). Nueve compañías acaparan 91% de “apoyos” para comercializar maíz. Contralínea. Retrieved from <http://www.contralinea.com.mx/archivo-revista/index.php/2015/08/02/nueve-companias-acaparan-91-de-apoyos-para-comercializar-maiz/>

- Rang, A., Linke, B., & Jansen, B. (2005). Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Roundup Ready soybean. *European Food Research and Technology*, 220(3–4), 438–443. <http://doi.org/10.1007/s00217-004-1064-5>
- Redacción AN. (2014, August 29). Mantienen prohibición de siembra del maíz transgénico. *Aristegui Noticias*. México, D.F.: Aristegui Noticias. Retrieved from <http://aristeguinoicias.com/2908/mexico/se-mantiene-prohibicion-de-siembra-del-maiz-transgenico/>
- Rensburg, J. B. J. Van, & van Rensburg, J. B. J. (2007). First report of field resistance by the stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. *South African Journal of Plant and Soil*, 24(3), 147–151. <http://doi.org/10.1080/02571862.2007.10634798>
- Roe, B., & Teisl, M. F. (2007). Genetically modified food labeling: The impacts of message and messenger on consumer perceptions of labels and products. *Food Policy*, 32(1), 49–66. <http://doi.org/10.1016/j.foodpol.2005.12.006>
- Romano, R. M., Romano, M. A., Bernardi, M. M., Furtado, P. V., & Oliveira, C. A. (2010). Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Archives of Toxicology*, 84(4), 309–317. <http://doi.org/10.1007/s00204-009-0494-z>
- Rondini, L., et al. (2002). Esterase activity able to hydrolyze dietary antioxidant hydroxycinnamates is distributed along the intestine of mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5679–5684. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990301\)79:3<355::AID-JSFA255>3.0.CO;2-G](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990301)79:3<355::AID-JSFA255>3.0.CO;2-G)
- Rosas, T. (2014, December 15). Grandes firmas, con subsidios del Estado. *El Economista*. México, D.F. Retrieved from <http://eleconomista.com.mx/industrias/2014/12/15/grandes-firmas-subsidios-estado>
- Rosas, T. (2015, July 23). Aumenta en dos millones el número de pobres. *El Economista*. México, D.F. Retrieved from <http://eleconomista.com.mx/sociedad/2015/07/23/aumenta-2-millones-numero-pobres>
- Rosati, A., Bogani, P., Santarlasci, A., & Buiatti, M. (2008). Characterisation of 3' transgene insertion site and derived mRNAs in MON810 YieldGard maize. *Plant Molecular Biology*, 67(3), 271–281. <http://doi.org/10.1007/s11103-008-9315-7>
- Rubio, B. (2012, January 21). De heladas, sequías y granizadas. *La Jornada Del Campo*. México, D.F. Retrieved from <http://www.jornada.unam.mx/2012/01/21/cam-heladas.html>
- Rubio, B. (2013, November 16). De TLCs, dominio agroalimentario y vías alternativas en América Latina. *La Jornada Del Campo*. México, D.F. Retrieved from <http://www.jornada.unam.mx/2013/11/16/cam-maiz.html>
- Rubio, B. (2015). La soberanía alimentaria en México : una asignatura pendiente. *Mundo Siglo XXI*, 10(36), 55–70. Retrieved from <http://www.mundosigloxxi.ciecas.ipn.mx/pdf/v10/36/05.pdf>
- Rudiño, L. (2016, July 16). Agricultura orgánica y mercados solidarios, nueva cultura en ascenso; el reto: la regulación. *La Jornada Del Campo*. México, D.F.: La Jornada del campo. Retrieved from <http://www.jornada.unam.mx/2016/07/16/cam-cultura.html>
- SAGARPA. (2015a). Disponibilidad-consumo de maíz blanco y maíz amarillo. Retrieved from <http://www.numerosdelcampo.sagarpa.gob.mx/publicnew/productosAgricolas/>
- SAGARPA. (2015b). Importación y exportación de maíz blanco y amarillo. Retrieved from

- <http://www.numerosdelcampo.sagarpa.gob.mx/publicnew/productosAgricolas/>
- SAGARPA. (2015c). Precios de maíz blanco y amarillo. Retrieved from <http://www.numerosdelcampo.sagarpa.gob.mx/publicnew/productosAgricolas/>
- SAGARPA. (2015d). República Popular de China interesada en adquirir maíz sinaloense. Retrieved from <http://sagarpa.gob.mx/Delegaciones/sinaloa/boletines/Paginas/B06052015.aspx>
- SAGARPA/ASERCA. (2015). Principales países productores de maíz blanco. Retrieved from <http://www.numerosdelcampo.sagarpa.gob.mx/publicnew/productosAgricolas/>
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, E., Horn, G., Mullis, K. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, (239), 487–491.
- Salazar, N. J., & Aldana, M. L. (2011). Herbicida glifosato: Usos, toxicidad y regulación. *Revista de Ciencias Biológicas Y de La Salud*, 8(2), 23–28.
- Salvi, S., D’Orso, F., & Morelli, G. (2008). Detection and quantification of genetically modified organisms using very short, locked nucleic acid TaqMan probes. *J Agric Food Chem*, 56(12), 4320–4327. <http://doi.org/10.1021/jf800149j> [doi]
- Samsel, A., & Seneff, S. (2013a). Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. *Interdisciplinary Toxicology*, 6(4), 159–84. <http://doi.org/10.2478/intox-2013-0026>
- Samsel, A., & Seneff, S. (2013b). Glyphosate’s Suppression of Cytochrome P450 Enzymes and Amino Acid Biosynthesis by the Gut Microbiome: Pathways to Modern Diseases. *Entropy*, 15(4), 1416–1463. <http://doi.org/10.3390/e15041416>
- San Vicente, A. (2016). Demanda contra el maíz transgénico: El devenir de la demanda de acción colectiva. Retrieved from <http://demandacolectivamaiz.mx/wp/demanda-contra-el-maiz-transgenico/>
- Sanchez, J. J., Stuber, C. W., & Goodman, M. M. Sanchez, G. J. J. (2000). Isozymatic and Morphological Diversity in the Races of Maize of Mexico. *Economic Botany*, 54(1931), 43–59. <http://doi.org/10.1007/BF02866599>
- Sanford, J. C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiologia Plantarum*, 79(1), 206–209. <http://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1990.790131.x>
- Santana, R. (2016). Denuncian ante PGR siembra ilegal de soya transgénica en Campeche. Proceso. Retrieved from <http://www.proceso.com.mx/446585/denuncian-ante-pgr-siembra-ilegal-soya-transgenica-en-campeche>
- Schreinemachers, D. M. (2003). Birth malformations and other adverse perinatal outcomes in four U.S. Wheat-producing states. *Environmental Health Perspectives*, 111(9), 1259–1264. <http://doi.org/10.1289/ehp.5830>
- Scientific, T. (2012). Assessment of Nucleic Acid Purity. *Thermo Fisher Scientific*. Retrieved from <http://www.nanodrop.com/Library/T042-NanoDrop-Spectrophotometers-Nucleic-Acid-Purity-Ratios.pdf>
- SENASICA. (2009). Estatus de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado ingresadas en 2009. Retrieved from <http://conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/solicitudes/permisos-de-liberacion>
- SENASICA. (2010). Estatus de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado ingresadas en 2010. Retrieved from

- <http://conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/solicitudes/permisos-de-liberacion>
- SENASICA. (2011). Estatus de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado ingresadas en 2011. Retrieved from <http://conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/solicitudes/permisos-de-liberacion>
- SENASICA. (2012). Estatus de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado ingresadas en 2012. Retrieved from <http://conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/solicitudes/permisos-de-liberacion>
- SENASICA. (2013). Estatus de solicitudes de permisos de liberación al ambiente de maíz genéticamente modificado ingresadas en 2013. Retrieved from <http://conacyt.gob.mx/cibiogem/index.php/solicitudes/permisos-de-liberacion>
- Séralini, G.-E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., ... de Vendômois, J. S. (2014). Republished study: long-term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environmental Sciences Europe*, 26(1), 14. <http://doi.org/10.1186/s12302-014-0014-5>
- Séralini, G. E. (2004). GMOs that change the world.
- Séralini, G. E., Cellier, D., & De Vendomois, J. S. (2007). New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(4), 596–602. <http://doi.org/10.1007/s00244-006-0149-5>
- Séralini, G. E., de Vendômois, J. S., Cellier, D., Sultan, C., Buiatti, M., Gallagher, L., ... Dronamraju, K. R. (2009). How subchronic and chronic health effects can be neglected for GMOS, pesticides or chemicals. *International Journal of Biological Sciences*, 5(5), 438–443. <http://doi.org/10.7150/ijbs.5.438>
- Serna-Saldívar S O, C. A. A.-G. (2008). El papel de la tortilla nixtamalizada en la nutrición y la alimentación. In F. S.-S. M E Rodríguez-García, S O Serna-Saldívar (Ed.), *Nixtamalización del Maíz a la Tortilla. Aspectos Nutrimientales y Toxicológicos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Serratos-Hernández, J.A., Gómez-Olivares, J.L, Salinas-Arreortua, N. (2007). Transgenic proteins in maize in the Soil Conservation area of Federal District , Mexico. *Frontiers in Ecology ...*, 5(5), 247–252. [http://doi.org/Doi.10.1890/1540-9295\(2007\)5\[247:Tpimit\]2.0.Co;2](http://doi.org/Doi.10.1890/1540-9295(2007)5[247:Tpimit]2.0.Co;2)
- Serratos-Hernández, J. A. (2009, March). Bioseguridad y dispersión de maíz transgénico en México. *Revista Ciencias*, 130–141.
- SIAP. (2015a). Cierre de la producción agrícola por cultivo. Retrieved from <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- SIAP. (2015b). Cierre de la producción de maíz, 2014. Retrieved from <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>
- SIAP. (2015c). Monografía Maíz. Retrieved from <http://www.siap.gob.mx/maiz-grano/>
- SIAP. (2015d). Producción de maíz por estado. Retrieved from <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6–20. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>
- Soberón, M., Rodríguez-Almazán, C., Muñoz-Garay, C., Pardo-López, L., Porta, H., & Bravo, A. (2012).

- Bacillus thuringiensis Cry and Cyt mutants useful to counter toxin action in specific environments and to overcome insect resistance in the field. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 104(2), 111–117. <http://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.003>
- Soleri, D., Cleveland, D. a., & Cuevas, F. A. (2006). Transgenic Crops and Crop Varietal Diversity: The Case of Maize in Mexico. *BioScience*, 56(6), 503. [http://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)56\[503:TCACVD\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)56[503:TCACVD]2.0.CO;2)
- Steinbrecher, R. A. (2002). The CaMV 35S Promoter. Government and Corporate Scientific Incompetence: Failure to assess the safety of GM crops. *EcoNexus*, (December). Retrieved from [www.econexus.info](http://www.econexus.info)
- Storer, N. P., Kubiszak, M. E., Ed King, J., Thompson, G. D., & Santos, A. C. (2012). Status of resistance to Bt maize in Spodoptera frugiperda: Lessons from Puerto Rico. *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3), 294–300. <http://doi.org/10.1016/j.jip.2012.04.007>
- Storer, N. P., Thompson, G. D., & Head, G. P. (2012). Application of pyramided traits against Lepidoptera in insect resistance management for Bt crops. *GM Crops & Food*, 3(3), 154–162. <http://doi.org/10.4161/gmcr.20945>
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., & Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 129–136. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>
- Tomlinson, A. D., & Fuqua, C. (2009). Mechanisms and regulation of polar surface attachment in *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Opinion in Microbiology*, 12(6), 708–714. <http://doi.org/10.1016/j.mib.2009.09.014>
- Torres-Morales, B., Coutiño-Estrada, B., Muñoz-Orozco, A., Santacruz-Varela, A., Mejía-Contreras, A., Serna-Saldivar, S. O., ... Palacios-Rojas, N. (2010). Selection for oil content in kernels of maize varieties of the comiteco race from Chiapas, México. *Agrociencia*, 44(6), 679–689. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-77957891909&#38;partnerID=40&#38;md5=c5e698d88440152c0fa1ed549534d97f>
- Trapmann, S. (2006). *Uso de materiales de referencia certificados para la cuantificación de OMG en alimentos y piensos*. Geel. Retrieved from [https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/erm\\_application\\_note\\_4\\_es.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/erm_application_note_4_es.pdf)
- Trejo Pastor V. (2014). *Tesis: Resistencia a Glifosato En Maíces Nativos De Veracruz E Híbridos Comercializados En México*. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Campus Montecillo.
- Turrent-Fernández, A., Serratos-Hernández, A., Mejía-Andrade, H., Espinosa-Calderón, A. (2009). Propuesta de cotejo de impacto de la acumulación de transgenes en el maíz nativo mexicano. *Agrociencia*, (43), 257–265.
- Turrent-Fernández, A. (2010). *Factibilidad de alcanzar el potencial productivo de maíz de México. Mexican Rural Development Research Reports*. Retrieved from <http://www.ase.tufts.edu/gdae/Pubs/wp/12-?-03TurrentMexMaize.pdf>
- Turrent, A., Serratos J., Espinosa, a., Álvarez-Buylla, E. (2013). *El maíz transgénico en México (En 15 píldoras)*. (F. Toledo, J. Chávez, & A. Ávila, Eds.) (Primera ed). Oaxaca: Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad.
- UNESCO, O. de las N. U. para la E., & Cultura, la C. y la. (2010). La Lista Representativa del Patrimonio Cultural Inmaterial de la UNESCO se enriquece con 46 nuevos elementos.

- United Kingdom Health and Safety Executive, E. C. on, & Pesticide Residues in Food (PRiF), P. R. C. (2010). Pesticide residues monitoring report; third quarter report 2010, quarter ended September 2010. Retrieved from <http://www.pesticides.gov.uk/Resources/>
- Ureta-Sánchez, C. (2014). *Impacto, vulnerabilidad y adaptación de las razas mexicanas de maíz ante escenarios de cambio climático*. Tesis. Universidad Nacional Autónoma de México.
- USDA. (2014). Pesticide Data Program. Retrieved from <https://www.ams.usda.gov/datasets/pdp>
- USDA. (2016). Adoption of Genetically Engineered Crops in the U.S. Retrieved from <http://www.ers.usda.gov/data-products/adoption-of-genetically-engineered-crops-in-the-us/recent-trends-in-ge-adoption.aspx>
- Van den Bulcke, M., Lievens, A., Barbau-Piednoir, E., MbongoloMbella, G., Roosens, N., Sneyers, M., & Casi, A. L. (2010). A theoretical introduction to Combinatory SYBR® Green qPCR Screening, a matrix-based approach for the detection of materials derived from genetically modified plants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), 2213–2223.
- Vavilov, N. I. (1926). Centres of Origin of Cultivated Plants. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed*, 16(1), 248.
- Vavilov, N. I. (1992). *Origin and Geography of Cultivated Plants* (First edit). Cambridge, MA.: Cambridge University Press.
- Vázquez-Padrón, R. I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazán, L., Martínez-Gil, a. F., De-la-Riva, G. a., & López-Revilla, R. (2000). Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(2), 147–155. <http://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000200002>
- Vazquez-Padron, R. I., Moreno-Fierros, L., Rival, G. A. De, & Lopez-revilla, R. (1999). Intra-gastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice, 3205(21), 1897–1912.
- Vera-Guzmán, A. M. (2012). Poblaciones Nativas de Maíz Mixteco. Protein, Lysine and Tryptophan. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(5), 7–13. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61024388003>
- Vigani, M., & Olper, A. (2013). GMO standards, endogenous policy and the market for information. *Food Policy*, 43, 32–43. <http://doi.org/10.1016/j.foodpol.2013.08.001>
- Vijayakumar, K. R., Martin, A., Gowda, L. R., & Prakash, V. (2009). Detection of genetically modified soya and maize : Impact of heat processing. *Food Chemistry*, 117(3), 514–521. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.028>
- Villa, V., Robles, E., Godoy, J., & Vera, R. (2012). *El maíz no es una cosa, es un centro de origen*. (V. Villa, E. Robles, J. Godoy, & R. Vera, Eds.) (Primera ed). México: GRAIN.
- Villalba, A. (2009). Resistencia a herbicidas . Glifosato. *Exact and Natual Sciences Communications.*, (39), 169–186.
- Vinueza-Burgos, C. (2009). PCR en Tiempo Real: la nueva era de la información genética celular. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(2), 1–13.
- Watson, R. , Preedy, V. (2015). *Genetically modified organisms in food: Production, safety, regulation and public health*. United States: Nikki Levy.
- Williams, G. M., Kroes, R., & Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and*



*Pharmacology*, 31(2), 117–165. <http://doi.org/10.1006/rtp.1999.1371>

- Wirth, M. C., Jiannino, J. a, Federici, B. a, & Walton, W. E. (2004). Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*, 41(5), 935–941.
- Yoshimoto, M. et al. (1999). Distribution of Antimutagenic Components in Colored Sweetpotatoes. *JARQ*, 33, 143–148.
- Yu, H.-L., Li, Y.-H., & Wu, K.-M. (2011). Risk Assessment and Ecological Effects of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Crops on Non-Target Organisms. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53(7), 520–538. <http://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01047.x>
- Žilić, S., Serpen, A., Akillioğlu, G., Gökmen, V., & Vančetović, J. (2012). Phenolic compounds, carotenoids, anthocyanins, and antioxidant capacity of colored maize (*Zea mays* L.) kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(5), 1224–1231. <http://doi.org/10.1021/jf204367z>
- Zobiolo, L. H. S., de Oliveira, R. S., Huber, D. M., Constantin, J., de Castro, C., de Oliveira, F. A., & de Oliveira, A. (2010). Glyphosate reduces shoot concentrations of mineral nutrients in glyphosate-resistant soybeans. *Plant and Soil*, 328(1), 57–69. <http://doi.org/10.1007/s11104-009-0081-3>
- Zobiolo, L. H. S., Oliveira, R. S., Kremer, R. J., Constantin, J., Yamada, T., Castro, C., ... Oliveira, a. (2010). Effect of glyphosate on symbiotic N<sub>2</sub> fixation and nickel concentration in glyphosate-resistant soybeans. *Applied Soil Ecology*, 44(2), 176–180. <http://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.12.003>
- Zulauf, C. (2011). *Biotechnology and U.S. Crop Yields Trends. Department of Agricultural , Environmental and Development Economics. The Ohio State University.* <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

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

1. Toma de muestra: Con una pinza esterilizada, tomar aproximadamente 2 gramos del alimento y colocarlos en un mortero limpio para realizar la pulverización con nitrógeno líquido. Pesar 400mg del pulverizado y colocarlo en un tubo de 2.2 mL.
2. Agregar 1000  $\mu$ L de Buffer de extracción precalentado a 65°C.
3. Mezclar bien: Invertir el tubo varias veces.
4. Incubar a 65°C durante 1 hora. Agitar cada 15 minutos.
5. Desproteínizar con 500  $\mu$ L de cloroformo:octanol (24:1). Mezclar por inversión enérgica durante 5 minutos.
6. Centrifugar 5 minutos a 12000 rpm.
7. Tomar con cuidado la fase acuosa (superior) y colocarla en un tubo de 2.2 mL.
8. Agregar 0.8 volúmenes de isopropanol frío (i-PrOH).
9. Invertir el tubo diez veces.
10. Centrifugar durante 5 minutos a 12000 rpm.
11. Descartar el sobrenadante con cuidado.
12. Lavar con 1000  $\mu$ L de EtOH 70%.
13. Centrifugar un minuto a 12000 rpm.
14. Descartar el sobrenadante con cuidado y secar en vacuosecador rotatorio.
15. Resuspender en 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O mQ. Redisolver durante 10 horas en hielo.

### Composición Buffer de Extracción (CTAB)

Tris.HCl	100 mM	pH 8.0
EDTA	50 mM	pH 8.0
NaCl	0.7 M	
CTAB	2%	
$\beta$ - mercaptoetanol	140 mM	

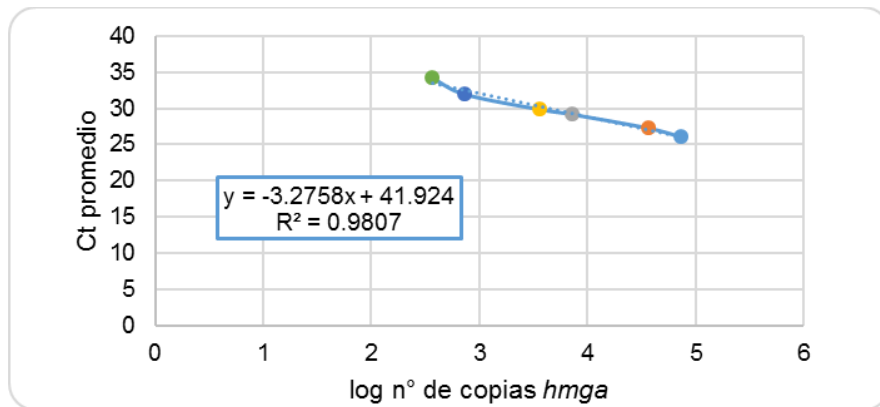
**Anexo II. Curvas de calibración, de amplificación y de disociación para la cuantificación de secuencias transgénicas.**

**Tabla 32. Datos de las curvas estándar obtenidas para la cuantificación de OGMs;** arriba: curva estándar del gen endógeno de maíz *hmga*, abajo: curva estándar del promotor CaMV 35S. Las eficiencias calculadas fueron de 101.96%, para el gen *hmga* y 101.99% para el promotor 35S.

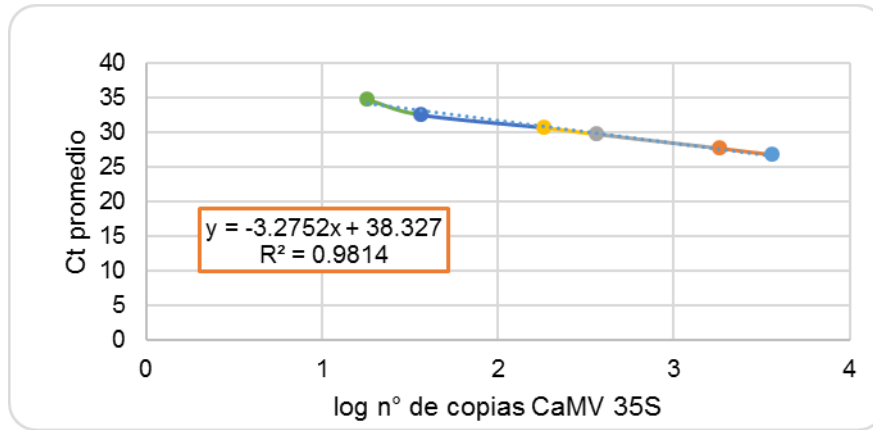
CURVA ESTANDAR							
Estándar	ng	Copias Ref	log copias	Ct ref	pendiente	b	Eficiencia
1	200	73394,4954	4,86566349	25,9791126	-3,27580072	41,9236816	101,961633
2	100	36697,2477	4,56463349	27,2346172			
3	20	7339,44954	3,86566349	29,2392731			
4	10	3669,72477	3,56463349	29,9243999			
5	2	733,944954	2,86566349	31,9893235			
6	1	366,972477	2,56463349	34,1548464			

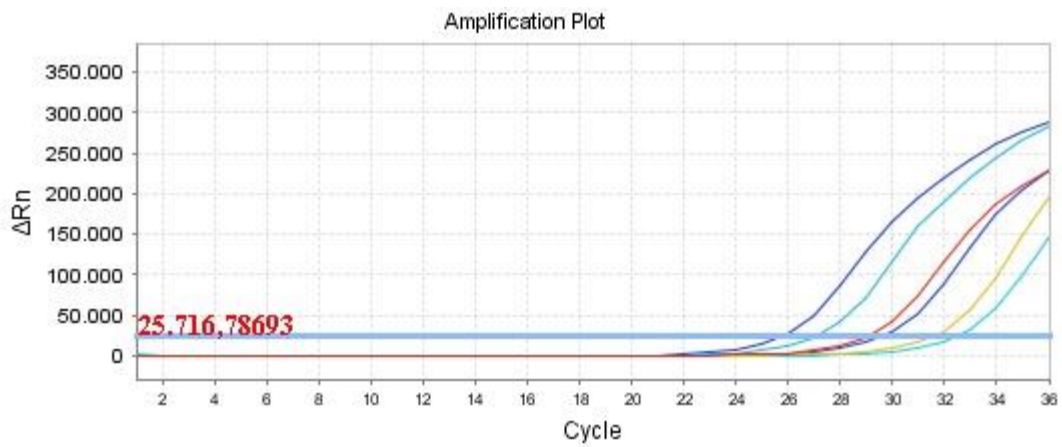
Estándar	ng	Copias OGM	log copias	Ct OGM	pendiente	b	Eficiencia
1	200	3669,72477	3,56463349	26,8562012	-3,27517578	38,3270745	101,988723
2	100	1834,86239	3,2636035	27,6766338			
3	20	366,972477	2,56463349	29,7381248			
4	10	183,486239	2,2636035	30,7856903			
5	2	36,6972477	1,56463349	32,6308823			
6	1	18,3486239	1,2636035	34,8349403			



**Figura 39. Curva de calibración del gen endógeno de maíz *hmga* para la cuantificación de OGMs en muestras de alimentos.**



**Figura 40.** Curva de calibración del promotor CaMV 35S para la cuantificación de OGMs en muestras de alimentos.



**Figura 41.** Ejemplo de curvas de amplificación del gen endógeno *hmga* obtenidas en el ensayo de cuantificación de OGMs para las muestras alimentarias.

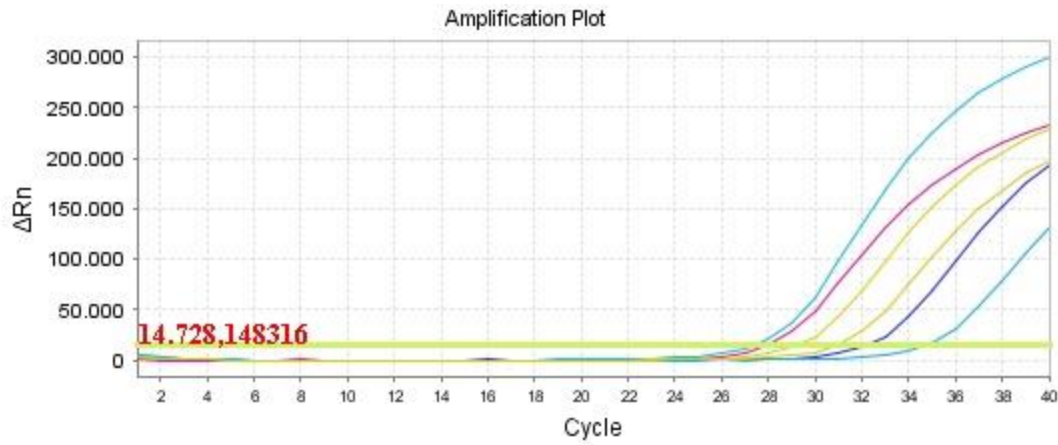


Figura 42. Ejemplo de curva de amplificación del promotor CaMV 35S obtenidas en el ensayo de cuantificación de OGMs para las muestras alimentarias.

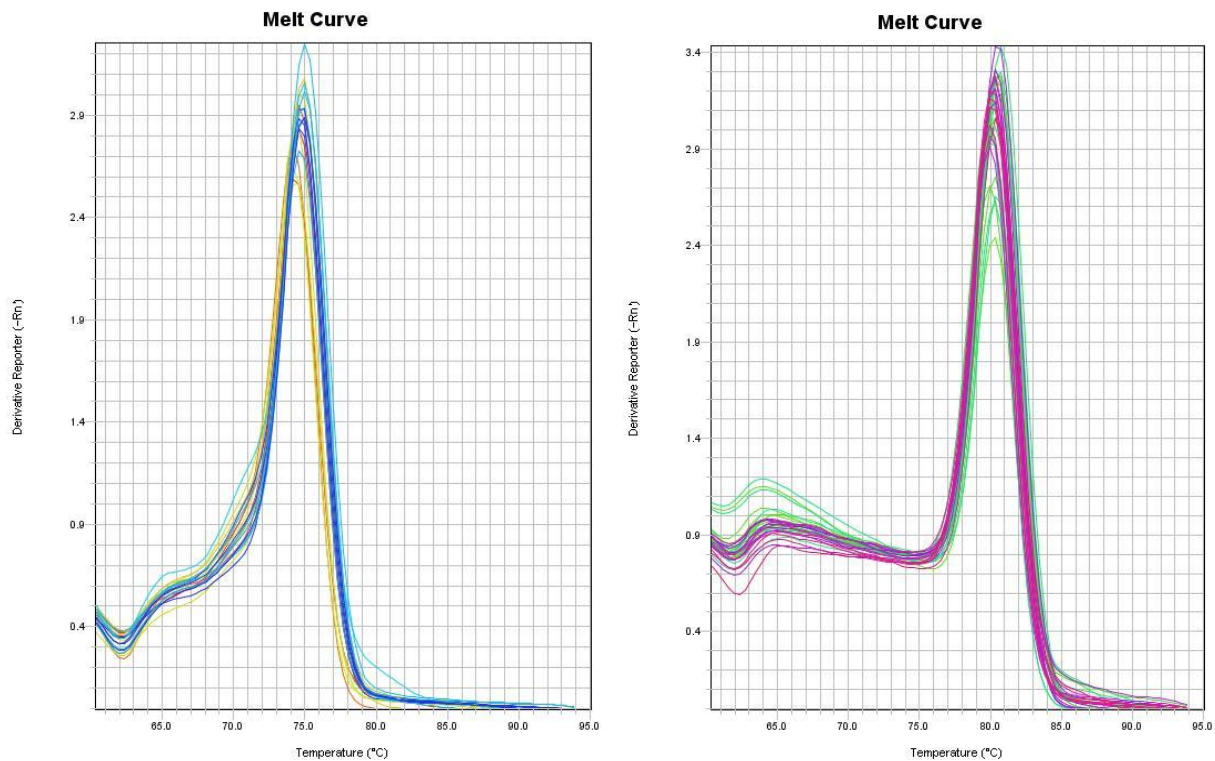


Figura 43. Ejemplos de curvas de *melting* de la amplificación del gen *hmgA* y del promotor CaMV 35S. Izquierda: curva de disociación de los productos de amplificación obtenidos con los cebadores HMGGA F/R ( $T_m=71\pm 1$ ). Derecha: curva de disociación de los productos de amplificación obtenidos con los cebadores CaMVp35S F/R ( $T_m=80\pm 1$ ).

### Anexo III. Eventos transgénicos aprobados en México para consumo humano y animal.

**Tabla 33. Eventos transgénicos aprobados en México para alimentación humana y animal.**

	Nombre del evento transgénico de maíz	Promotor CaMVp35s	Terminadores	Alimento (uso directo o procesamiento) MEXICO	Compañía
1	3272	NO	SI	2008	Syngenta
2	3272 x Bt11 x MIR604 x GA21	SI	SI	2010	Syngenta Monsanto
3	4114	SI	NO	2014	Dupont
4	5307	NO	SI	2013	Syngenta
5	5307 x MIR604 x Bt11 x TC1507 x GA21	SI	SI	2013	Syngenta Dow AgroSciences Monsanto
6	5307 x MIR604 x Bt11 x TC1507 x GA21 x MIR162	SI	SI	2013	Syngenta Dow AgroSciences Monsanto
7	59122	SI	NO	2004	Dow AgroSciences LLC y DuPont
8	59122 x NK603	SI	SI	2006	Dow AgroSciences DuPont Monsanto
9	98140	SI	NO	2008	DuPont
10	98140 x 59122	SI	NO	2010	DuPont Dow AgroSciences
11	98140 x TC1507	SI	NO	2010	DuPont Dow AgroSciences
12	98140 x TC1507 x 59122	SI	NO	2010	DuPont Dow AgroSciences
13	Bt11	SI	SI	2007	Syngenta
14	BT11 x 59122 x MIR604 x TC1507 x GA21	SI	SI	2011	Syngenta Dow AgroSciences Monsanto
15	Bt11 x GA21	SI	SI	2007	Syngenta Monsanto
16	Bt11 x MIR162 x GA21	SI	SI	2010	Syngenta Monsanto
17	Bt11 x MIR162 x MIR604 x GA21	SI	SI	2010	Syngenta Monsanto
18	Bt11 x MIR162 x TC1507 x GA21	SI	SI	2011	Syngenta Dow AgroSciences Monsanto
19	Bt11 x MIR604	SI	SI	2007	Syngenta
20	BT11 x MIR604 x GA21	SI	SI	2008	Syngenta Monsanto
21	DAS40278	NO	NO	2011	Dow AgroSciences
22	DAS40278 x NK603	SI	SI	2013	Dow AgroSciences Monsanto
23	GA21	NO	SI	2002	Monsanto
24	GA21 x T25	SI	SI	2015	Monsanto Bayer CropScience
25	LY038	NO	NO	2007	Revensen LLC

	<b>Nombre del evento transgénico de maíz</b>	<b>Promotor CaMVP35s</b>	<b>Terminadores</b>	<b>Alimento (uso directo o procesamiento) MEXICO</b>	<b>Compañía</b>
26	LY038 x MON810	SI	NO	2008	Renessen LLC Monsanto
27	MIR162	NO	SI	2010	Syngenta
28	MIR604	NO	SI	2007	Syngenta
29	MIR604 x GA21	NO	SI	2007	Syngenta Monsanto
30	MON810	SI	NO	2002	Monsanto
31	MON810 x MON88017	SI	SI	2006	Monsanto
32	MON863	SI	SI	2003	Monsanto
33	MON863 x MON810	SI	SI	2006	Monsanto
34	MON863 x MON810 x NK603	SI	SI	2006	Monsanto
35	MON863 x NK603	SI	SI	2004	Monsanto
36	MON87427	SI	SI	2012	Monsanto
37	MON87427 x MON89034 x MON88017	SI	SI	2013	Monsanto
38	MON87427 x MON89034 x NK603	SI	SI	2013	Monsanto
39	MON87427 x MON89034 x TC1507 x MON88017 x 59122	SI	SI	2013	Monsanto Dow AgroSciences
40	MON87460	SI	SI	2011	Monsanto
41	MON87460 x MON89034 x MON88017	SI	SI	2012	Monsanto
42	MON87460 x MON89034 x NK603	SI	SI	2012	Monsanto
43	MON87460 x NK603	SI	SI	2012	Monsanto
44	MON88017	SI	SI	2006	Monsanto
45	MON89034	SI	SI	2008	Monsanto
46	MON89034 x MON88017	SI	SI	2010	Monsanto
47	MON89034 x NK603	SI	SI	2010	Monsanto
48	MON89034 x TC1507 x MON88017 x 59122	SI	SI	2010	Monsanto Dow AgroSciences
49	MON89034 x TC1507 x MON88017 x 59122 x DAS40278	SI	SI	2013	Monsanto Dow AgroSciences
50	MON89034 x TC1507 x NK603	SI	SI	2011	Monsanto Dow AgroSciences
51	MON89034 x TC1507 x NK603 x DAS40278	SI	SI	2013	Monsanto Dow AgroSciences
52	NK603	SI	SI	2002	Monsanto
53	NK603 x MON810	SI	SI	2004	Monsanto
54	NK603 x T25	SI	SI	2010	Monsanto Bayer CropScience
55	T25	SI	NO	2007	Bayer CropScience

	<b>Nombre del evento transgénico de maíz</b>	<b>Promotor CaMVp35s</b>	<b>Terminadores</b>	<b>Alimento (uso directo o procesamiento) MEXICO</b>	<b>Compañía</b>
56	TC1507	SI	NO	2003	Dow AgroSciences
57	TC1507 x 59122 x MON810 x MIR604 x NK603	SI	SI	2011	Dow AgroSciences Monsanto Syngenta
58	TC1507 x MON810 x MIR604 x NK603	SI	SI	2013	Dow AgroSciences Monsanto Syngenta
59	TC1507 x 59122	SI	NO	2006	Dow AgroSciences
60	TC1507 x 59122 x MON810 x NK603	SI	SI	2010	Dow AgroSciences Monsanto
61	TC1507 x 59122 x NK603	SI	SI	2006	Dow AgroSciences Monsanto
62	TC1507 x MIR162 x NK603	SI	SI	2015	Dow AgroSciences Monsanto Syngenta
63	TC1507 x MIR604 x NK603	SI	SI	2011	Dow AgroSciences Monsanto Syngenta
64	TC1507 x MON810	SI	NO	2010	Dow AgroSciences Monsanto
65	TC1507 x MON810 x MIR162	SI	SI	2015	Dow AgroSciences Monsanto Syngenta
66	TC1507 x MON810 x MIR162 x NK603	SI	SI	2013	Dow AgroSciences Monsanto Syngenta
67	TC1507 x MON810 x NK603	SI	SI	2010	Dow AgroSciences Monsanto
68	TC1507 x NK603	SI	SI	2004	Dow AgroSciences Monsanto