



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DE PRACTICA DE ESPECIALIDAD

**“DETECCIÓN DE ALIMENTOS Y CULTIVOS MODIFICADOS
GENÉTICAMENTE”**



Marcela Jiménez Peralta

Cartago, 2003

DETECCIÓN DE ALIMENTOS Y CULTIVOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de
Costa Rica como requisito parcial para optar por el título
de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

Miembros del Tribunal

M. Sc. Johnny Peraza,
Escuela de Biología
Instituto Tecnológico de Costa Rica
Profesor Asesor

Bch. Erick Hernández,
Escuela de Biología
Instituto Tecnológico de Costa Rica
Lector

M. Sc. Jorge Madriz,
Universidad Nacional
Lector

DETECCIÓN DE ALIMENTOS Y CULTIVOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

Marcela Jiménez Peralta^o

RESUMEN

Los Organismos Modificados Genéticamente han generado gran debate social a nivel mundial sobre la conveniencia o no de su uso. Es por esto que algunos países han tomado medidas informativas tales como el etiquetado con respecto a los productos derivados de los OMG's para consumo tanto animal como humano. Existen diferentes técnicas utilizadas en la detección de los OMG's de las cuales la más difundida es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se escogieron al azar tanto alimentos procesados como no procesados que contuvieran soya o maíz como base en su fabricación, y cultivos que circulan en Costa Rica. El ADN se extrajo mediante un método estándar basado en purificaciones con cloroformo y precipitación diferencial con alcohol. Se analizó otro método por columnas con matriz de sílice, la cual tiene afinidad con el ADN, lo que permite su purificación con lavados con diferentes soluciones amortiguadoras. El ADN se amplificó mediante PCR para lograr la identificación de las secuencias reguladoras utilizadas con mayor frecuencia en los organismos modificados: el promotor 35S y el terminador nos. Los productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa. Se determinó la existencia de al menos una de las bandas en varias de las muestras analizadas tales como harina, leche y carne de soya, tortillas de maíz, entre otras. Estas indican fuertemente la procedencia transgénica de estos productos. Se utilizaron bandas de flujo lateral para la detección de las proteínas específicas CP4 producida por un gen específico derivado de *Agrobacterium* sp. y Cry1 Ab, proteína codificada en un gen de *Bacillus thuringiensis*. Los datos obtenidos reflejan la utilidad de la prueba en análisis rápidos en el campo con material fresco o poco procesado.

Palabras claves: Organismo Modificado Genéticamente (OMG), Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), promotor 35S, terminador nos, ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA), bandas de flujo lateral

^o Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2003.

DETECTION OF GENETICALLY MODIFIED FOODS AND CROPS

Marcela Jiménez Peralta^o

ABSTRACT

Genetically Modified Organisms (GMO's) have created worldwide social debate about their advantages and disadvantages. Therefore, some countries have taken informative measures such as products labeling in relation to products derived from GMO's for both human and animal consumption. There are different techniques used to identify GMO's, with Polymerase Chain Reaction (PCR) being the most spread out. Both processed and unprocessed foodstuffs containing soybean or corn as their main ingredient and crops existing in Costa Rica were randomly chosen. DNA was extracted through a standard chloroform purification method and differential alcohol precipitation. Besides, a silica matrix column method, which has affinity with DNA, was used, thus allowing for its purification through washes with different buffers. This was amplified through PCR in order to identify the regulatory sequences more frequently used in the modified organisms: 35S promoter and nos terminator. The products of the amplifications were visualized in agarose gels. The presence of at least one of these bands was established in several of the samples analyzed, such as flour, milk, soybean meat, and corn tortillas among others. This strongly points to the transgenic origin of these products. Lateral flow test strips were used to detect CP4 protein produced by a gene derived from *Agrobacterium sp.* and Cry1 AB protein produced from *Bacillus thuringiensis* (Bt) gene. The data collected show the usefulness of the test in quick analyses carried out in the field with raw or barely processed foodstuffs.

Key words: Genetically Modified Organism (GMO's), Polymerase Chain Reaction (PCR), 35S promoter, nos terminator, Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA), lateral flow strips.

^o Practicum Report, School of Biology, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2003.

DEDICATORIA

A Dios por darme fuerzas para cada día, descanso en momentos de angustia y luz para mi camino

A mi mamá por darme la oportunidad de llegar hasta aquí, por todo su esfuerzo, amor y dedicación



AGRADECIMIENTOS

Gracias Infinitas a Dios por llevarme de su mano y darme las fuerzas necesarias para salir adelante en todo momento

A mi mamá, por brindarme su apoyo y amor en cualquier situación

A toda mi familia por su permanente apoyo y cariño

A todas las personas que con su colaboración me ayudaron a crecer personal y profesionalmente y en la realización del presente trabajo

Muy especialmente al M. Sc. Johnny Peraza por su guía, apoyo y aportes brindados para poder llevar a cabo este trabajo

Al Bch. Erick Hernández y al M. Sc. Jorge Madriz por su ayuda, aportes, material y sugerencias brindadas

Al Lic. Geovanny Garro por su ayuda desinteresada e incondicional

GRACIAS!!



INDICE GENERAL

<u>RESUMEN</u>	3
<u>ABSTRACT</u>	4
<u>DEDICATORIA</u>	5
<u>AGRADECIMIENTOS</u>	6
<u>INDICE GENERAL</u>	7
<u>INDICE DE FIGURAS</u>	9
<u>INDICE DE CUADROS</u>	11
<u>INTRODUCCIÓN</u>	12
<u>OBJETIVOS</u>	13
<u>Objetivo General:</u>	13
<u>Objetivos Específicos:</u>	14
<u>IMPACTO DEL PROYECTO</u>	15
<u>MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA</u>	16
<u>Biotecnología Vegetal</u>	16
<u>Impacto mundial de los Organismos Modificados Genéticamente</u>	18
<u>Organismos Modificados Genéticamente</u>	22
<u>Métodos de Transformación Genética</u>	24
<u>Método <i>Agrobacterium</i></u>	24
<u>Electroporación</u>	25
<u>Biobalística</u>	26
<u>Bioseguridad</u>	27
<u>Detección de Organismos Modificados Genéticamente</u>	34
<u>Métodos en la detección de proteínas transgénicas</u>	34
<u>Ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA)</u>	34
<u>Banda de flujo lateral</u>	35
<u>Strategic Diagnostics: <i>SISTEMA TraitCheck</i></u>	35
<u>Métodos basados en la detección del ADN introducido</u>	37
<u>Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)</u>	37
<u>Southern Blot</u>	41
<u>GeneScan Europe</u>	42
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	46
<u>Detección mediante el ADN introducido</u>	46
<u>Selección y recolección de las muestras</u>	46
<u>Extracción de ADN</u>	46
<u>Método de Extracción Estándar</u>	46

<u>Método de Extracción mediante columnas</u>	47
<u>Cuantificación de ADN</u>	48
<u>Cuantificación por electroforesis en gel de agarosa</u>	48
<u>Cuantificación por espectrofotometría</u>	49
<u>Detección mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</u>	49
<u>Método de detección mediante proteínas</u>	51
<u>Detección de la proteína CP4 EPSPS</u>	51
<u>Detección cualitativa de la proteína Cry1 AB</u>	52
<u>RESULTADOS</u>	54
<u>Selección y recolección de muestras</u>	54
<u>Extracción de ADN</u>	55
<u>Cuantificación de ADN</u>	57
<u>Detección mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</u>	59
<u>Método de detección mediante proteínas</u>	66
<u>Detección cualitativa de la proteína CP4</u>	66
<u>Detección de la proteína Cry1 AB</u>	66
<u>DISCUSIÓN</u>	68
<u>Selección y recolección de las muestras</u>	68
<u>Extracción de ADN</u>	68
<u>Cuantificación de ADN</u>	69
<u>Detección mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</u>	71
<u>Detección Mediante Proteínas</u>	75
<u>Detección cualitativa de las proteínas CP4 y Cry1 AB</u>	75
<u>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</u>	78
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	80
<u>Anexo 1</u>	87
<u>Métodos de extracción de ADN</u>	87
<u>Anexo 2</u>	88
<u>Cuantificación de ADN</u>	88
<u>Anexo 3</u>	89
<u>Soluciones Utilizadas</u>	89

INDICE DE FIGURAS

<u>Figura 1. Área global de cultivos transgénicos en millones de hectáreas (1996-2001).</u>	<u>19</u>
<u>Figura 2. Área global de cultivos transgénicos por cultivo en millones de hectáreas (1996- 2001)</u>	<u>21</u>
<u>Figura 3. Área de siembra de cultivos transgénicos en Costa Rica:</u>	<u>22</u>
<u>por cultivo (en hectáreas)</u>	<u>22</u>
<u>Figura 4. Constructo del gene típico utilizado en los OMG y las moléculas derivadas de la lectura y traducción de su ADN</u>	<u>23</u>
<u>Figura 5. Mecanismo de infección de A. Tumefaciens</u>	<u>25</u>
<u>Figura 6. Representación del ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA) tanto negativo como positivo</u>	<u>35</u>
<u>Figura 7. Modo de acción bandas de flujo lateral TraitCheck</u>	<u>36</u>
<u>Figura 8. Esquema general de los pasos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).</u>	<u>39</u>
<u>Figura 9. Cuantificación de ADN mediante geles de agarosa (ITCR, 2002). Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Length Standard); Carril 2: Control de cantidad (DNA Amount Standard); Carril 3 y 4: Maíz para palomitas método de extracción estándar (GMOScreen); Carril 5 y 6: Harina de soya, extracción estándar; Carril 7: Palomitas para maíz, extracción por columnas (GENESpin); Carril 8: Harina de soya, extracción por columnas y Carril 9: Control de extracción columnas</u>	<u>57</u>
<u>Figura 10. Análisis electroforético de una amplificación por PCR (ITCR, 2002). Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Length Standard); Carril 2-4: región del cloroplasto, 35S y NOS de maíz para palomitas respectivamente; Carril 5 y 6: Región cloroplasto y 35S Harina de soya extracción STD respectivamente; Carril 7-9: región del cloroplasto, 35S y NOS Harina de soya extracción columna respectivamente; Carril 10,12 y 13: región del cloroplasto, 35S y NOS control negativo respectivamente; Carril 11: marcador de peso molecular; Carril 14-16: región del cloroplasto, 35S y NOS maíz para palomitas extracción columnas; Carril 17-19: región del cloroplasto, 35S y NOS control de extracción y Carriles 20-22: región del cloroplasto, 35S y NOS control positivo (Soya Roundup Ready). La flecha roja indica los productos inespecíficos.</u>	<u>60</u>
<u>Figura 11. Análisis electroforético de una amplificación por PCR (ITCR, 2002). Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Length Standard); Carril 2-4: región del cloroplasto, 35S y NOS control positivo (Soya Roundup Ready) respectivamente. Carril 5 y 6: Región 35S y NOS control de extracción respectivamente; Carril 7-9: región del cloroplasto, 35S y NOS control negativo respectivamente; Carril 10, 19, 20: región del cloroplasto, 35S y NOS Harina de soya extracción columna respectivamente; Carril 11: marcador de peso molecular; Carril 12-14: región del cloroplasto, 35S y NOS maíz para palomitas</u>	

respectivamente; Carril 15 y 16: región 35S y NOS maíz para palomitas extracción columnas; Carril 17 y 18: región del cloroplasto y 35S Harina de soya extracción STD. _____ 61

Figura 12. Análisis electroforético de los productos de amplificación del ADN del arroz transgénico experimental (Control positivo). PCR modificada con dos bloques de 20 ciclos cada uno con temperaturas de hibridación de 62°C y 58°C respectivamente (ITCR, 2002). Carril 1: Región común del cloroplasto; Carril 2: Región 35S y Carril 3: Región NOS _____ 62

Figura 13. Análisis electroforético de los productos de amplificación (ITCR, 2002). Carril 1-3: Región cloroplasto, 35S y NOS Arroz Transgénico (Control Positivo) respectivamente; Carril 4-6: Región cloroplasto, 35S y NOS tortillas tostadas de maíz respectivamente; Carril 7-9: Región cloroplasto, 35S y NOS harina de soya respectivamente y Carril 10-12: Región cloroplasto, 35S y NOS Algodón Transgénico (Control positivo). _____ 63

Figura 14. Comportamiento global de 16 muestras analizadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ITCR, 2002. _____ 65

Figura 15. Resultados generados de la utilización de las bandas de flujo lateral TraitCheck RUR (ITCR, 2002). Banda 1: Harina de soya modificada 2.5% GM (Control positivo); Banda 2: Leche de Soya; Banda 3: Harina de soya y Banda 4: Carne de soya _____ 66

Figura 16. Resultados generados de la utilización de las bandas de flujo lateral TraitCheck Bt1 (ITCR, 2002). Banda 1: Harina de maíz 1% GM; Banda 2: Tortilla tostada de maíz; Banda 3: Cultivo de maíz C _____ 67

Figura 17. Método de Extracción Estándar _____ 87

Figura 18. Método de Extracción por Columnas _____ 87

INDICE DE CUADROS

<u>Cuadro 1. Área global de cultivos transgénicos, 1996- 2001</u>	<u>20</u>
<u>Cuadro 2. Producción de Semillas Transgénicas de Algodón y Soya en Costa Rica durante el periodo 1996- 2000</u>	<u>21</u>
<u>Cuadro 3. Reglamentaciones sobre Bioseguridad en América Latina</u>	<u>31</u>
<u>Cuadro 4. Plantas modificadas genéticamente conteniendo el promotor 35S o el terminador nos que pueden ser detectadas con el sistema GMOScreen Advantage Screening.</u>	<u>44</u>
<u>Cuadro 5. Perfiles térmicos estudiados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa</u>	<u>50</u>
<u>Cuadro 6. Muestras escogidas para la determinación cualitativa de la proteína CP4 derivada de Agrobacterium sp. (ITCR, 2002)</u>	<u>51</u>
<u>Cuadro 7. Muestras escogidas para la determinación cualitativa de la proteína Cry1 AB derivada de Bacillus thuringensis. (ITCR, 2002)</u>	<u>52</u>
<u>Cuadro 8. Productos y cultivos seleccionados al azar y su procedencia para la detección de material modificado genéticamente (ITCR, 2002).</u>	<u>54</u>
<u>Cuadro 9. Cuantificación de las muestras extraídas según el método estándar o el método por columnas (ITCR, 2002)</u>	<u>55</u>
<u>Cuadro 10. Cantidad estimada de ADN mediante la técnica en geles de agarosa y por espectrofotometría de distintas muestras según el tipo de extracción utilizado. Cada muestra se procesa por duplicado (ITCR, 2002)</u>	<u>58</u>
<u>Cuadro 11. Resultados de los productos de amplificación en las regiones del cloroplasto (CLO), promotor 35S y terminador NOS para las diferentes muestras analizadas. (ITCR, 2002).</u>	<u>64</u>
<u>Cuadro 12. Estimación de la cantidad de ADN presente en diferentes muestras por medio del GeneQuant Calculator. (ITCR, 2002)</u>	<u>88</u>

INTRODUCCIÓN

Poderosas herramientas provistas por la ciencia y la tecnología en años recientes han tenido un profundo impacto en el sector agrícola mundial. La innovación en los métodos de producción y procesamiento han revolucionado muchos sistemas tradicionales y la capacidad mundial para generar alimentos.

Aunque la Biotecnología moderna durante las últimas décadas ha abierto nuevas oportunidades en una gama amplia de sectores, como en la producción agrícola y farmacéutica, la balanza del debate global en torno a los Organismos Modificados Genéticamente (OMG) es sin precedentes. La discusión sobre el consumo y utilización de productos derivados de estos organismos es muy intensa y en momentos cargada emocionalmente, ha polarizado científicos, productores, consumidores y grupos de interés de público, así como gobiernos y políticos.

Los OMG's, como todas las nuevas tecnologías, son instrumentos que pueden ser utilizados para bien o para mal. La transformación genética de plantas es de gran utilidad en la producción de variedades transgénicas resistentes o tolerantes a plagas (insectos, nemátodos, etc.), a patógenos como virus, bacterias y hongos, o a condiciones ambientales adversas (alta salinidad, alta concentración de metales tóxicos, etc.). La producción de plantas transgénicas es además, una opción adecuada para el ambiente y la salud humana, porque reduce el uso de plaguicidas y agroquímicos.

Los temores principales apuntan hacia las técnicas de manipulación genética, que pudieran dar lugar a la expresión inesperada de genes, que han sido alterados inadvertidamente debido a la introducción del gene de interés y que pudieran "activarse" durante la vida del OGM o del cultivo. Entre las posibles consecuencias que preocupan a los críticos de la ingeniería genética de alimentos, no sólo se habla de la inocuidad del consumo, de la presencia de proteínas con potencial alergénico, o los posibles efectos

tóxicos de los OGM's, sino también sobre su impacto en el ambiente, en la sociedad y en la economía global.

La polarización derivada de la discusión concerniente a los cultivos modificados ha provocado la difusión masiva de información con pocos fundamentos científicos, que causa la desconfianza del público consumidor ante la comercialización de los productos manipulados a través de la ingeniería genética.

La biotecnología y las exigencias de información de los consumidores generan nuevas necesidades de información en el etiquetado y en el control de las materias primas y los productos. El consumidor tiene derecho a ser informado sobre los productos que ellos compran. Sin embargo, el asunto del etiquetado de los productos derivados de los OGM's es un debate activo y continuo en varios países, en los cuales se sugiere que es la manera más apropiada y factible de habilitar a los consumidores a hacer opciones informadas sobre tales productos.

Con este hecho ha surgido la necesidad de desarrollar técnicas analíticas que permitan disponer de un control de calidad capaz de detectar la presencia de los derivados de los organismos modificados genéticamente (OMG). Esto permite un etiquetado más informativo y completo.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Seleccionar y evaluar alimentos y cultivos en Costa Rica para verificar la presencia o ausencia de material transgénico

Objetivos Específicos:

- Ofrecer un panorama preliminar de la circulación de material transgénico de primera generación a nivel nacional
- Elegir y analizar ciertos cultivos y/o alimentos, los cuales tengan la probabilidad de contener material transgénico
- Optimizar el protocolo de extracción de ADN de buena calidad mediante la utilización del sistema de purificación *GENESpin* (2001)
- Comprobar los protocolos de detección de organismos transgénicos en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Costa Rica (propuestos por *GeneScan*, 2000)
- Realizar pruebas de amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del ADN extraído para determinar la ausencia o presencia de algunas de las secuencias que indican modificación genética como lo son el promotor 35-S del virus del mosaico de la coliflor (*Cauliflower Mosaic Virus, CaMV*) y el terminador NOS (gen de la Nopalina Sintetasa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*)
- Comprobar la utilidad de la prueba *Traitcheck Bt1 Corn Grain* (2000) para la determinación cualitativa de la proteína Cry1 Ab producida por un gen derivado de *Bacillus thuringiensis*, incorporado para la resistencia a insectos en maíz
- Comprobar la utilidad de la prueba *TraitCheck RUR Bulk Soybean* (2000) para la determinación cualitativa de la proteína CP4 EPSPS producida por el gen derivado de *Agrobacterium sp.*, incorporada en soya

IMPACTO DEL PROYECTO

Cada vez más, la liberación de plantas transgénicas o de productos derivados, para cultivo o consumo animal y humano ha atraído la atención de las personas. Este viene a ser un tema predominante en las discusiones científicas, éticas, económicas y políticas en la actualidad (Nodari y Guerra, 2000).

La información sobre este tema es un requisito indispensable para que las personas puedan tomar una decisión conciente sobre los alimentos que consumen. La información es fundamental, partiendo del etiquetado claro de los productos alimenticios. En el contexto de la necesidad de información y transparencia, es esencial la disponibilidad y fiabilidad de metodologías analíticas dirigidas a distinguir entre alimentos transgénicos y no transgénicos.

El presente proyecto es de gran ayuda y desarrollo para la población en general, debido a que por medio de éste se puede estimar la presencia de productos modificados genéticamente circulantes en el país, haciendo posible que las entidades encargadas puedan dar información a los consumidores de una manera más efectiva y además que estos obtengan una información valedera y a partir de esta seleccionar lo que desean consumir. Por otro lado, ya que actualmente en el país no existen laboratorios que lleven a cabo la detección de productos transgénicos, es una gran oportunidad y aporte para el Laboratorio de Biología Molecular del ITCR, el implementar y establecer este tipo de metodologías.

Lo que se busca es determinar una técnica fiable y sensible para responder a la legislación internacional y a la información exigida por los consumidores. Este tipo de análisis son de interés para toda la línea agroalimentaria, desde las compañías de semillas hasta los distribuidores, pasando por los agricultores, silos, fabricantes de productos semi-transformados (almidones, lecitinas,...) y finales, e incluye certificación de semillas, etiquetado, trazabilidad de los productos, entre otros.

MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

Biotecnología Vegetal

La biotecnología, en un sentido amplio se puede definir como “ la aplicación de organismos, componentes o sistemas biológicos para la obtención de bienes y servicios” (Iáñez, 2002). Según el Convenio sobre la diversidad biológica de 1992, la biotecnología es «toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos de organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos» (FAO, 1999).

Desde el redescubrimiento de las leyes de Mendel, la mejora del cultivo de plantas dejó de ser meramente empírica y se convirtió en científica. La humanidad ha cultivado y cosechado plantas desde hace diez o quince mil años. Sin embargo, la mayor parte de las innovaciones tecnológicas en la agricultura han tenido lugar durante los últimos doscientos años. Estos incluyen tanto la mecanización, como la hibridación, los agroquímicos (herbicidas y pesticidas) y los fertilizantes químicos (Universidad de Quilmes, 2001).

La Revolución Verde (años 60), con sus nuevas variedades híbridas y sus prácticas intensivas con abonos y pesticidas llevaron a grandes aumentos en la producción en muchos países que antes tenían graves problemas de suministros de alimentos (China, India, y algunas partes de Latinoamérica).

A partir de ese período se entró en una nueva era de la agricultura, de la mano de las nuevas biotecnologías, con un papel central la genética molecular. Ello se ha debido a un auge espectacular de los conocimientos básicos de biología vegetal y la aplicación de las técnicas de Ingeniería Genética (Iáñez, 1997).

La biotecnología de plantas puede contribuir a la seguridad alimentaria y a la agricultura sostenible de los países en desarrollo. Los avances de la biotecnología en el análisis de la diversidad y el mejoramiento de plantas y organismos asociados han fortalecido la investigación y el desarrollo agrícola en general. Así, se puede incrementar la productividad de los cultivos y contribuir a la conservación de los recursos fitogenéticos. La combinación de las nuevas biotecnologías y de las técnicas clásicas de mejoramiento genético promueven una agricultura sostenible (Valdez, 2002).

Las nuevas Biotecnologías ofrece diversas posibilidades para incrementar la productividad, diversificación y la producción mientras que se da un mayor desarrollo sostenible (Izquierdo, 1999). Esta tecnología incluye la producción de biopesticidas, técnicas de cultivo de tejidos y el uso avanzado de técnicas de Biología Molecular para la transformación de plantas, el análisis de genomas y el diagnóstico de enfermedades vegetales. Esta puede ser un instrumento efectivo para mitigar las consecuencias de los cambios climáticos y ofrecer alternativas de cultivo para suelos degradados por la erosión o por el uso intensivo (FAO, 1999).

Las promesas de la biotecnología agrícola residen en aumentar la productividad y reducir costos, generar innovaciones y mejoras en los alimentos y conducir a prácticas agrícolas más "ecológicas"; contribuir, en suma, a la agricultura sostenible, que utiliza los recursos con respeto al ambiente y sin hipotecar a las generaciones futuras. Pero además la manipulación genética de plantas tendrá un impacto en otros sectores productivos: floricultura y jardinería, industria química e industria farmacéutica.

La aplicación más reciente de la biotecnología a la producción de alimentos es la modificación genética, también conocida como ingeniería genética o manipulación genética. La punta de lanza y parte más espectacular de esta biotecnología es la Ingeniería Genética de plantas: la creación de plantas transgénicas a las que se ha introducido establemente ADN foráneo que puede ser no sólo de origen vegetal, sino de animales o de microorganismos. La biotecnología vegetal es más amplia, e incluye

otras técnicas, pero todos estos nuevos métodos a su vez sirven para que los programas tradicionales de mejora genética se realicen más racionalmente, con más efectividad y en menor tiempo (Moreno e Iáñez, 1997).

Impacto mundial de los Organismos Modificados Genéticamente

Un subconjunto importante de la Biotecnología Moderna es la Ingeniería Genética, o la manipulación de la dotación genética del organismo introduciendo, redistribuyendo o eliminando genes específicos mediante técnicas modernas de Biología Molecular. Un organismo modificado genéticamente, conocido también con el nombre de organismo vivo modificado u organismo transgénico, es todo organismo vivo que posee una nueva combinación de material genético obtenida mediante el uso de biotecnología moderna (FAO, 2002)

Según el informe Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2001 (http://www.isaaa.org/publications/briefs/Brief_21.htm) del Servicio Internacional para el Desarrollo y la Aplicación de la Biotecnología en Agricultura (ISAAA) la rápida adopción de los cultivos transgénicos durante el periodo de 1996-2000, cuando fueron acogidos por primera vez los cultivos genéticamente modificados (GM), refleja los múltiples beneficios comerciales realizados en las grandes y pequeñas fincas en los países industrializados y en vías de desarrollo. Entre 1996 y 2000 un total de 15 países, 10 industrializados y 5 en vías de desarrollo contribuyeron a incrementar en un 25% el área global de cultivos transgénicos. En la figura 1 se muestra que durante ese periodo, el área global de cultivos transgénicos creció de 1.7 millones de hectáreas para 1996 a 52.6 millones de hectáreas para el 2001 (James, 2001).

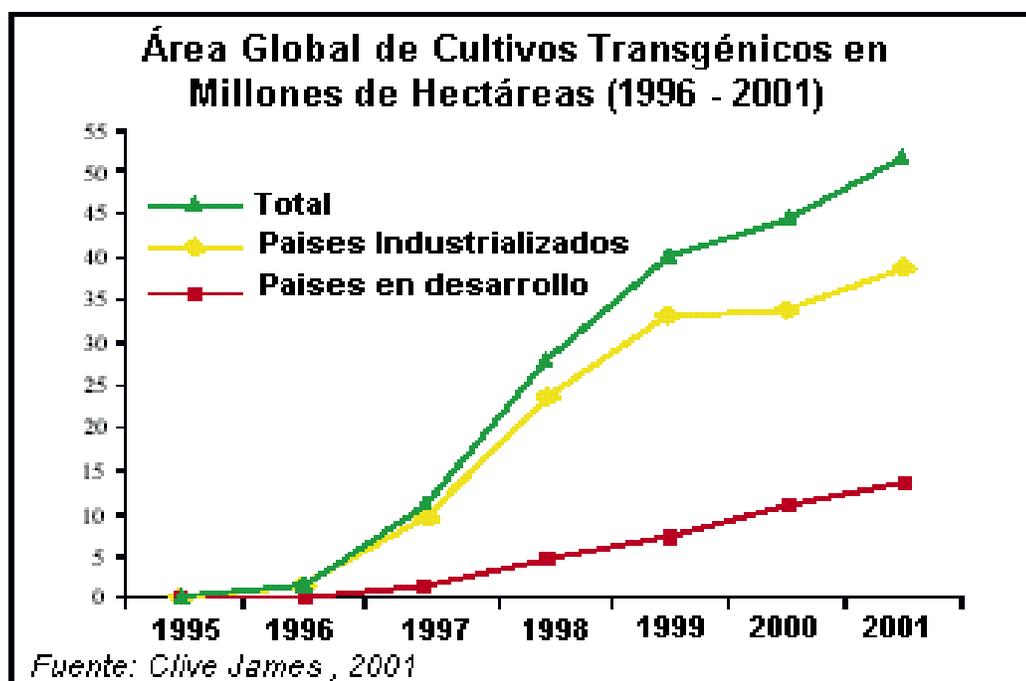


Figura 1. Área global de cultivos transgénicos en millones de hectáreas (1996-2001).

El estimado de la superficie cultivada con semillas transgénicas globalmente para el 2001 alcanzó los 52.6 millones de hectáreas en todo el mundo (Cuadro 1). El incremento entre el 2000 y el 2001 es de un 19%, equivalente a 8.4 millones de hectáreas, este incremento corresponde aproximadamente al doble del incremento entre el periodo 1999 y 2000 que fue equivalente al 11% de crecimiento (James, 2001). En los últimos cinco años, y a pesar de todas las polémicas suscitadas en torno a los OMG, el crecimiento de cultivos transgénicos se mantiene en alza, con excepción de la colza en Canadá, y su implantación generalizada parece sólo cuestión de tiempo. La especie más extendida es la soya, seguida del maíz, el algodón y la colza.

Cuadro 1. Área global de cultivos transgénicos, 1996- 2001

	Hectáreas (millones)	Acres (millones)
1996	1.7	4.3
1997	11.0	27.5
1998	27.8	69.5
1999	39.9	98.6
2000	44.2	109.2
2001	52.6	130.0

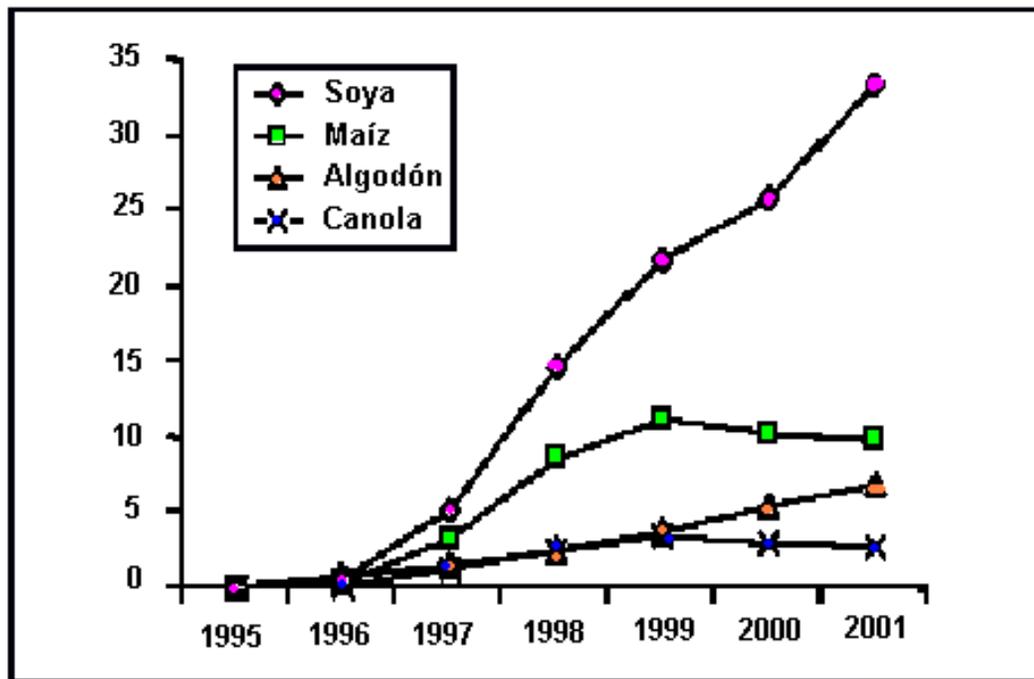
Incremento del 19%, 8.4 millones de hectáreas entre 2000-2001.
Fuente: Clive James, 2001

Un total de 5,5 millones de agricultores repartidos en 13 países sembraron cultivos modificados, para el año 2001 abarcaron por primera vez más de 50 millones de hectáreas. Más de una cuarta parte de la superficie global de OGM's (13,5 millones de hectáreas) se sembró en seis países en vía de desarrollo. Indonesia, por ejemplo, comercializó semilla de algodón de la variedad *Bt* por primera vez.

Los principales productores fueron: Estados Unidos, con 35,7 millones de hectáreas (68% del global), Argentina, con 11,8 millones (22%), Canadá, con 3,2 millones (6%) y China, con 1,5 millones de hectáreas (3%). China obtuvo el porcentaje de crecimiento anual más alto y triplicó su superficie de algodón *Bt*, que pasó de 0,5 millones de hectáreas en el año 2000 a 1,5 millones en 2001, mientras que en Europa se mantiene un reducido número de hectáreas cultivadas (alrededor de 50.000 ha) y se trabaja aún sobre la oportuna legislación al respecto (PROMESA, 2002).

Esta diferencia entre Europa y el resto del mundo es debida seguramente al fuerte rechazo social que generan los cultivos transgénicos y los alimentos que los contienen, con una población fuertemente sensibilizada por los últimos sucesos relacionados con la seguridad alimentaria. No obstante, en zonas como Bulgaria y Rumania y Ucrania aumenta el cultivo de colza y de papas transgénicas.

La soya OGM fue el principal cultivo sembrado, con 33,3 millones de hectáreas, seguido del maíz, con 9,8 millones de hectáreas (PROMESA, 2002). En la figura 2 se muestra el incremento año a año del área cultivada con los principales productos transgénicos que son en orden descendente: soya, maíz, algodón y canola.



Fuente: Clive James, 2001

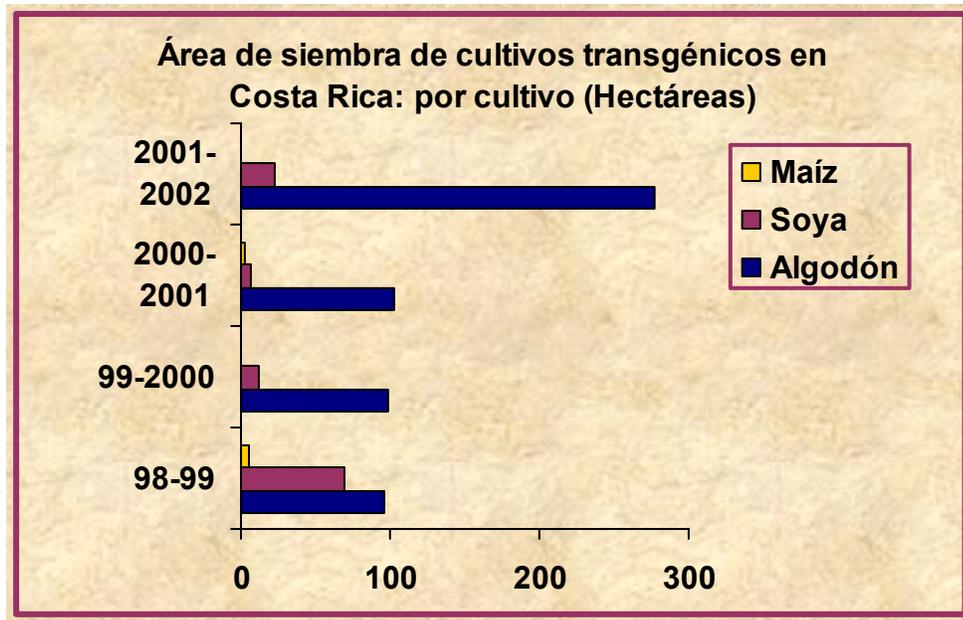
Figura 2. Área global de cultivos transgénicos por cultivo en millones de hectáreas (1996- 2001)

En Costa Rica se da la producción de semillas transgénicas de algodón y soya la cual se muestra en el cuadro 2 durante el periodo 1996-2000.

Cuadro 2. Producción de Semillas Transgénicas de Algodón y Soya en Costa Rica durante el periodo 1996- 2000

PERIODO	ÁREA SEMBRADA (HECTÁREAS)
1996-1997	56.4
1997-1998	159
1998-1999	151.2
1999-2000	112.85

Fuente: May (2002)



Fuente: Ing. Walter Quirós, Oficina Nacional de Semillas, San José, Costa Rica, 2002

Figura 3. Área de siembra de cultivos transgénicos en Costa Rica: por cultivo (en hectáreas)

Además se da la producción de cultivos transgénicos de diferentes cultivos como la soya, el maíz y el algodón. De los cuales el algodón en los últimos años ha tenido un aumento significativo en la cantidad de hectáreas sembradas (Figura 3).

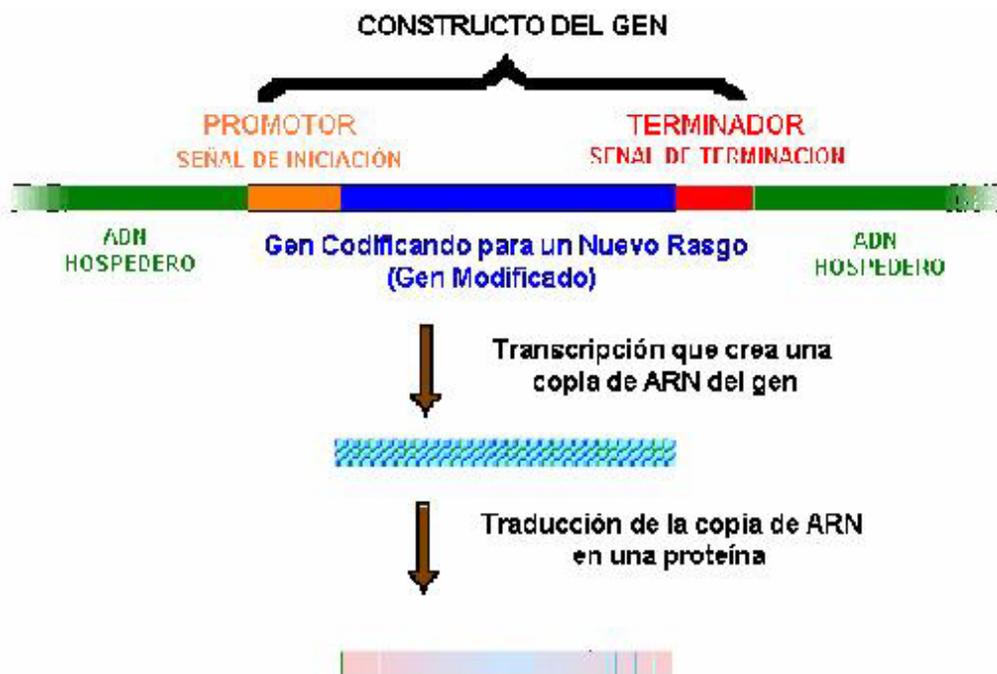
Organismos Modificados Genéticamente

La operación que permite modificar artificialmente las características genéticas de un organismo vivo, ya sea una bacteria, un animal o un vegetal, se denomina transgénesis y consiste básicamente en añadir, suprimir o reemplazar al menos un gen de dicho organismo. Esto involucra la inserción de piezas de ADN sintéticamente combinadas (constructos) dentro del genoma del organismo que va a ser modificado para dirigir la actividad del gene (Holst-Jensen, 2001 y Byrne *et al*, 2002).

Un inserto típico (constructo) en un OMG esta compuesto de tres elementos:

1. Un elemento promotor que funciona como un interruptor (enciende/ apaga) del gene insertado o alterado.
2. El gene de interés que codifica para una característica específica seleccionada.
3. Un elemento terminador que funciona como una señal de terminación del gene insertado o alterado.

Otros elementos pueden incluirse dentro de este constructo, y su función usualmente es para controlar y estabilizar la función del gen o para demostrar la presencia de la modificación en el organismo. La figura 4 muestra esquemáticamente el sitio de integración del constructo del gene y las moléculas derivadas de la lectura y traducción del ADN (Holst-Jensen, 2001).



Fuente: Anne Holst-Jensen

Figura 4. Constructo del gene típico utilizado en los OMG y las moléculas derivadas de la lectura y traducción de su ADN

El promotor es la llave de encendido y apagado que controla cuándo y dónde se expresará el gene en la planta. La mayoría de los promotores en las variedades de cultivos transgénicos han sido "constitutivos", es decir, que causan la expresión del gene durante todo el ciclo biológico de la planta en la mayoría de los tejidos. El promotor constitutivo usado más comúnmente es el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, cuyo nombre a menudo se abrevia como promotor CaMV o 35S (Powell, 1999). Se obtuvo este promotor del virus que causa la enfermedad del mosaico de la coliflor en varias hortalizas, como la coliflor, el brócoli, la col y la canola.

Otros promotores son más específicos y responden a señales indicadoras en el medio interno o externo de la planta. Un ejemplo de un promotor inducible por la luz es el promotor del gene "cab", que codifica la principal proteína fijadora de clorofilas a y b (Fenwick, 2002).

Se han utilizado otros promotores en el desarrollo de cultivos, pero con frecuencia se escoge el CaMV porque causa una abundante producción de la proteína transgénica en una amplia variedad de situaciones.

Métodos de Transformación Genética

La transformación es un cambio heredable en una célula u organismo, producido por la absorción y establecimiento del ADN introducido (Fenwick, 2002). Hay tres métodos principales para transformar las células y tejidos de las plantas:

Método *Agrobacterium*

La transgénesis o transferencia génica horizontal en plantas se puede realizar utilizando el ADN-T (transferible) del plásmido Ti (inductor de transformación) de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que produce los tumores o "agallas" (Figura 5) en las heridas que se originan en las plantas (Bosch, 2001).

Agrobacterium tumefaciens es una notable especie de bacterias que viven en el suelo y tienen la capacidad de infectar las células de las plantas con un fragmento de su ADN. Cuando el ADN bacteriano se integra en un cromosoma de la planta, se apodera efectivamente de la maquinaria celular de ésta y la usa para asegurar la proliferación de la población bacteriana (Figura 5). Cuando la raíz o el tallo de una planta sufre una lesión, emite ciertas señales químicas. En respuesta a esas señales los genes vir de *A. tumefaciens* se activan y dirigen una serie de acontecimientos necesarios para la transferencia del ADN-T desde el plásmido Ti al cromosoma de la planta (Fenwick, 2002).

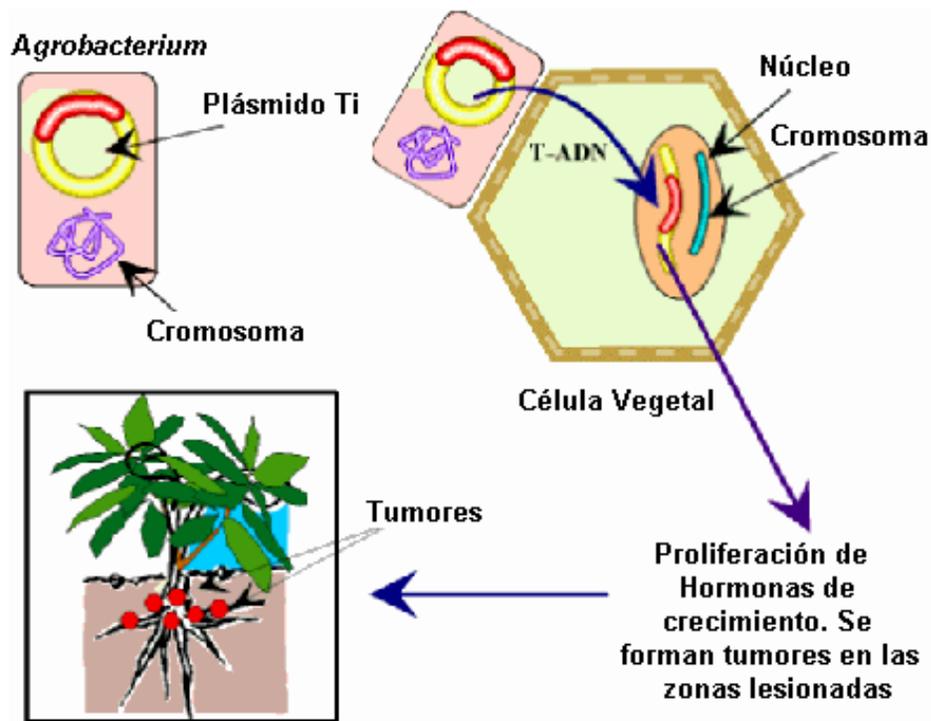


Figura 5. Mecanismo de infección de *A. Tumefaciens*

Electroporación

Es una técnica que utiliza descargas eléctricas para crear poros reversibles en la membrana plasmática, además permite la introducción del ADN foráneo (Alves *et al*, 1999). La técnica consiste en la introducción del ADN en protoplastos (células

desprovistas de la pared celulósica por medios enzimáticos o químicos) utilizando la electroporación (Bosch, 2001).

Biobalística

También se puede introducir el ADN en las células por bombardeo con microproyectiles (biobalística). Gracias al acelerador de partículas la biobalística con su bombardeo de micropartículas cubiertas de ADN introduce en células vegetales los genes deseados. Para ello se utilizan microproyectiles de oro o tungsteno (inertes químicamente) disparados a velocidad supersónica atraviesan la membrana sin causar daños a la célula.

Según Sanford (1990) el proceso puede ser definido como la introducción de sustancias dentro de células y tejidos a través de microproyectiles a alta velocidad. Un microproyectil puede ser definido como una partícula pequeña capaz de ser acelerada y penetrar en células y tejidos. Un microproyectil puede ser lo suficientemente pequeño para penetrar el tejido blanco de una manera inocua y además es capaz de cargar ADN en su superficie o interior.

Con las técnicas mencionadas (especialmente utilizando el ADN-T del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*) se han obtenido plantas resistentes a virus, a insectos y a herbicidas, entre otros. Otro caso interesante ha sido la obtención de plantas transgénicas de tomate, soja, algodón, colza a las que se les ha incorporado un gen que produce la resistencia al principio activo (por ejemplo, el glifosato) de algunos herbicidas de amplio espectro, lo cual permite eliminar las malas hierbas y malezas, tratando los campos con herbicidas que no dañan al cultivo. Este descubrimiento ha sido realizado y explotado por la compañía Monsanto, que lidera el Mercado de la soja distribuyendo el herbicida *Roundup* y la semilla resistente al mismo: Soja *Roundup Ready*. También se han obtenido plantas transgénicas de tomate con genes que alargan el periodo de conservación y almacenamiento evitando la síntesis de la poligalacturonasa que produce el reblandecimiento del fruto (Bosch, 2001).

El primer cultivo transgénico en salir a mercado fue el tomate larga vida Flavr-Savr®, producido por la compañía Calgene, al cual se le incorporó una secuencia que bloquea la acción de la enzima poligalacturonasa, e impide así que durante la maduración se metabolice la celulosa del fruto. El bloqueo se consiguió a través de la tecnología ARN antisentido, que consiste en producir una copia del gen responsable por el carácter, revertir la secuencia, e introducir la secuencia reversa en el organismo. El gen con la secuencia reversa se aparea con el ARNm producido por el gen original, anulando su expresión. Al anularse la poligalacturonasa, no hay necesidad de cosechar los frutos aún verdes para soportar el transporte. El tomate Flavr-Savr®, fue una de las primeras variedades de cultivos transgénicos aprobadas. Como la característica había sido incorporada en una variedad cuyo desempeño era deficiente en otros aspectos, no fue un éxito comercial (INIA, 2002).

Existen grandes empresas transnacionales que se dedican a la producción de organismos modificados genéticamente entre las cinco más sobresalientes están: AstraZeneca; DuPont; Monsanto; Novartis y Aventis (García, 2002).

Bioseguridad

La FAO (2001) define bioseguridad como "la gestión de todos los riesgos biológicos y ambientales asociados a los alimentos y la agricultura, comprendidos la silvicultura y la pesca", y también abarca la inocuidad de los alimentos, así como la vida y la sanidad de las plantas y los animales. Los riesgos comprenden todo lo que va desde los organismos genéticamente modificados, las especies y las plagas exóticas de las plantas y los animales, hasta el desgaste de la biodiversidad, la difusión de enfermedades transfronterizas del ganado, las armas tóxicas y el "mal de las vacas locas".

Los beneficios ofrecidos por la ingeniería genética en el área de alimentos son enormes; sin embargo, el propio potencial de este conjunto de técnicas ha generado inquietud, dudas y diversas preocupaciones en torno a los posibles riesgos para la

salud y el ambiente, derivados del uso y consumo de organismos transgénicos. La manipulación biotecnológica de los cultivos y alimentos ha generado un amplio debate. Involucra profundos cambios en la agricultura, posibles impactos en el ambiente y la salud humana.

La necesidad de bioseguridad en los alimentos y la agricultura se ha intensificado con la globalización económica, el veloz desarrollo de las comunicaciones, el transporte y el comercio, el avance tecnológico y una mayor conciencia de la biodiversidad y el ambiente. En el ámbito internacional se ocupa de este tema en forma más amplia el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (Acuerdo SFS) de la Organización Mundial del Comercio (OMC).

Los acuerdos relativos al ambiente -entre los que destaca el Convenio sobre la diversidad biológica (CDB)- los países han resuelto tomar medidas para proteger la biodiversidad; y el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad, adoptado en enero del 2000, proporciona un sistema internacional de reglamentación para el paso transfronterizo de los organismos modificados genéticamente. Los países han aceptado cooperar entre ellos, a través del Codex Alimentarius, la Convención internacional de protección fitosanitaria y la Oficina Internacional de Epizootias, para proteger, respectivamente, la sanidad humana, vegetal y animal.

La FAO apoya un sistema de evaluación de base científica que determine objetivamente los beneficios y riesgos de cada organismo modificado genéticamente. Para ello hay que adoptar un procedimiento prudente caso por caso para afrontar las preocupaciones legítimas por la bioseguridad de cada producto o proceso antes de su homologación. Juntamente con la Organización Mundial de la Salud, la FAO proporciona la secretaría de la Comisión del Codex Alimentarius que acaba de establecer un Grupo de Acción Intergubernamental Especial sobre Alimentos obtenidos por medios biotecnológicos, en el que expertos designados por los gobiernos elaborarán normas, directrices o recomendaciones, según proceda, para alimentos derivados de biotecnologías o caracteres introducidos en alimentos por métodos

biotecnológicos. La Comisión del Codex Alimentarius está estudiando también el etiquetado de alimentos derivados de biotecnologías para permitir al consumidor hacer una elección con conocimiento de causa (Cátedra de Biotecnología, 2002).

La Comisión del Codex Alimentarius creada en 1962, tiene como objetivo primordial vigilar la salud de los consumidores y auspiciar instancias que regulen a nivel mundial la producción de alimentos, en concordancia con los diversos tratados internacionales que rigen el comercio y el movimiento transfronterizo de granos a granel, como se va perfilando el Protocolo de Cartagena, al respecto de los granos transgénicos, ya que una proporción importante de los graneles que actualmente se comercian alrededor del mundo son OGM's. Es esta comisión la que ha acogido la discusión acerca del etiquetado (SIMBIOSIS, 2000).

El etiquetado de alimentos provenientes de plantas y animales genéticamente modificados ha adquirido una enorme importancia. Algunos consumidores y grupos de consumidores consideran que tienen derecho a saber si se empleó la ingeniería genética en la producción de un alimento. Incluso hay quienes desean poder elegir un alimento con base en la forma en que fue producido, y otros que creen que es necesario colocar etiquetas que informen a los consumidores sobre los alérgenos potenciales. Otros más consideran que no es necesario el etiquetado si los alimentos son básicamente equivalentes en su composición.

Como respuesta a las inquietudes generadas en torno a la liberación de productos transgénicos, los gobiernos en distintos continentes están respondiendo con iniciativas de etiquetado, con el objeto de identificar en el mercado a los alimentos derivados de los OGM's. Existen diferentes políticas acerca del etiquetado según el país del que se trate.

En la *Unión Europea* conformada por los siguientes Estados Miembros: Alemania, Austria, Bélgica, Dinamarca, España, Finlandia, Francia, Grecia, Holanda, Irlanda, Italia, Luxemburgo, Portugal, Reino Unido y Suecia, existen tres regulaciones

que gobiernan el etiquetado de alimentos e ingredientes derivados de OGM's y que son aplicables en todos los Estados Miembros. Según *GeneScan USA* (2002) los productos deben etiquetarse como "conteniendo organismos genéticamente modificados" sí al menos se establecen en alguno de los dos criterios propuestos por la Comisión Europea (Commission Regulation No. 49/2000). Es de aplicación en los alimentos destinados al consumo humano y fabricados, total o parcialmente, a partir de soja o maíz modificado genéticamente.

Los *Estados Unidos de Norte América*, a diferencia de la Unión Europea, las agencias regulatorias de este país consideran a los OGM's como un producto más en el mercado de alimentos que debe sujetarse a los mismos procedimientos de análisis de inocuidad estipulados para los productos no transgénicos. Desde 1992, la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) no ha establecido el etiquetado de alimentos que incluyan OGMs a menos de que "el alimento difiera de su contraparte convencional de tal forma que el nombre usual no pueda aplicarse al nuevo alimento, o en si en su uso existe algún riesgo ante el cual los consumidores deban ser alertados" (SIMBIOSIS, 2000)

En los países que pertenecen a *América Latina*, las legislaciones sobre bioseguridad se encuentran en desarrollo y algunos detalles se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Reglamentaciones sobre Bioseguridad en América Latina

País	Regulaciones Sobre Bioseguridad	Organizaciones Responsables	Status
Argentina	Lineamientos técnicos aprobados.	Comité Supervisor Nacional de Agricultura y Biotecnología, CONABIA.	A nivel de lineamientos técnicos.
Belize	No existen lineamientos técnicos.	Comité Nacional de Bioseguridad.	La Legislación se encuentra en preparación.
Bolivia	No existen lineamientos técnicos.		
Brazil	Lineamientos técnicos en preparación.	El Comité Nacional de Bioseguridad se encuentra en desarrollo.	Legislación establecida desde 1995.
Chile	Lineamientos técnicos aprobados.		La Legislación se encuentra en preparación.
Colombia	Lineamientos técnicos en preparación.		
Costa Rica	Lineamientos técnicos aprobados.	Comité Nacional de Bioseguridad.	La Legislación se encuentra en preparación.
Cuba	Lineamientos técnicos aprobados.	Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente.	
Guatemala	Lineamientos técnicos en preparación.	Comité Nacional de Bioseguridad, CONBIOTEC	
México	Lineamientos técnicos aprobados.	Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y Organismos Genéticamente Modificados.	Norma para liberación de plantas transgénicas y Iniciativas de Ley en discusión
Paraguay	No existen lineamientos técnicos.		
Perú	Lineamientos técnicos en preparación.	El Comité Nacional de Bioseguridad se encuentra en desarrollo, IBC-CPI.	

Adaptada a partir de: Kathen, A. Report on the Deliberate Release of Transgenic Crops in Developing Countries. <http://www.foeeurope.org/biotechnology/workshop%5Ftext5.htm>

El protocolo de Cartagena (Bioseguridad), surgió a partir del Convenio sobre la Diversidad Biológica, firmado por gobiernos de todo el mundo en la Cumbre de la Tierra el 5 de junio de 1992 en Río de Janeiro. Este constituye un convenio internacional entre

los países que forma parte de la Convención de las Naciones Unidas sobre Diversidad Biológica.

El protocolo de Bioseguridad establece las reglas para el movimiento transfronterizo de organismos vivos modificados genéticamente que puedan afectar en forma negativa la conservación y utilización sostenible de la biodiversidad (Álvarez y Gutiérrez, 2002).

Para la evaluación de los productos alimenticios se ha introducido el concepto de "equivalencia sustancial", según el cual, si un alimento procedente de la nueva biotecnología se puede caracterizar como equivalente a su predecesor convencional, se puede suponer que no plantea nuevos riesgos, y por lo tanto, es aceptable para consumo. Este concepto fue introducido por la OCDE en 1993 (antes de la comercialización de ninguna planta genéticamente manipulada), tras varios años de trabajos de numerosos expertos de muchos países. En 1996 la OMS (Organización Mundial de la Salud de las Naciones Unidas) y la FAO (Food & Agriculture Organization de las Naciones Unidas) recomendaron su adopción como base para los estudios de seguridad alimenticia de los OGM's. La propia OCDE sigue profundizando en este enfoque, en un intento de mejorarlo, de modo que en la actualidad se están desarrollando nuevas metodologías de evaluación que incluyen la identificación de niveles de nutrientes, antinutrientes y posibles toxinas y alérgenos en todo tipo de plantas de cultivo (SIMBIOSIS, 2000).

En Costa Rica, la ley de Protección Fitosanitaria No. #7664 de 1997, por medio del Decreto No. 26921-MAG del 22 de mayo de 1998, en el título VIII, establece las funciones de la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad en lo referente a la regulación de la importación, movilización, experimentación, liberación al ambiente, multiplicación, comercialización y uso de plantas transgénicas y otros organismos por técnicas de Ingeniería Genética. La Comisión está compuesta por representantes del Poder Ejecutivo y Académico del país.

Los aspectos de la reglamentación Decreto #26921 son:

- Permiso Fitosanitario para la Importación de Organismos vivos modificados (OVM).
- Certificación Fitosanitaria de Liberación al Ambiente.
- Registro de los vegetales transgénicos, OGM's o sus productos
- Almacenamiento y ubicación del material transgénico
- Supervisión oficial con base en protocolos y evaluación del riesgo y la coordinación con otras instituciones
- Movilización dentro del territorio nacional

Según May (2002) la supervisión de proyectos con OVM's en Costa Rica esta a cargo de la Dirección de Protección Fitosanitaria, la Oficina Nacional de Semilla y la Comisión Técnica Nacional de Bioseguridad. Esta última tiene como objetivo asesorar en materia de bioseguridad a las instituciones oficiales encargadas de promover y regular el uso e intercambio de O.V.M's. obtenidos por técnicas de ingeniería genética.

Dentro de las funciones de la Comisión están:

- Asesorar a instituciones encargadas de emitir autorizaciones para importar, experimentar, movilizar, liberar al ambiente, multiplicar y comercializar plantas (O.V.M's) obtenidos por técnicas de ingeniería genética
- Elaboración de las evaluaciones del riesgo
- Elaborar legislación para regular la importación, movilización, experimentación y uso de plantas transgénicas

Detección de Organismos Modificados Genéticamente

Una variedad genéticamente modificada puede distinguirse de su contraparte convencional mediante pruebas que detecten a las nuevas proteínas (pruebas basadas en proteínas) determinadas por el ADN introducido, o mediante la identificación del ADN introducido en sí (pruebas basadas en el ADN).

Según Holst-Jensen (2001) la mayoría de los métodos desarrollados para la detección de OMG's o sus derivados están enfocados en la detección de ADN, mientras que solo unos pocos métodos han sido desarrollados para la detección de proteínas o ARN. Esto por varias razones, entre las que están que el ADN puede ser purificado y multiplicado en billones de copias en poco tiempo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. El proceso de multiplicación de ARN y proteínas es más complicado y lento. El ADN es una molécula muy estable mientras que el ARN es inestable y la estabilidad de las proteínas varía y depende del tipo de proteína.

Métodos en la detección de proteínas transgénicas

- **Ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA)**

Esta técnica ha sido ampliamente aceptada y usada en varios análisis como la detección de patógenos y micotoxinas. En la prueba ELISA para productos modificados genéticamente la proteína nueva que es codificada por el gen insertado, es aislada y los anticuerpos son acoplados a estructuras específicas de su superficie. Si la proteína esta presente, estos reaccionan con los anticuerpos blanco resultando en un cambio de color (GeneScan USA, 2002).

En la figura 6 se muestra la prueba ELISA tanto positiva como negativa. Si la proteína blanco esta presente estas reaccionan con anticuerpos específicos resultando en un cambio de color.

Fuente: University of Arizona, 1998. <http://www.biology.arizona.edu>

Figura 6. Representación del ensayo enzimático inmunoabsorbente (ELISA) tanto negativo como positivo

- **Banda de flujo lateral**

Este procedimiento representa una alternativa a la técnica de ELISA. La Banda de Flujo Lateral utiliza una combinación del anticuerpo específico para la proteína de interés (llamado anticuerpo de captura) con un anticuerpo conjugado que es capaz de generar una reacción colorimétrica (llamado anticuerpo de detección), el cual permite visualizar la presencia de la proteína deseada en la muestra analizada (Biotechnology, 2000).

Comercialmente existen pruebas diseñadas para la detección de proteínas específicas mediante este sistema de bandas de flujo lateral. Una de estas es el sistema *TraitCheck* comercializado por *Strategic Diagnostic*.

- **Strategic Diagnostics: SISTEMA TraitCheck**

Esta compañía ofrece una variedad de herramientas y servicios para simplificar el proceso de rastreo e identificación de características de valor en los cultivos, entre otros. Provee pruebas como las bandas TraitCheck para la detección de OMG's de

forma rápida, fácil y confiable. Cada prueba esta diseñada para la detección de proteínas específicas en semillas, tejido vegetal y granos.

TraitCheck es un proceso rápido que genera resultados en cinco minutos tanto en el campo como en el laboratorio, y esta basado en un 99.9% de precisión en la detección de proteínas.

Principio del ensayo

Este ensayo utiliza un doble anticuerpo. Los anticuerpos específicos para la proteína blanco son acoplados a un reactivo de color e incorporados en las bandas de flujo lateral. Cuando la banda es colocada dentro de una cantidad de muestra que contiene dicha proteína ocurre una reacción entre los anticuerpos y la proteína. En la figura 7 se muestra esquemáticamente la función de la prueba. La membrana contiene dos zonas de captura, una para la proteína blanco otra para el reactivo de color. Esas zonas de captura adquieren un color rojizo cuando los anticuerpos y/o los reactivos de color son capturados en zonas específicas de la membrana. La presencia de una sola línea indica que la muestra es negativa y la presencia de dos líneas indica un resultado positivo.

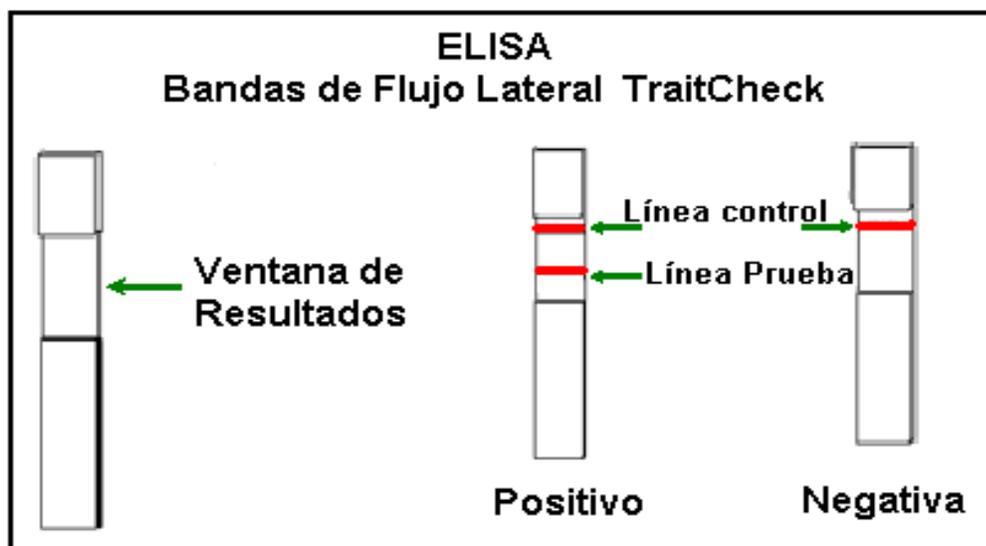


Figura 7.

Modo de acción bandas de flujo lateral TraitCheck

El uso de estas bandas requiere la maceración de granos y la inmersión de los mismos en soluciones amortiguadoras, seguido de la colocación de la banda dentro de la muestra que tienen un área tratada con anticuerpos específicos. Un cambio de color en el área tratada indica una reacción positiva de la proteína blanco. Una línea de control en otra área de la membrana indica que la prueba esta funcionando correctamente.

Dentro de las pruebas que provee esta compañía están: TraitCheck Bt1 Corn Grain y TraitCheck RUR Bulk Soybean (Strategic Diagnostic, 2000).

La primera esta diseñada para detectar la proteína Cry1Ab codificada por un gen proveniente de *Bacillus thuringiensis (Bt)*. Este gen ha sido incorporado en maíz YieldGard® marca registrada de Monsanto y Novartis; KnockOut® de Novartis y NatureGard® de Mycogen, para conferirles resistencia a insectos. La intención del uso de esta prueba es la determinación cualitativa de la proteína Cry1 Ab en muestras de maíz, tanto en el laboratorio como en el campo. Esta prueba puede rastrear el maíz YieldGard® (MON810 y Bt11) pero también puede detectar el maíz KnockOut® y NatureGard® en niveles específicos.

La prueba TraitCheck RUR Bulk Soybean esta diseñada para la detección de la proteína CP4 EPSPS derivada de la cepa CP4 de *Agrobacterium sp.* Este gen esta incorporado en los cultivos Roundup Ready® incluyendo soya, canola, algodón y otros.

Métodos basados en la detección del ADN introducido

- **Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como PCR por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue ideada en 1989 por

Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho invento (Entrala, 2000; Newton y Graham, 1994; Erlich, 1989)

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada Taq polimerasa. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus aquaticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 - 85 ° C) (Entrala, 2000).

Esta se basa en la repetición de un ciclo formado por las siguientes tres etapas:

1. **Desnaturalización** del ADN doble cadena

La doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93-97°C).

2. **Hibridación** de los cebadores a la zona específica de cada una de las hebras

Los cebadores se unen a las zonas complementarias que flanquean el fragmento que se quiere amplificar. Se realiza a una temperatura de 50-65°C.

3. **Extensión** del cebador por actuación de la DNA polimerasa

En esta se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5'→ 3' mediante la enzima DNA polimerasa, la cual incorpora los desoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde (Mas *et al*, 2001). La figura 8 muestra los diferentes pasos que se dan durante la reacción en cadena de la polimerasa.

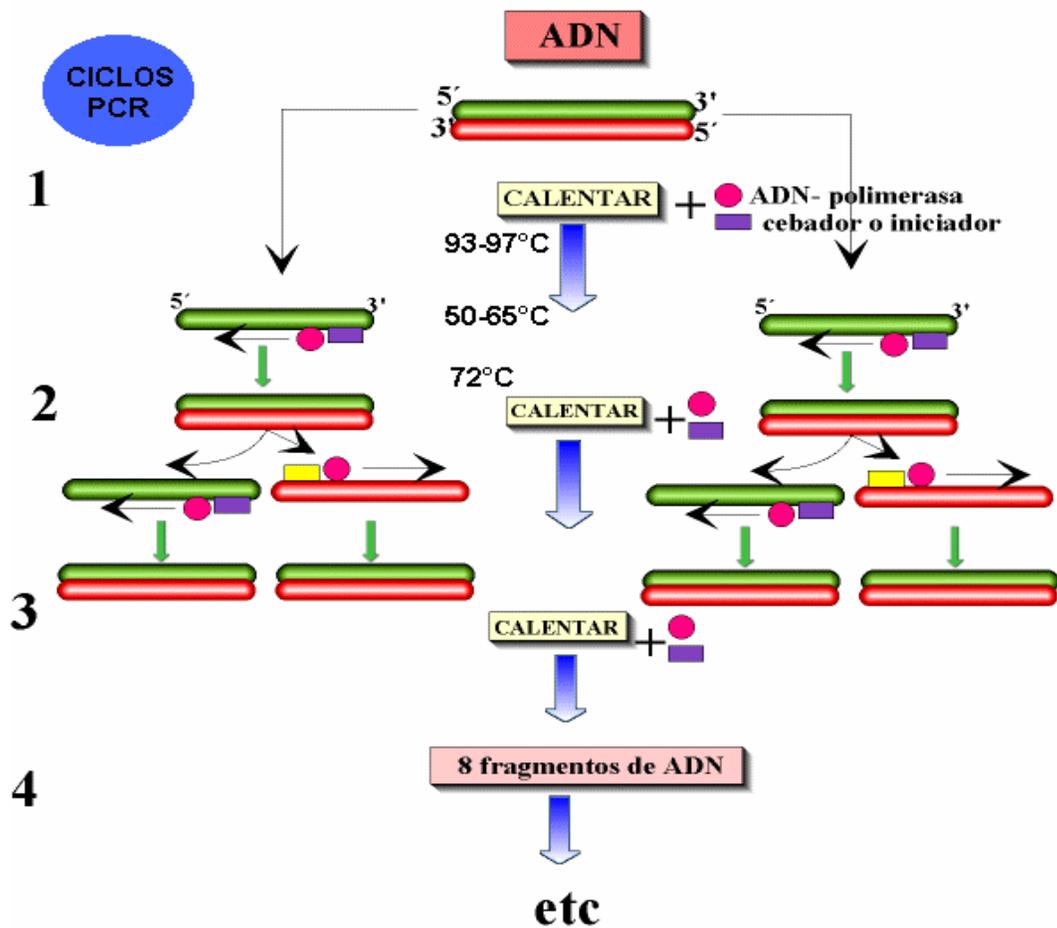


Figura 8. Esquema general de los pasos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La aplicación de la PCR al diagnóstico tiene muchas ventajas como la elevada especificidad y sensibilidad, rapidez en la obtención de datos, posibilidad de detectar organismos no cultivables o no viables, diferenciación de cepas. Se puede conseguir aún mayor sensibilidad con la nested PCR, que consiste en utilizar una alícuota del producto de una PCR como molde para una segunda PCR, empleando imprimadores internos. Además de una mayor sensibilidad (alrededor de 100 veces más) se consigue mayor especificidad, puesto que son 4 los imprimadores empleados a lo largo del proceso de amplificación. El principal inconveniente de la nested PCR viene dado precisamente por su elevada sensibilidad. Productos de la 1ª amplificación pueden introducirse inadvertidamente en la 2ª reacción y ser amplificados, generándose

resultados de falsos positivos. Cuando se utiliza esta técnica hay que ser muy estricto en tomar precauciones que minimicen los resultados falsos positivos.

El ARN también puede servir de molde para la PCR, pero se necesita realizar un paso previo a la PCR, en el que se sintetiza una cadena de ADN complementaria al ARN mediante la acción de un enzima denominado transcriptasa reversa. La transcripción reversa seguida de PCR (RT-PCR) permite la detección de virus ARN (Romero *et al*, 2002)

La detección del producto de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se realiza normalmente mediante corrida electroforética. Dependiendo del tamaño de la amplificación y de la resolución que se desee se usan diferentes geles (agarosa, poliacrilamida) a distintas concentraciones. La posterior visualización se puede realizar con bromuro de etidio (lámpara de luz UV), tinción de plata, fluorescencia y radiactividad (radiografía) (Mas, 2001).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa es una técnica muy sensible, por lo que es de gran importancia evitar contaminaciones, ya que es posible que el ADN no deseado (aunque se encuentre en una cantidad muy pequeña) se amplifique y obtengamos un resultado que no es real. Según Erlich (1989) dada la capacidad de la PCR de sintetizar millones de copias de ADN, la contaminación de las muestras con productos de amplificación previos o con material de fuentes exógenas es un problema potencial.

Varios autores citan posibles medidas para reducir al máximo la contaminación antes, durante y después de la utilización de esta técnica, entre las que están la separación física de áreas pre- y post- PCR, uso de puntas de micropipeta con filtros resistentes a aerosoles, uso de cabinas de flujo laminar y cambio frecuente de guantes, que deben adoptarse de forma rutinaria. Hay además, métodos preventivos específicos para la destrucción de los ADNs contaminantes mediante digestión enzimática o por

irradiación con luz U.V. Es fundamental el uso de controles negativos a lo largo de todo el proceso, para detectar los posibles falsos positivos.

- **Southern Blot**

La Southern blot fue inventada por EM Southern en 1975, lo cual significa la inmovilización de bandas simples de ácidos nucleicos sobre un soporte sólido. El primer paso es preparar el ADN el cual es digerido por enzimas de restricción y separado en fragmentos mediante electroforesis. Luego es transferido a una membrana para la hibridación (Wurtzel y Mathews, 2002). Las moléculas de ADN se transfieren a membranas bien por capilaridad o aplicando corriente eléctrica y se añade la sonda. Esta al ser radioactiva se unirá a los fragmentos con los que tenga complementariedad y se detectan por autorradiografía (Madigan *et al*, 1999).

Esta técnica consta básicamente de las siguientes etapas:

1. Digestión del ADN con enzimas de restricción tras conseguir extraer el ADN
2. Separación de los fragmentos obtenidos por medio de una electroforesis en gel de agarosa
3. Desnaturalización de los fragmentos separados y cortados
4. Transferencia de las cadenas simples a una membrana de nitrocelulosa o nylon y fijación de las mismas por medio de calor (80°C)
5. Prehibridación con sondas de ADN inespecífico para bloquear los lugares de unión inespecíficos que pudiera haber en la membrana.
6. Marcaje de la sonda con nucleótidos radioactivos (P^{32} normalmente)

7. Hibridación de la sonda marcada y desnaturalizada con los fragmentos de ADN fijados a la membrana, y lavado de la membrana para eliminar el exceso de sonda o aquellas que hayan hibridado mal
8. Revelado en placa radiográfica e interpretación de los resultados (Entrala, 2000).

Los cultivos modificados genéticamente están siendo introducidos sorprendentemente en la cadena alimenticia mundial. La constante preocupación de los consumidores y agencias reguladoras en varios países han creado la necesidad de contar con pruebas confiables y exactas para la detección de componentes modificados genéticamente dentro de los alimentos. Existen compañías que se dedican a la fabricación de pruebas comerciales de este tipo, tal es el caso de *GeneScan Europe*.

- ***GeneScan Europe***

GeneScan Europe AG es uno de los principales proveedores a nivel mundial de sistemas biomoleculares. Este provee sistemas microbiológicos y moleculares para el análisis de productos alimenticios y nuevos materiales para la identificación de bacterias que dañan los alimentos y/o causan enfermedades. Un servicio clave de esta empresa involucra el análisis de materiales nuevos para la detección de OGM's, los que son considerados sistemas confiables. Las pruebas detectan la presencia de secuencias específicas de ADN que son utilizadas generalmente en la transformación genética.

La empresa tiene operando laboratorios en diferentes países como por ejemplo Alemania, Francia, Estados Unidos, Australia, China y Brasil. De los cuales los laboratorios de Bremen y Berlin están certificados de acuerdo al ISO 9001 y los de Bremen y Freiburg de acuerdo al ISO 17025.

El *GMO Screen Advanced Screening System Basic* es capaz de rastrear las dos secuencias reguladoras utilizadas con mayor frecuencia en las plantas modificadas genéticamente, el promotor CaMV 35S del virus del mosaico de la coliflor y el terminador *Nos* del gen de la Nopalina Sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*. Estas secuencias funcionan como sitios de regulación para el “encendido o apagado” de los nuevos genes insertados y permiten la detección de una gran variedad de plantas genéticamente modificadas.

Las principales ventajas de este método son:

- Los productos de amplificación generados son pequeños y de igual tamaño permitiendo la detección de las secuencias blanco de los OMG's aún en alimentos altamente procesados
- Contiene una reacción control que puede amplificar una secuencia del cloroplasto de 199pb.

Las pruebas están diseñadas para la detección de ADN de OMG's de tejido vegetal, semillas, comidas, harinas, alimentos procesados y no procesados, aditivos alimenticios y aceites no refinados.

El cuadro 4 muestra algunas de las plantas modificadas que pueden ser detectadas con el sistema *GMOScreen Advantage Screening*.

Cuadro 4. Plantas modificadas genéticamente conteniendo el promotor 35S o el terminador *nos* que pueden ser detectadas con el sistema *GMOScreen Advantage Screening*.

VARIEDAD DE OMG	PROMOTOR 35S	TERMINADOR NOS
MAÍZ		
BT 11	√	√
YieldGard™ Mon (810/809)	√	√
Roundup Ready™ (GA21)	--	√
Seed Link™	√	√
Start Link™	√	√
B 16	√	--
Bt-Xtra™	√	--
Maximizer™ BT176	√	--
LibertyLink™ T25	√	--
YieldGard™ Mon 810	√	--
Pioneer-MS	√	--
SOYA		
Roundup Ready™	√	√
DuPont	√	√
Variedad Liberty Aventis	√	√
PAPA		
NewLeaf™	√	√
NewLeaf™ Y	--	√
NewLeaf™ plus	--	√
CANOLA		
LibertyLink™	√	--
Seed Link™	--	√
Laurical	√	--
TOMATE		
Zeneca	√	√
FlavrSavr™	√	--
OTROS		
Remolacha LibertyLink™	√	--
Papaya SunUp	√	--
Remolacha Roundup Ready™	√	--

Fuente: GeneScan, 2000

El primer paso en la detección de OMG's es el aislamiento del ADN de las muestras. El tipo de aislamiento depende del tipo de muestra a analizar. El segundo paso involucra la amplificación de secuencias específicas de ADN por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR representa un ensayo extremadamente sensible y específico. La aplicación de esta demanda un control especial y estricto para evitar que en la prueba ocurran resultados falsos negativos o positivos. Para tal fin el sistema *GMOScreen* provee una reacción control de una secuencia común del cloroplasto la cual se encuentra natural y exclusivamente en las plantas. La detección de este fragmento indica entre otras cosas que la PCR no fue inhibida por componentes de la muestra original.

El tercer paso es la detección de los fragmentos por medio de una electroforesis en geles de agarosa y la comparación e interpretación de resultados. La presencia de una o las dos secuencias reguladoras indican fuertemente que el alimento analizado es modificado genéticamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Detección mediante el ADN introducido**

Selección y recolección de las muestras

Se seleccionaron productos y cultivos que pudieran ser o contener material modificado genéticamente (Cuadro 8). Estos se escogieron al azar en diferentes puntos de venta y en distintas presentaciones, ya sea procesados, enlatados, frescos o sin procesar. Los cultivos de maíz fueron tomados de Santa Cruz, Guanacaste y de San Carlos, Alajuela. Por otro lado, el cultivo de algodón modificado fue suministrado por el Ing. Walter Quirós, Oficina Nacional de Semillas, San José, Costa Rica.

Extracción de ADN

Método de Extracción Estándar

La identificación de los organismos modificados genéticamente se llevó a cabo utilizando el sistema *GMOScreen Advanced Screening* (GeneScan, 2000), el cual incluye un método de extracción estándar (Figura 17, Anexo 1). Este método consistió en homogeneizar las muestras mecánicamente en un mortero con nitrógeno líquido o en un procesador de alimentos según el tipo de muestra. Se colocaron 2 g de muestra en un tubo de reacción de 15 ml, y se mezcló con 10 ml de *buffer* lisis (GeneScan, 2000). Las muestras fueron incubadas durante 1 h a 60 °C en agitación constante en un agitador orbital (*Shaker Orbital Precision Scientific*). Se transfirió 1 ml a un tubo de reacción nuevo y se agregaron 10 µl de Proteínasa K (20 mg/ml), se mezcló y se incubó de nuevo 1 h a 60 °C en constante agitación. Para las muestras de grano grueso, se agregaron 50 µl de Proteínasa K y se incubó por 2 h.

Luego de la incubación, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos, transfiriendo 800 µl del sobrenadante a un tubo de reacción nuevo con 600 µl de cloroformo. Se mezcló y se centrifugó nuevamente por 15 minutos, se transfirieron 600 µl del sobrenadante a un tubo nuevo. Al control de extracción se le agregó 2 µl de glicógeno. Se adicionaron 480 µl de isopropanol mezclándose por inversión y se incubaron por 30 minutos para precipitar el ADN. Se centrifugó por 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Se adicionaron 500 µl de alcohol al 75 %; se mezcló en el vortex y se centrifugo por 5 minutos, se descartó el sobrenadante completamente para luego centrifugar nuevamente durante 1 minuto y remover cuidadosamente el remanente de sobrenadante. Como último paso se disolvió el botón de ADN en 100 µl de agua estéril desionizada.

Las muestras se procesaron por duplicado, paralelo a estas se procesó un control de extracción con el fin de verificar la pureza de la extracción. Todas las muestras incluyendo el control de extracción tuvieron un tratamiento de extracción idéntico, con la excepción de que a este último no se le adicionó ningún producto.

Método de Extracción mediante columnas

El método de extracción propuesto por la prueba *GENESpin* (Figura 18, Anexo 1) (GeneScan Europe, 2001) para el aislamiento de ADN de alta calidad a partir de alimentos consta de los siguientes pasos: se homogeneizó aproximadamente 0.2 g de muestra mecánicamente en un mortero con nitrógeno líquido o en un procesador de alimentos según el tipo de muestra. Se transfirió la muestra homogeneizada a un tubo de 1.5 ml, se le adicionó 550 µl de *buffer* lisis CF (GeneScan Europe, 2001) previamente calentado a 65 °C. Se mezcló cuidadosamente, se le agregaron 10 µl de Proteinasa K y se mezcló nuevamente durante 3 segundos. La mezcla se incubó a 65 °C durante 30 minutos y se centrifugó por 10 minutos.

Luego de la incubación se transfirieron 300 μ l del sobrenadante a un tubo nuevo, agregándole 300 μ l de buffer C4 (GeneScan Europe, 2001) y 200 μ l de etanol. Se mezcló en un vortex durante 30 segundos.

La columna *GENESpin* fue colocada dentro de un tubo de 2 ml, dispensando 750 μ l de la mezcla dentro de la columna. Se centrifugó por 1 minuto y se descartó el filtrado. Seguidamente se adicionaron 400 μ l de buffer CQW (GeneScan Europe, 2001) dentro de la columna y se centrifugaron los tubos durante 1 minuto descartando el filtrado. Se adicionaron 700 μ l de buffer C5 (GeneScan Europe, 2001) dentro de la columna y se centrifugó durante 1 minuto más.

Se adicionó nuevamente buffer C5 (GeneScan Europe, 2001) (200 μ l) dentro de la columna, se centrifugó durante 2 minutos a alta velocidad para remover el buffer C5 completamente.

Posteriormente se transfirió la columna a un tubo nuevo, se le agregó 100 μ l de buffer de elusión CE (precalentado a 70°C) (GeneScan Europe, 2001) sobre la columna y se incubó durante 5 minutos. Por último se centrifugó 1 minuto a alta velocidad para recuperar el ADN. La representación esquemática de ambos métodos de extracción se encuentran en el Anexo 1.

Cuantificación de ADN

Luego de la extracción del ADN se procedió a la cuantificación del mismo, llevada a cabo mediante dos métodos.

Cuantificación por electroforesis en gel de agarosa

Se utilizó un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 1X, pH 8.0, en el cual, se cargaron 10 μ l de la solución de ADN y se comparó con 10 μ l del ADN patrón de

cantidad (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (DNA Amount Standar). El gel fue revelado con una solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante aproximadamente 10 minutos. La estimación de la cantidad de ADN presente en la muestra se realizó comparando la fluorescencia emitida por esta y por el ADN estándar.

Cuantificación por espectrofotometría

La cuantificación se realizó en el espectrofotómetro *GeneQuant RNA/DNA calculator* (Pharmacia Biotech, 80- 2105-20) utilizando un rango de luz UV. Debido a los anillos presentes en las bases nitrogenadas del ADN, esta molécula tiene absorbancia máxima a 260 nm, además de proporcionar la concentración de ADN en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, también genera la concentración de ARN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$), proteínas (mg/ml), el porcentaje de pureza y la relación existente entre la concentración de proteínas y de ADN presentes en las muestras.

Durante las primeras extracciones se cuantificó con ambos métodos con el fin de compararlos y analizar su relación. Tomando en cuenta este análisis se consideró solo la cuantificación por espectrofotometría durante el resto de la investigación. Todas las muestras a analizar se ajustaron a una concentración de 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ con agua bidestilada estéril antes de la amplificación del ADN mediante PCR.

Detección mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

En esta prueba se amplificó cada muestra a analizar con una mezcla de reacción que amplifica una región del promotor 35S y una región del terminador nos. Además también se amplificó una reacción control perteneciente a una secuencia común del cloroplasto. En cada PCR se realizan amplificaciones con controles negativos (agua bidestilada estéril) y controles positivos (Soya *Roundup Ready*TM y Arroz transgénico experimental).

Al llevarse a cabo varias reacciones en paralelo y con el fin de minimizar los errores de pipeteo se utilizó una "master mix" o mezcla de reacción que contenía todos los reactivos necesarios para realizar la PCR excepto el ADN y la *taq* polimerasa, esta mezcla es provista por el sistema *GMOScreen* (PREMaster buffers).

Para la preparación de las mezclas de reacción se descongeló un vial con buffer que permite la amplificación de la secuencia común del cloroplasto CP/A-PREMaster, uno que permite la amplificación de la secuencia reguladora del promotor 35S (35S-P/C PREMaster) y otro que permite la amplificación del terminador NOS (NOS-T/C PREMaster). Estos se mezclaron cuidadosamente y se tomó el volumen requerido según la cantidad de reacciones a realizar, transfiriendo la cantidad a un tubo de 1.5 ml. Todos los pasos se realizaron sobre hielo. Se le adicionó 0.1 μ l de *taq* polimerasa por cada reacción y se mezcló mediante pipeteo. Posteriormente se alicuotó 20 μ l de cada mezcla de reacción en tubos de PCR rotulados. Se adicionaron 5 μ l de solución de ADN y 3 gotas de aceite mineral.

Se analizaron dos perfiles térmicos diferentes, mostrados en el cuadro 5:

Cuadro 5. Perfiles térmicos estudiados para la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Perfil Térmico 1			Perfil Térmico 2		
94°C	3 min		94°C	3 min	
94°C	25 seg	} 10 ciclos	94°C	25 seg	} 20 ciclos
62°C	35 seg		62°C	35 seg	
72°C	45seg		72°C	45seg	
94°C	25 seg	} 40 ciclos	94°C	25 seg	} 20 ciclos
58°C	35 seg		58°C	35 seg	
72°C	45 seg		72°C	45 seg	
72°C	3 min		72°C	3 min	
20°C	∞		20°C	∞	

- **Método de detección mediante proteínas**

Se realizaron pruebas de bandas de flujo lateral para la determinación cualitativa de proteínas específicas codificadas por los genes foráneos introducidos en maíz, soya, canola y algodón. La identificación de estas proteínas se llevó a cabo utilizando el sistema *TraitCheck* propuesto por Strategic Diagnostics Inc. (2000).

Detección de la proteína CP4 EPSPS

Mediante esta prueba se dio la determinación cualitativa de la proteína CP4 EPSPS producida por un gen derivado de *Agrobacterium sp.*

Selección y recolección de las muestras

Para la realización de la prueba se escogieron productos al azar que estuvieran basados en soya y se representan en el cuadro 6:

Cuadro 6. Muestras escogidas para la determinación cualitativa de la proteína CP4 derivada de *Agrobacterium sp.* (ITCR, 2002)

MUESTRA	CADUCIDAD	PROCEDENCIA
Carne de Soya	No Indicado	Macrobiótica
Harina de soya modificada, 2.5% GM	----	Leatherhead Food RA, Strategic Diagnostics Inc.
Harina de soya	12. 03	Macrobiótica
Leche de Soya	29. 12. 02	Macrobiótica

Esta prueba consta de bandas de flujo lateral, buffer de extracción, tubos para muestras y pipetas de transferencia utilizadas de la siguiente manera: se pesaron de 0.2 - 3g de muestra según el grado de procesamiento de la misma, se le adicionaron agua estéril hasta disolver totalmente la muestra.

Se transfirieron 0.5 ml de la mezcla con las pipetas proporcionadas por la prueba a un tubo de 1.5 ml y se le adicionaron 3 gotas de buffer TraitCheck. Se procedió a colocar las bandas de flujo lateral TraitCheck RUR dentro de la misma hasta que la línea de control fuera visible, aproximadamente 5 minutos.

Detección cualitativa de la proteína Cry1 AB

Por medio de esta prueba se dio la detección cualitativa de la proteína Cry1 AB derivado del gen proveniente de *Bacillus thuringiensis*.

Selección y recolección de las muestras

Para la realización de la prueba se escogieron al azar cultivos de maíz y/o subproductos los cuales se representan en el cuadro 7:

Cuadro 7. Muestras escogidas para la determinación cualitativa de la proteína Cry1 AB derivada de *Bacillus thuringiensis*. (ITCR, 2002)

MUESTRA	CADUCIDAD	PROCEDENCIA
Cultivo de Maíz B	----	Santa Cruz, Guanacaste
Cultivo de Maíz C	----	Santa Cruz, Guanacaste
Maíz no modificado	----	Donación de Argentina
Maíz cascado de mercado	----	Mercado Central de Cartago
Mazorca de maíz de supermercado	No indicado	Cipreses de Curridabat
Maíz transgénico 1% GM	----	Donación de Argentina

Se pesó de 0.2 a 2 g dependiendo del grado de procesamiento de la muestra a la cual se le adicionó 1 ml de buffer por cada gramo de muestra. Una vez disuelta la muestra se procedió a colocar una banda de flujo lateral TraitCheck dentro del tubo. La

banda se mantuvo hasta que la línea de control se hiciera visible en aproximadamente 5 minutos según la muestra.

En ambas pruebas la presencia de dos líneas rojas en la ventanilla de resultados indica que el ensayo fue positivo.

RESULTADOS

Selección y recolección de muestras

Las muestras y cultivos seleccionados con sus respectivas procedencias se muestran en el cuadro 8:

Cuadro 8. Productos y cultivos seleccionados al azar y su procedencia para la detección de material modificado genéticamente (ITCR, 2002).

MUESTRA	CADUCIDAD	PROCEDENCIA
Arroz transgénico experimental	----	----
Bizcochos de maíz y queso	29. 10. 02	Supermercado
Carne de Soya	No indicado	Macrobiótica
Crema de café	12. 05	Supermercado
Cultivo de Maíz A	----	San Carlos, Alajuela
Cultivo de Maíz B	----	Santa Cruz, Guanacaste
Cultivo de Maíz C	----	Santa Cruz, Guanacaste
Cultivo de algodón resistente a glifosato	----	Guanacaste
Fécula de maíz		Supermercado
Harina de maíz	19. 09. 02	Supermercado
Harina de soya	12. 03	Macrobiótica
Hojuelas de Maíz	14. 05. 03	Supermercado
Leche de soya	29. 12. 02	Macrobiótica
Leche de soya A		Seguro Social
Maíz dulce enlatado	12. 05	Supermercado
Maíz para palomitas	16. 07. 03	Supermercado
Mazorca de maíz de supermercado	No indicado	Cipreses de Curridabat
Maíz Cascado de mercado	----	Mercado Central de Cartago
Papas tostadas	08. 03	Supermercado
Tortillas de maíz	09. 07. 02	Supermercado
Tortillas tostadas de maíz	24. 10. 02	Supermercado

Extracción de ADN

Se realizaron 30 extracciones mostradas en el cuadro 9. Durante los primeros ensayos cada muestra se procesó por ambos métodos de extracción (estándar y columnas). Sin embargo, luego se procedió a extraer las muestras de alimentos complejos y/o altamente procesados solamente por columnas y las muestras de campo por medio del método de extracción estándar.

Cuadro 9. Cuantificación de las muestras extraídas según el método estándar o el método por columnas (ITCR, 2002)

MUESTRA	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	[ADN] (µg/ µl)	PROTEINAS (mg/ml)	% PUREZA
Maíz para palomitas 1	STD	0.409	0.3	107
Maíz para palomitas 2	STD	0.357	0.5	104
Maíz para palomitas	---	---	---	---
Harina de soya 1	STD	1.612	15.7	69
Harina de soya 2	STD	0.826	6.4	74
Harina de soya	Columna	2.042	1.1	109
Tortillas tostadas de maíz 1	STD	0.044	0	106
Tortillas tostadas de maíz 2	STD	0.088	0.1	107
Tortillas tostadas de maíz	Columna	0.008	0	134
Hojuelas de maíz 1	STD	0.035	0.2	78
Hojuelas de maíz 2	STD	0.149	0.6	88
Hojuelas de maíz	Columna	0	0.2	-796
Arroz Transgénico	STD	0.094	0.1	103
Arroz Transgénico	Columna	0.039	0.1	98
Tortillas de maíz	Columna	0.158	0.1	106
Carne de soya	Columna	1.06	0.1	112
Leche de soya	Columna	0.014	0	93
Harina de maíz	Columna	0.369	0.2	108

Continuación Cuadro 9

MUESTRA	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	[ADN] (µg/ µl)	PROTEINAS (mg/ml)	% PUREZA
Bizcochos de maíz	Columna	0.036	0.1	90
Papas tostadas	Columna	0.015	0.1	87
Fécula de maíz	Columna	0.173	2.7	90
Mazorca de supermercado	Columna	0.3	0.2	109
Maíz enlatado	Columna	0.002	0	-190
Leche de soya del seguro	Columna	0.656	0.2	111
Crema de café	Columna	0.007	0.1	75
Maíz cascado de mercado	Columna	0.119	0	111
Cultivo de maíz p de Guanacaste	STD	0.224	0.2	107
Cultivo de maíz J de Guanacaste	STD	1.270	10.7	80
Cultivo de maíz de Alajuela	STD	0.217	0.1	111
Algodón transgénico	STD	0.187	0	116

En la figura 9 se puede comprobar que la extracción de ADN tanto por el método estándar como por el método con columnas fue efectiva ya que se obtuvo siempre una cantidad mayor que la del ADN estándar provisto por el sistema *GMOScreen*.

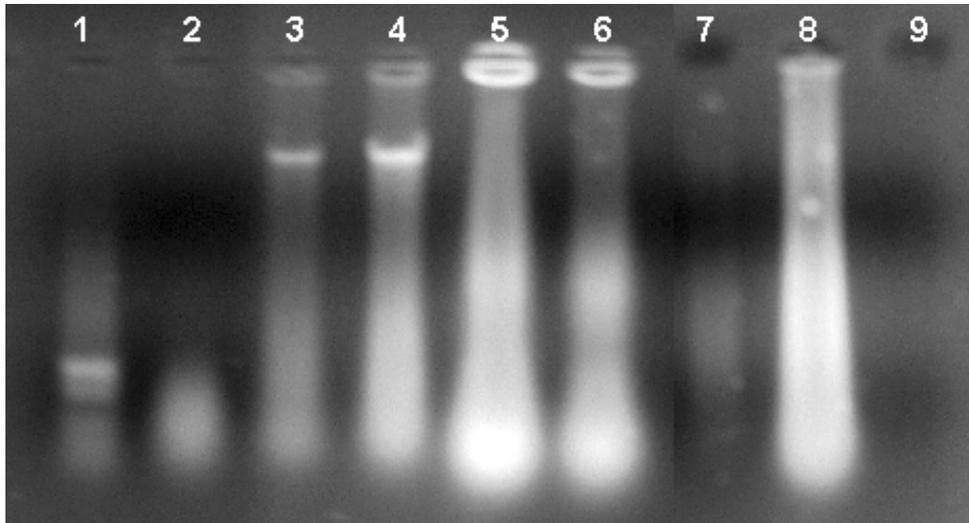


Figura 9. Cuantificación de ADN mediante geles de agarosa (ITCR, 2002). Carril 1: Marcador de peso molecular (*DNA Length Standard*); Carril 2: Control de cantidad (*DNA Amount Standard*); Carril 3 y 4: Maíz para palomitas método de extracción estándar (*GMOScreen*); Carril 5 y 6: Harina de soya, extracción estándar; Carril 7: Palomitas para maíz, extracción por columnas (*GENESpin*); Carril 8: Harina de soya, extracción por columnas y Carril 9: Control de extracción columnas

Cuantificación de ADN

En el cuadro 10 se compara la cantidad de ADN estimada con ambos métodos de cuantificación para seis diferentes extracciones.

Cuadro 10. Cantidad estimada de ADN mediante la técnica en geles de agarosa y por espectrofotometría de distintas muestras según el tipo de extracción utilizado. Cada muestra se procesa por duplicado (ITCR, 2002)

MUESTRA	TIPO DE EXTRACCIÓN	CONCENTRACIÓN ESTIMADA EN ng (Gel de agarosa)	CONCENTRACIÓN ESTIMADA EN ng (ESPECTROFOTOMETRO)
Maíz para palomitas 1*	Estándar	200	409
Maíz para palomitas 2*	Estándar	400	357
Maíz para palomitas	Columna	50	No indicado
Harina de soya 1*	Estándar	1000	1600
Harina de soya 2*	Estándar	600	826
Harina de soya	Columna	1500	2242

*El número 1 y 2 indican repeticiones de la misma muestra

La estimación de la cantidad de ADN presente en la mayoría de muestras analizadas se llevó a cabo mediante espectrofotometría utilizando el *GeneQuant Calculator*. En el cuadro 12 (Anexo 2) se muestra la cantidad de ADN de las muestras consideradas por este medio, además de la concentración de ARN, proteínas, el porcentaje de pureza y la relación, generadas también por este equipo. Se notó que a excepción de algunas, la mayoría de muestras analizadas tenían un alto porcentaje de pureza y una relación entre ADN y proteínas aceptable (1.8 - 2) y además se observa la diferencia entre la cantidad de ADN extraído por el método estándar y las columnas *GENESpin*. En la harina de soya y en las tortillas tostadas de maíz, las cuales fueron extraídas mediante los dos métodos, se determina que se obtiene un porcentaje de

pureza del ADN mayor por el método de extracción en columnas. Asimismo se obtuvo un porcentaje de pureza mayor al 90% en las tortillas de maíz, carne de soya, leche de soya, harina de maíz, bizcochos de maíz, fécula de maíz, mazorca de supermercado, leche de soya del Seguro Social y el maíz cascado del mercado. El ADN de las muestras frescas fue extraído por el método estándar en el que se refleja una alta pureza obtenida.

Detección mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para esta prueba se programó el termociclador (*Techne Genius*) con dos diferentes perfiles térmicos modificados con el fin de analizar cual generaba una amplificación más adecuada y por lo tanto un patrón de bandas más definido. Las modificaciones realizadas se consideraron tomando en cuenta estudios realizados anteriormente por Bogan (2002).

Las condiciones modificadas en cada perfil fueron principalmente el número de ciclos. La primer modificación realizada fue la de dividir los 50 ciclos establecidos en dos bloques donde el primero tenía una temperatura de hibridación de 62°C con 10 ciclos y el segundo bloque con una temperatura de hibridación de 58°C con 40 ciclos, los resultados generados por este perfil no fueron los esperados ya que no se obtuvo una buena amplificación de la región común del cloroplasto en varias muestras y además se obtuvieron productos inespecíficos. Estos resultados se muestran en la figura 10

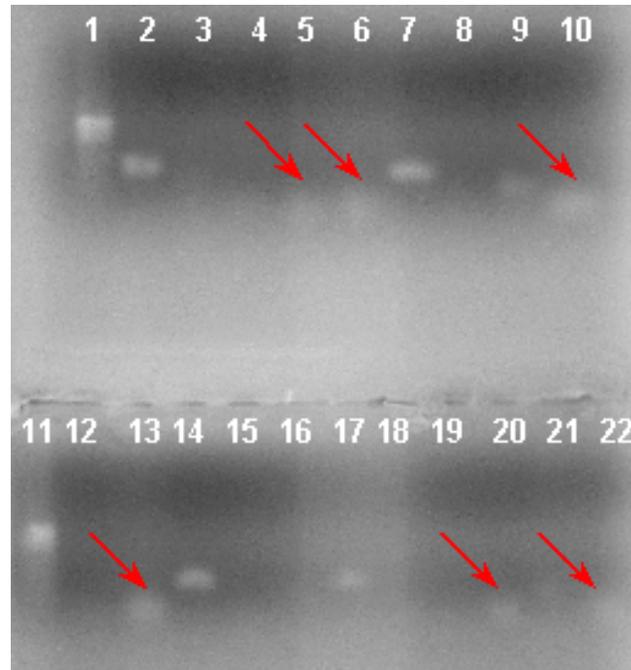


Figura 10. Análisis electroforético de una amplificación por PCR (ITCR, 2002). Carril 1: Marcador de peso molecular (*DNA Length Standard*); Carril 2-4: región del cloroplasto, 35S y NOS de maíz para palomitas respectivamente; Carril 5 y 6: Región cloroplasto y 35S Harina de soya extracción STD respectivamente; Carril 7-9: región del cloroplasto, 35S y NOS Harina de soya extracción columna respectivamente; Carril 10,12 y 13: región del cloroplasto, 35S y NOS control negativo respectivamente; Carril 11: marcador de peso molecular; Carril 14-16: región del cloroplasto, 35S y NOS maíz para palomitas extracción columnas; Carril 17-19: región del cloroplasto, 35S y NOS control de extracción y Carriles 20-22: región del cloroplasto, 35S y NOS control positivo (*Soya Roundup Ready*). La flecha roja indica los productos inespecíficos.

Para corroborar la ineficiente amplificación con este perfil térmico utilizado, se repitió la prueba bajo las mismas condiciones y con las mismas muestras. Este resultado mostrado en la figura 11 confirma lo anterior, ya que la región del cloroplasto y del terminador NOS para el control positivo no amplificaron y la región 35S amplificó pero de forma muy leve. Sin embargo, en este análisis electroforético la región del NOS para la harina de soya se muestra levemente lo cual sugiere que este producto podría ser o contener material modificado genéticamente.

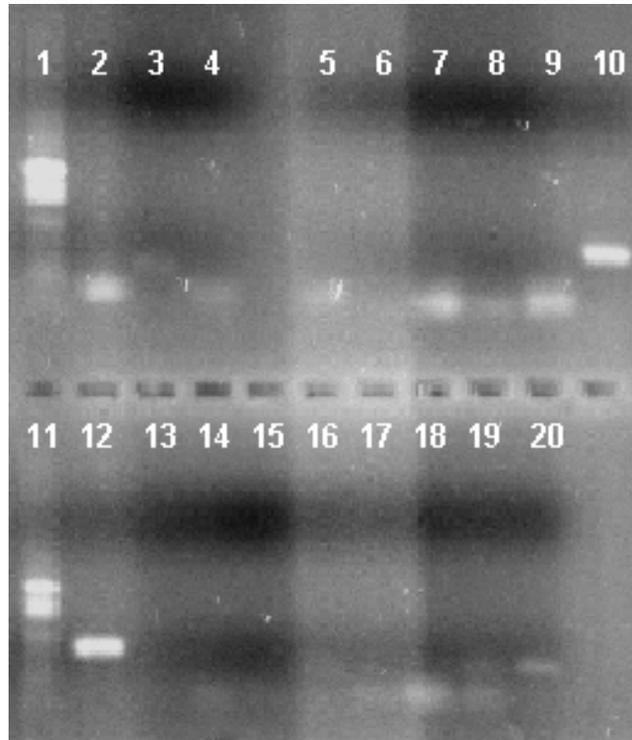


Figura 11. Análisis electroforético de una amplificación por PCR (ITCR, 2002).

Carril 1: Marcador de peso molecular (*DNA Length Standard*); Carril 2-4: región del cloroplasto, 35S y NOS control positivo (*Soya Roundup Ready*) respectivamente. Carril 5 y 6: Región 35S y NOS control de extracción respectivamente; Carril 7-9: región del cloroplasto, 35S y NOS control negativo respectivamente; Carril 10, 19, 20: región del cloroplasto, 35S y NOS Harina de soya extracción columna respectivamente; Carril 11: marcador de peso molecular; Carril 12-14: región del cloroplasto, 35S y NOS maíz para palomitas respectivamente; Carril 15 y 16: región 35S y NOS maíz para palomitas extracción columnas; Carril 17 y 18: región del cloroplasto y 35S Harina de soya extracción STD.

En amplificaciones posteriores se procedió a cambiar el perfil térmico con el fin de disminuir al máximo la presencia de productos inespecíficos y aumentar la eficiencia de la amplificación, por lo que se redujeron los ciclos de amplificación de 50 a 40 ciclos en bloques de 20 ciclos cada uno, en este perfil se mantuvieron las temperaturas de hibridación de 62°C y 58°C respectivamente. En las primeras amplificaciones se

compararon la eficiencia de dos controles positivos, una soya *Roundup Ready*TM provisto por la prueba, la cual no dio resultados claros y precisos y un arroz transgénico experimental. Las siguientes amplificaciones se realizaron utilizando el control positivo de arroz transgénico experimental el cual sirvió como referencia para determinar si las amplificaciones alcanzaron un nivel óptimo, en la figura 12 se muestra que en este caso se obtuvo una respuesta favorable ya que las bandas en las regiones del cloroplasto, del promotor 35S y el terminador NOS se visualizaron claramente y además no hubo presencia de productos inespecíficos.

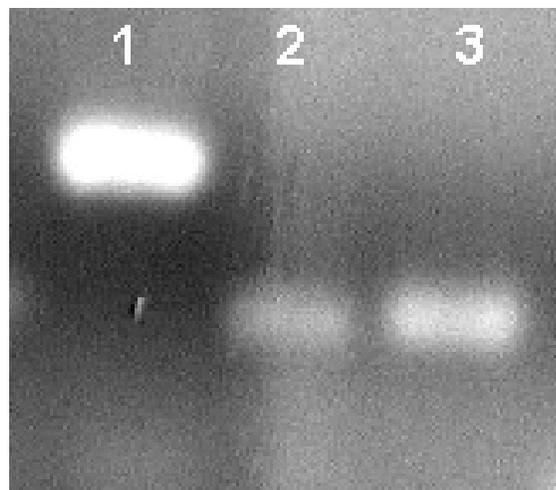


Figura 12. Análisis electroforético de los productos de amplificación del ADN del arroz transgénico experimental (Control positivo). PCR modificada con dos bloques de 20 ciclos cada uno con temperaturas de hibridación de 62°C y 58°C respectivamente (ITCR, 2002). Carril 1: Región común del cloroplasto; Carril 2: Región 35S y Carril 3: Región NOS

Luego que se comprobó que este perfil térmico generaba buenos resultados se inició con el análisis de las muestras seleccionadas. En los primeros ensayos se estudió las tortillas tostadas de maíz y la harina de soya, los cuales expresaron la presencia de la banda correspondiente a la región del NOS de forma concluyente y la región del promotor 35S pero de forma muy leve (Figura 13). Adicionalmente se emplearon dos

controles positivos, el arroz y el algodón transgénico, los cuales dieron resultados positivos a excepción de la región del 35S para el algodón resistente a glifosato. Para todas las muestras se obtuvo una buena amplificación de la región común del cloroplasto que es una banda de 199 pares de bases (Carriles 1, 4, 7 y 10; Figura 13) indicando la presencia de ADN vegetal en todas las muestras y su eficiente extracción.

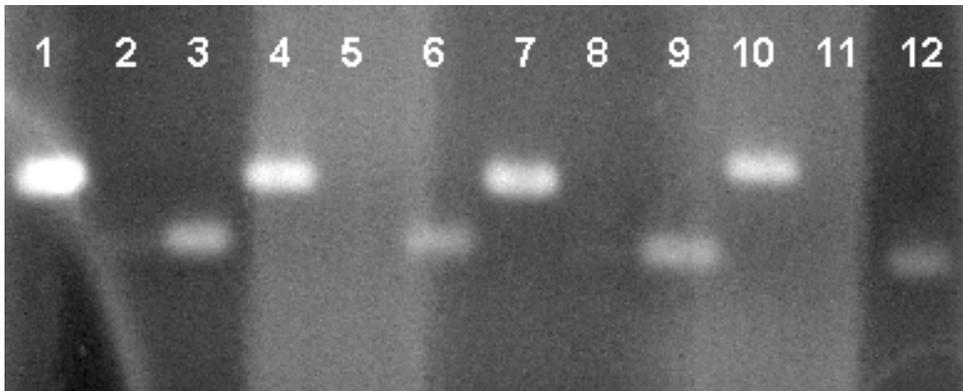


Figura 13. Análisis electroforético de los productos de amplificación (ITCR, 2002). Carril 1-3: Región cloroplasto, 35S y NOS Arroz Transgénico (Control Positivo) respectivamente; Carril 4-6: Región cloroplasto, 35S y NOS tortillas tostadas de maíz respectivamente; Carril 7-9: Región cloroplasto, 35S y NOS harina de soya respectivamente y Carril 10-12: Región cloroplasto, 35S y NOS Algodón Transgénico (Control positivo).

Se analizaron 16 productos comerciales y 4 cultivos (Cuadro 8) de los cuales 9 productos comerciales dieron positivos para la región NOS que indica fuertemente modificación genética, no así para la región 35S. Sin embargo, se cree que los viales que contenían la mezcla de reacción para esta región pudieron sufrir algún daño ya que incluso para el control positivo se tuvo problemas para la visualización de dicha banda. Por otro lado, los cultivos analizados generaron un resultado negativo para esas dos secuencias reguladoras por lo que indican que no existe modificación genética, exceptuando el cultivo de algodón del que previamente se conocía su origen transgénico. Las muestras analizadas y sus resultados se resumen en el cuadro 11.

Cuadro 11. Resultados de los productos de amplificación en las regiones del cloroplasto (CLO), promotor 35S y terminador NOS para las diferentes muestras analizadas. (ITCR, 2002).

MUESTRA	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	AMPLIFICACIÓN		
		CLO	35S	NOS
Arroz transgénico experimental	Columna	****	****	-
Arroz transgénico experimental	STD	****	***	****
Bizcochos de maíz y queso	Columna	****	-	**
Carne de Soya	Columna	****	-	***
Crema de café	Columna	****	-	-
Cultivo de Maíz A	STD	****	-	-
Cultivo de Maíz B	STD	****	-	-
Cultivo de Maíz C	STD	****	-	-
Cultivo de algodón resistente a glifosato	STD	****	**	**
Fécula de maíz	Columna	****	-	*
Harina de maíz	Columna	****	-	***
Harina de soya	Columna	****	*	****
Harina de soya	STD	-	-	-
Hojuelas de Maíz	Columna	****	-	-
Hojuelas de Maíz	STD	****	-	-
Leche de soya	Columna	****	-	***
Leche de soya A	Columna	****	-	*
Maíz dulce enlatado	Columna	****	-	-
Maíz para palomitas	STD	****	-	-
Maíz para palomitas	Columna	****	-	-
Mazorca de maíz de supermercado	Columna	****	-	-
Maíz Cascado de mercado	Columna	****	-	-

Continuación cuadro 11

Papas tostadas	Columna	****	-	-
Tortillas de maíz	Columna	****	-	****
Tortillas tostadas de maíz	STD	****	**	-
Tortillas tostadas de maíz	Columna	****	*	****

* Indican la intensidad de la banda, cuatro es la mayor intensidad y uno la menor

En la figura 14 se muestra el comportamiento global de los 16 productos comerciales analizados, resaltando que más del 50 % de estos resultaron positivos, para la prueba realizada.

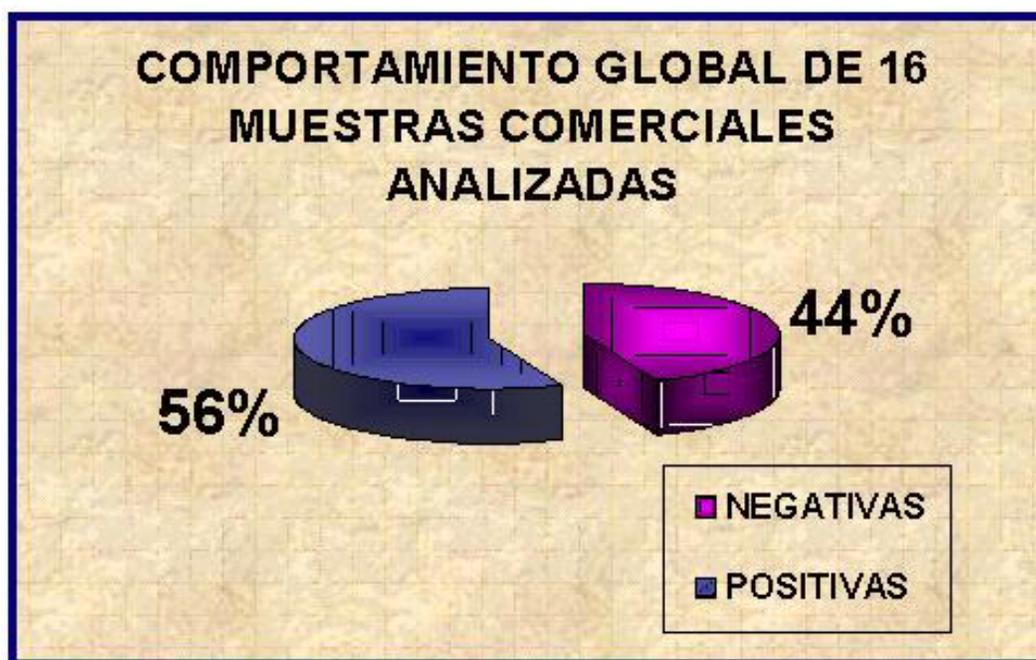


Figura 14. Comportamiento global de 16 muestras analizadas mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ITCR, 2002.

- **Método de detección mediante proteínas**

Detección cualitativa de la proteína CP4

El ensayo funciona con anticuerpos específicos que detectan la proteína CP4 codificada por el gen foráneo, los cuales son acoplados a un reactivo de color e incorporados dentro de las bandas. La presencia de la banda superior en la ventanilla de resultados es una banda control, mientras la presencia de dos bandas indica un resultado positivo. Para esta prueba se utilizó una muestra de harina de soya modificada 2.5% GM como control positivo (Figura 15), en la cual se hicieron visibles las dos bandas en aproximadamente 5 minutos. Las demás muestras analizadas solo presentaron la banda control por lo que se sugiere son negativas para esta prueba.

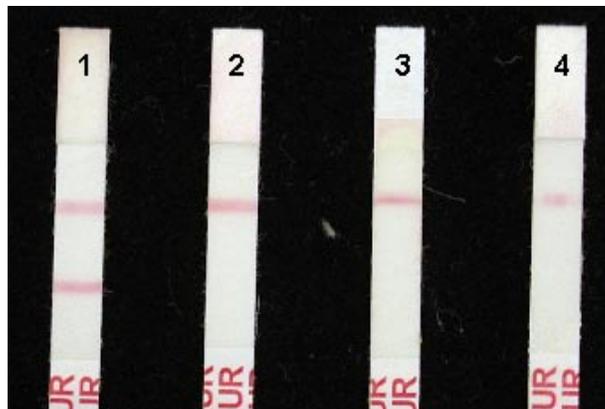


Figura 15. Resultados generados de la utilización de las bandas de flujo lateral *TraitCheck RUR* (ITCR, 2002). Banda 1: Harina de soya modificada 2.5% GM (Control positivo); Banda 2: Leche de Soya; Banda 3: Harina se soya y Banda 4: Carne de soya

Detección de la proteína *Cry1 AB*

Esta prueba detecta cualitativamente la proteína *Cry1 AB* por medio de anticuerpos específicos acoplados a reactivos de color e insertados en las bandas de flujo lateral. Se utilizó una harina de maíz transgénico 1% GM el cual resultó negativo para esta prueba, al igual que las demás muestras analizadas por este medio. En la

figura 16 se presentan los resultados de algunas de las muestras en el cual se visualiza la línea roja superior que es la línea control. Para la mazorca de supermercado, la harina de maíz, el maíz cascado de mercado y los cultivos provenientes de Santa Cruz, Guanacaste los resultados también fueron negativos.

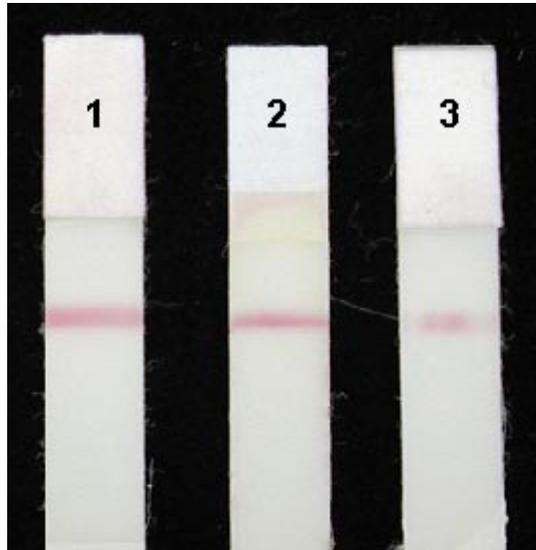


Figura 16. Resultados generados de la utilización de las bandas de flujo lateral *TraitCheck Bt1* (ITCR, 2002). Banda 1: Harina de maíz 1% GM; Banda 2: Tortilla tostada de maíz; Banda 3: Cultivo de maíz C

DISCUSIÓN

Selección y recolección de las muestras

El criterio utilizado para la selección de las muestras fue que estas fueran o estuvieran preparadas a base de soya o maíz. Esto tomando en cuenta que la mayor producción de organismos transgénicos a nivel mundial son de dichos cultivos. Además de que Estados Unidos es uno de los productores más grandes de cultivos transgénicos y Costa Rica por su parte importa cantidades considerables desde allí de soya y maíz para el consumo nacional. Según el ISAAA (2002) Estados Unidos cultiva 35.7 millones de hectáreas de transgénicos representando el 68% del área global. Por otro lado los cultivos transgénicos dominantes a nivel mundial son la soya y el maíz ocupando un 63% y un 19% del área global respectivamente seguidos por el algodón y la canola.

Las muestras seleccionadas son en su mayoría productos nacionales y que se encuentran distribuidos en todo el territorio nacional, además son de fácil acceso. Un criterio utilizado para su selección es que fueran productos que se consumen con mucha frecuencia.

Extracción de ADN

La extracción de ADN a partir de productos y cultivos resultó exitosa empleando la metodología descrita anteriormente según el tipo de muestra empleada. La calidad, pureza y cantidad de ADN es un factor crítico y determinante para los análisis de detección (Newton y Graham, 1994). Como primer paso se tiene que tomar en cuenta el tipo de muestra de partida, así como la aplicación posterior. En este caso se tomó como base el estudio realizado por Bogan (2002) en el que se determinó que el método de extracción estándar provisto por el sistema *GMOScreen* es deficiente para muestras altamente procesadas mientras que el método por columnas *GENESpin* es adecuado para obtener un ADN de alta de calidad de este tipo de muestras. Este criterio se

comprobó en los análisis realizados, en el que se mostró que a pesar de que en la mayoría de muestras extraídas por ambos métodos la cantidad de ADN fue mayor cuando este era extraído con el método estándar (Cuadro 12, Anexo 2), la calidad del ADN era menor reflejado en amplificaciones poco nítidas. Las tortillas tostadas de maíz y la harina de soya son ejemplo de este comportamiento (Cuadro 9). La efectividad de este método por columnas es que se utiliza una matriz de sílice que es lavada por los *diferentes buffer* provistos por la prueba que contienen sales, agentes desnaturalizantes y detergentes para eliminar al máximo contaminaciones que podrían inhibir la PCR y además el ADN se eluye en soluciones amortiguadoras de baja concentración salina para su completa recuperación. Según Biotools (2002) las pruebas basadas en este principio utilizan una forma modificada químicamente de la matriz de sílice, que es adaptada y optimizada para cada protocolo específico. Esta matriz no tienen reactivos tóxicos o peligrosos, y el ADN puede ser utilizado en diversas aplicaciones. Los contaminantes y restos celulares se eliminan en diferentes pasos de lavado, y se eluye en el volumen necesario de *buffer* de elusión (*CE*) (GeneScan Europe, 2001). Por tanto, se evitan pasos de concentración/reprecipitación, que podrían conducir a pérdidas del DNA.

Cuantificación de ADN

Es importante corroborar como paso final de la extracción la cantidad y pureza del ADN obtenido con el propósito de evitar inhibiciones en la amplificación del mismo mediante PCR, por lo que se realizaron dos tipos de cuantificación (gel de agarosa y espectrofotometría). En el cuadro 6 se observó que la diferencia entre los dos tipos de cuantificaciones para una misma muestra genera diferencias significativas en la cantidad de ADN estimado. La estimación en geles de agarosa se realizó comparando la intensidad del ADN control de cantidad (*DNA Amount Standard*) con el ADN extraído, por lo que este tipo de cuantificación es considerada poco confiable ya que la posibilidad de errores es más alta que cuando se utiliza un espectrofotómetro como el *GeneQuant Calculator* el cual estima la concentración del ADN presente en la muestra mediante un espectro de absorción típico que presenta un pico a $\lambda \sim 260$ nm. Señore

(2002) reporta que los dobles enlaces conjugados de la bases nitrogenadas causan que los ácidos nucleicos absorban luz ultravioleta (UV). Si bien el coeficiente de extinción de un ácido nucleico en particular depende de la secuencia de nucleótidos, algunas reglas empíricas permiten estimar la concentración aproximada a partir del valor de A_{260} . Así, a $A_{260} = 1$ corresponde aproximadamente 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN doble hebra, 40 $\mu\text{g/mL}$ de ARN o 33 $\mu\text{g/mL}$ de fragmentos cortos de ADN monohebra (oligodesoxinucleótidos). Este método además de generar la concentración de ADN, genera la concentración de proteínas que es uno de los mayores inhibidores de la PCR y el porcentaje de pureza (relación ADN/proteínas) reflejando la efectividad de la extracción. Hay que tener en cuenta que cantidades mínimas, incluso traza de los reactivos de purificación en el ADN inhiben fuertemente la actividad de la ADN polimerasa durante la PCR.

Por consiguiente, el método de cuantificación escogido fue mediante espectrofotometría en donde se reflejó que la mayoría de extracciones realizadas fueron exitosas (Cuadro 8, anexo 2) ya que se obtuvo un alto porcentaje de pureza y una relación entre las proteínas y el ADN existentes dentro de un rango de aceptación. En las preparaciones de ácidos nucleicos (AN), son frecuentes las impurezas de naturaleza proteica. Dado que los aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) absorben luz UV, la presencia de proteínas lleva a sobrestimaciones de la concentración de AN. Sin embargo, el pico de absorbancia de las proteínas está en $\lambda \sim 280 \text{ nm}$, lo cual permite estimar el grado de impurezas proteicas a partir del cociente A_{260}/A_{280} . (Señorale, 2002). Un buen ADN (calidad y pureza) es aquel cuyo A_{260}/A_{280} es de 1.7 a 2.0. Cuando la relación es menor que 1.7 indica que la cantidad de ADN es muy poca en relación a las proteínas existentes lo que podría influir en el proceso de amplificación. Se observó que casi el 50 % de las muestras estuvieron dentro de este rango, las demás se salieron pero no se alejaron mucho de estos valores.

En el harina de soya y en las tortillas tostadas de maíz, las cuales fueron extraídas mediante los dos métodos se determina que se obtiene un porcentaje de pureza del ADN mayor por el método de extracción en columnas siendo esto determinante al momento de la amplificación.

El mayor aporte de la cuantificación de ADN es poder hacer las diluciones adecuadas de la muestra si así se requiriera, ya que es otro factor que puede afectar la amplificación. Según la literatura se recomienda ajustar las muestras a una concentración de ADN entre 2 – 10 ng/μl. Las muestras fueron ajustadas a 10 ng/μl. Según Biotools (2002) el uso de cantidades excesivas de ADN molde reduce el rendimiento de la reacción, ya que puede inhibir la *taq* polimerasa (inhibición por exceso de sustrato), o bien aumentar la cantidad de productos inespecíficos de amplificación.

En la literatura consultada se resalta que durante el proceso de extracción es de vital importancia el hacer un control de extracción, el cual sea sometido a los mismos pasos que las muestras para así verificar la ausencia de contaminación en los reactivos y el equipo utilizado, e incluso la contaminación con productos de amplificación encontrados en el ambiente. Este criterio fue concluyente ya que en las primeras amplificaciones se notó la presencia de ADN amplificable en dichos controles por lo que se recurrieron a diferentes estrategias para evitar esta contaminación y la aparición de falsos positivos.

Detección mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación del ADN mediante PCR permite la multiplicación exponencial de unas pocas moléculas de ADN blanco con una alta especificidad. Sin embargo, es una técnica bastante sensible a la presencia de contaminantes, ya sea en el laboratorio, en la muestra a amplificar, en los reactivos utilizados, el ambiente y el personal, entre otros. *GeneScan* (2000) y *Biotools* (2002) recomiendan ciertas prácticas para evitar contaminaciones y por ende una deficiente amplificación. Estas fueron puestas en práctica con lo que se redujo la contaminación significativamente. Se realizaron los diferentes pasos de la reacción en áreas separadas (purificación del ADN, amplificación y análisis de los productos de amplificación), se utilizó instrumental, gabachas y guantes específicos para cada área, se utilizaron puntas y tubos nuevos y estériles, se descontaminaron periódicamente las áreas y las pipetas con cloro al 20 %, estas

últimas también fueron irradiadas con luz ultravioleta durante 24 h, las puntas fueron utilizadas con algodón empleado como filtro para evitar la formación de aerosoles y la contaminación de las muestras y/o la mezcla de reacción con ADN exógeno procedente del ambiente.

Según Romero (2002) la eficacia de la PCR varía enormemente de reacción a reacción, dependiendo de los componentes, calidad y concentración del ADN molde, perfiles de temperatura, imprimadores, dNTPs, concentración de $MgCl_2$ y la ADN polimerasa; estos parámetros se pueden optimizar para cada PCR individual, consiguiéndose una alta eficacia de la reacción.

Otro aspecto que se tomó como base fue la investigación realizada por Bogan (2002) en la que se determinó que el perfil térmico que generó mejores resultados en las condiciones existentes en el Laboratorio de Biología Molecular del ITCR fueron los ciclos que empezaban con temperaturas de hibridación alta y terminaban con temperaturas de hibridación bajas, permitiendo la amplificación de las regiones correctas en una forma eficiente y así disminuir al máximo bandas accesorias que se puedan presentar. Se utilizó este perfil en las primeras amplificaciones donde los resultados fueron negativos ya que no se dio la amplificación de las secuencias esperadas y además hubo presencia de bandas accesorias por lo que se decidió buscar otra estrategia para evitar estos inconvenientes.

Se optó por reducir el número de ciclos de 50 a 40 ya que varios autores (Biotools, 2002; Tozzini *et al*, 2000; Tijssen, 1985 y Newton y Graham, 1994) recomiendan llevar a cabo de 25-40 ciclos, ya que si se llevan a cabo más ciclos de los necesarios se pueden obtener productos inespecíficos. Esta estrategia fue bastante exitosa permitiendo la amplificación correcta de la región común del cloroplasto, el promotor 35S y el terminador NOS en el arroz transgénico (control positivo) (Figura 12), además de reducir al máximo la presencia de productos inespecíficos.

Una vez establecido este perfil se inició con el análisis de las muestras seleccionadas, mediante la detección de las secuencias reguladoras usadas con mayor frecuencia en plantas modificadas genéticamente: el promotor 35S y el terminador nos del gen de la Nopalina Sintetasa de *Agrobacterium tumefaciens*, la presencia de una o las dos bandas es un fuerte indicativo de la existencia de modificación genética. Desde la producción de la primer planta transgénica en 1983, el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor ha sido ampliamente aplicado en la regulación de la expresión constitutiva de los genes foráneos en plantas genéticamente modificadas. Este promotor ha sido usado en varias especies incluyendo canola, maíz, algodón, papa, soya, tomate, entre otros (Powell, 1999). Para las muestras analizadas el rastreo de esta secuencia así como la del terminador NOS permite ofrecer un panorama preliminar del movimiento de productos modificados genéticamente de primera generación (construidos con las secuencias reguladoras anteriormente mencionadas) en Costa Rica. Las pruebas realizadas en este estudio son un fuerte indicativo de que en Costa Rica circulan productos comerciales modificados genéticamente (Figura 14).

GeneScan USA (2002), resalta que la presencia de múltiples modificaciones genéticas pueden ser detectadas usando una o las dos secuencias. Por ejemplo, toda la soya modificada genéticamente autorizada en los Estados Unidos contiene el promotor 35S. Una prueba de tamizaje cualitativo en muestras de soya podría detectar esta secuencia promotora, indicando fuertemente la presencia de material modificado genéticamente.

El sistema contiene una reacción control basada en una secuencia del cloroplasto, que consta de 199 pares de bases la cual en casi todas las muestras a excepción de una amplificó de una forma definida y detectable. Lo que indica según *GeneScan* (2000) la presencia de ADN vegetal específicamente y que se logró extraer ADN en una cantidad y calidad suficiente para la amplificación y detección. En el caso de la harina de soya extraída mediante el método estándar no se presentó ninguna de las tres bandas señalando que la extracción no fue eficiente, que la muestra contenía inhibidores de la PCR o que el ADN estaba degradado o altamente dañado para ser

aislado y purificado. Sin embargo, esta última posibilidad se descartó ya que mediante la extracción por columnas de la misma muestra sí se obtuvo una cantidad y calidad suficiente de ADN.

Por otro lado, siempre es importante la existencia de controles en la PCR como el control de extracción y el control negativo (agua). Para el control negativo se utilizan todos los reactivos de la reacción excepto el ADN con el fin de asegurar la ausencia de contaminantes en los reactivos utilizados. El control de extracción indica que durante el proceso las muestras no fueron contaminadas con ADN foráneo. Los controles de agua en la PCR revelan que sí hubo contaminación del ADN durante el pipeteo de las reacciones de PCR. Es importante que en los productos de amplificación de estos controles sean verificados ya que si uno de los dos da un resultado positivo los análisis deben ser repetidos y no se puede interpretar ningún resultado derivado de esta extracción o PCR.

Muchas de las muestras analizadas presentaron la banda correspondiente a la región del terminador nos, pero no presentaban la del promotor 35S. Cabe resaltar que el control positivo también presentaba problemas para la visualización correspondiente a esta región. Es probable que el vial del buffer que amplifica la región del promotor 35S no estuviera en buen estado o que no funcionara en las condiciones utilizadas. Por tanto, no se descarta que los productos analizados presentaran esta banda.

Es de importancia destacar, que la identificación de las secuencias reguladoras presentes en la mayoría de los organismos modificados, mencionadas anteriormente permiten un rastreo general de los OMG's pero no permiten la identificación de la variedad ni la especie OMG presente en el alimento.

Detección Mediante Proteínas

- ***Detección cualitativa de las proteínas CP4 y Cry1 AB***

La detección de organismos modificados genéticamente o sus derivados se puede realizar a nivel de ADN, ARN y/o proteínas. La mayoría de métodos desarrollan la detección por medio de ADN mientras que sólo unos pocos métodos han sido desarrollados para detectar proteínas o ARN (Holst- Jensen, 2001)

TraitCheck (2002) provee unas pruebas para la detección de OMG's rápida, fácil y confiable. Cada prueba esta diseñada para la detección de proteínas específicas en semillas, tejidos de plantas y granos tanto en el campo como en el laboratorio con una precisión del 99.9%.

En la investigación se utilizaron dos pruebas para la identificación inmunológica de proteínas en organismos modificados genéticamente. Una de ellas (*TraitCheck RUR*) consistía en la detección de la proteína CP4 codificada por un gen derivado de la cepa CP4 de *Agrobacterium sp.* y la otra (*TraitCheck Bt1*) en la detección de la proteína Cry1 AB codificada por un gen derivado de *Bacillus thuringiensis* (Bt) incorporada en maíz para la resistencia a insectos. Ambos ensayos funcionaron con el mismo principio el cual utiliza un formato de emparejado de doble anticuerpo, los anticuerpos específicos de la proteína son acoplados a un reactivo de color e incorporados dentro de las bandas de flujo lateral utilizadas.

La prueba esta diseñada para trabajar con muestras en campo o para verificar la procedencia de los cargamentos de granos que se importan de otros países. Por lo tanto las muestras que se analizaron por este medio no eran aptas para dicho fin. Sin embargo, se determinó que la prueba es efectiva y que genera resultados en pocos minutos, esto se comprobó utilizando una harina de soya modificada 2.5%, en la cual se determina con bastante certeza que en este cultivo se realizó la inserción del gen derivado de *Agrobacterium sp.* que codifica la proteína CP4 EPSPS.

Estos ensayos tienen algunas ventajas según *GeneScan USA* (2002) son más rápidos y baratos que los análisis con PCR, el equipo y reactivos son menos que para PCR y las pruebas son relativamente rápidas y fáciles.

En todas las muestras analizadas se visualizó una línea roja superior (Figura 15) tomada como una línea control que indica que el dispositivo está trabajando adecuadamente. Para la muestra de harina de soya 2.5% GM se visualizó una línea roja por debajo de la línea control indicando que esta es soya Roundup Ready®. Este comportamiento se generó ya que los anticuerpos específicos para la proteína CP4 incorporada dentro de las bandas de flujo lateral reconocieron estructuras específicas de la superficie y se acoplaron a este tipo de proteína presente en la muestra, dando como resultado un cambio de color que corresponde a la línea de color rojo visualizada.

A pesar de que estas pruebas pueden detectar la modificación existente ya que se realizan a nivel de proteínas, poseen varias desventajas que provocan que se utilicen con menor frecuencia. La principal desventaja es que en alimentos altamente procesados las proteínas son desnaturalizadas relativamente fácil durante el proceso, provocando que las proteínas blanco no estén presentes de forma detectable por los anticuerpos incorporados en las muestras.

Otro inconveniente reportado por *GeneScan USA* (2002) es que las pruebas comerciales de este tipo están disponibles sólo para pocos productos derivados de la Ingeniería Genética. Al mismo tiempo, cada prueba detecta sólo una proteína. Por lo que se puede determinar que las pruebas realizadas que resultaron negativas, no indican de forma concluyente que estas no sean transgénicas sino que no tienen inserta esta característica. Tal es el caso de las tortillas tostadas de maíz las cuales resultaron positivas para la secuencia del terminador NOS mediante la técnica de PCR y no así para la prueba *TraitCheck Bt1*. Lo que indica que este producto puede ser genéticamente modificado pero que no contiene dentro de su genoma el gen que codifica la resistencia a insectos.

A nivel mundial existen diferentes criterios sobre la producción, liberación y comercialización de OMG's. En muchos países se exige el etiquetado de los alimentos derivados de los organismos modificados, lo que implica que en el momento de exportar hacia estos países, ellos exigen certificación sobre el producto que se intenta exportar. Para Costa Rica, el contar con métodos para la detección masiva de dichos organismos es de importancia, porque estaría bajo la normativa internacional, además sería un paso importante para poder seguir la legislación existente en varios países que exigen el etiquetado de los alimentos derivados de los OMG's y por último constituiría una ventaja económica competitiva a nivel mundial.

Los datos generados por esta investigación evidencian con una alta probabilidad que en Costa Rica se están consumiendo varios productos derivados de OGM's los cuales no son debidamente identificados como tales. La legislación existente hasta el momento no es concluyente y esta en discusión con respecto al etiquetado. El Ministerio de Economía, Industria y Comercio (MEIC) emitió el Decreto N° 17195-MEIC el cual creó la Comisión Coordinadora del Codex Alimentarius en Costa Rica, en la cual en estos momentos se encuentra en discusión los alimentos obtenidos por medios Biotecnológicos (MEIC, 2002). Sin embargo, actualmente existen entes encargados de la manipulación de los cultivos modificados genéticamente y su liberación al ambiente, haciendo constar que en Costa Rica se está trabajando en la legislación con lo que respecta a Bioseguridad.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- Cabe resaltar que las muestras escogidas se consumen con frecuencia, son de fácil acceso y se encuentran distribuidos en pequeños y grandes puntos de venta
- Los resultados obtenidos reflejan que en Costa Rica circulan varios productos que tienen una muy alta posibilidad de contener productos transgénicos y que se encuentran disponibles a lo largo del territorio nacional
- Varias de las muestras analizadas presentaron al menos una de las bandas correspondientes ya sea al promotor 35S o el terminador *nos* indicando fuertemente la presencia de productos derivados de OMG's en estos
- Los métodos de extracción se deben optimizar para cada tipo de muestra a analizar con el fin de lograr la mayor pureza y cantidad de ADN, ya que este es un paso determinante en la investigación
- Se determinó que el ADN contenido en alimentos procesados pueden ser extraído de forma efectiva mediante el método de extracción por columnas con matriz de sílice
- Con el método de extracción estándar mediante purificaciones con cloroformo se logró obtener un ADN más puro y en mayor cantidad de muestras frescas (cultivos)
- La cuantificación por medio de un espectrofotómetro es importante ya que permite obtener una información más exacta y fiable, a la vez que permite hacer una dilución adecuada del ADN lo cual es otro de los pasos determinantes
- La disminución del número de ciclos de PCR fue un factor significativo y que generó muy buenos resultados

- Deben llevarse a cabo durante la PCR reacciones de control, incluyendo un control negativo (todos los reactivos de la reacción excepto el ADN), con el fin de asegurar la ausencia de contaminaciones en los reactivos utilizados
- Es fundamental durante las amplificaciones por PCR la utilización de instrumentos y equipos específicos y que se utilicen puntas para micropipetas con filtro para que eviten la formación de aerosoles y la contaminación de la muestra
- Las pruebas de flujo lateral están diseñadas para su utilización en análisis de campo, por tanto no es una prueba recomendable para el rastreo de proteínas modificadas en alimentos muy procesados
- Es de vital importancia antes de emprender una investigación la limpieza total del laboratorio, tanto del equipo e instrumentos utilizados, para evitar al máximo contaminaciones

BIBLIOGRAFÍA

ALVES, A; QUECINI, V. Y CARNEIRO, M. 1999. Plant Transformation: Advances And Perspectives. Scientia Agricola. Vol.56 N.1. Piracicaba, Brazil. Disponible en: <http://www.scielo.br>

ALVAREZ, P Y GUTIERREZ, S. 2002. Protocolo de Bioseguridad. Un repaso de su proceso histórico. Universidad Nacional de San Martín, Escuela de Postgrado. Derecho Ambiental Internacional. Disponible en: <http://www.biodiversidadla.org/documentos63.htm>

BIOTOOLS. 2002. Purificación de ADN. Disponible en: <http://www.biotoools.net/esp/tecnica/t1.htm>

BIOTECHNOLOGY. 2000. Methods for detection of GMO Grain in Commerce <http://www.acpa.org>

BOGAN, E. 2002. Optimización de una metodología para la Detección de Productos Modificados Genéticamente. ITCR. Informe de Práctica de Especialidad. Cartago, Costa Rica. 106p.

BOSCH, C. 2001. Los alimentos transgénicos y la acción de la justicia. Cátedra Biotecnologías, Biodiversidad y Derecho en la Universidad de Buenos Aires (Facultad de Derecho). Disponible en: <http://www.bioetica.org>

BYRNE, P; WARD, S; HARRINGTON, J Y FULLER, L. 2002. Cultivos Transgénicos: Una Introducción y Guía a Recursos. Universidad Estatal de Colorado. Disponible en: <http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/CultivosTransgenicos/index.html>

CÁTEDRA DE BIOTECNOLOGÍA, BIODIVERSIDAD Y DERECHO. 2002. Codex Alimentarius. Disponible en: . www.biotech.bioetica.org

ENTRALA, C. 2000. Técnicas de Análisis del ADN en Genética Forense. Laboratorio de ADN forense, Departamento de Medicina Legal. Universidad de Granada, España. Disponible en: <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/forensetec.htm>

ERLICH, H. 1989. PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press. Estados Unidos. 246p.

FAO. 2002. La Biotecnología, con inclusión de los Organismos Modificados Genéticamente. Cuadro de Expertos Eminentes sobre la Ética en la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/003/X9600S/x9600s05.htm>

FAO. 2001. Hacia la Bioseguridad. Revista Agricultura 21. Marzo, 2001. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0103sp1.htm>

FAO. 1999, Committee on Agriculture: Biotechnology. 25-29 January. COAG. Disponible en: <http://www.fao.org.unfao/bodies/coag/coag15/x00074e.htm>

FENWICK, A. 2002. ¿Cómo se hacen las plantas transgénicas?. Cultivos transgénicos: Introducción Guía a recursos. Departamento de Suelos y Cultivos. Universidad Estatal de Colorado. Disponible en: http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/CultivosTransgenicos/sp_how.html

GARCÍA, N. 2002. Biotecnología Ambiental y Biotecnología Vegetal. Disponible en: <http://www.portaley.com/biotecnologia/bio3.shtml>

GENESCAN USA INC, 2002. PCR Qualitative Analysis. Disponible en: http://www.gmotesting.com/pcr_qual.html

GENESCAN USA INC, 2002. Applicability of ELISA Testing. Disponible en: http://www.gmotesting.com/elisa_app.html

GENESCAN EUROPE. 2000. GMOScreen Advanced Screening System Basic. Cat.No: 5221102210. Bremen, Alemania. 27p.

GENESCAN EUROPE. 2001. GENESpin. Cat. No: 5224400605. Bremen, Alemania. 7p.

HOLST-JENSEN, A. 2001. GMO detection methods and validation. DNA-based methods. National Veterinary Institute, Section of Food & Feed Microbiology.

IÁÑEZ, E. 1997. Ingeniería Genética de Plantas. Centro Mediterráneo de la Universidad de Granada. Disponible en: <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/igvegetal-1.html>

IÁÑEZ, E. 2002. Biotecnología, ética y sociedad. Instituto de Biotecnología. Universidad de Granada, España. Disponible en: <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/introbiotec.htm>

INIA, 2002. Organismos Modificados. Disponible en: <http://www.inia.cl/~mmera/orggenmo.htm>

IZQUIERDO, J. 1999. Biotechnology can help crop production to feed and increasing world population?: Positive and Negative aspects need to be balanced, a perspective from FAO. Presented at International Symposium on Plant Genetic Engineering, 6-10 Dec. Cuba.

JAMES, C. 2001. Global Status of commercialized transgenic crops: 2001, ISAAA. Briefs No 24 Preview. ISAAA: Ithaca. NY. Disponible en: www.isaaa.org

MADIGAN, M; MARTINKO, J Y PARKER, J. 1999. Brock. Biotecnología de los Microorganismos. Octava Edición. Prentice may. Madrid, España. 1064p.

- MAS, E; POZA, J; CIRIZA, J; ZARAGOZA, P; OSTA, R Y RODELLAR, C. 2001. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Revista AquaTIC nº 15. Disponible en: <http://aquatic.unizar.es/N3/art1501/basespcr.htm>
- MINISTERIO DE ECONOMÍA, INDUSTRIA Y COMERCIO (MEIC), 2002. Comité Nacional del Codex Alimentarius en Costa Rica. Disponible en: <http://www.meic.go.cr/esp/onnum/codex/Codex/documentos.htm>
- MORENO, M e IÁÑEZ, E. 1997. Ciencia, Tecnología y Sociedad. Contribuciones para una cultura de la paz. 315-348p. Disponible en: <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/eirene.htm>
- NEWTON, C Y GRAHAM, A. 1994. PCR. Bios Scientific Publishers Limited. Oxford, Reino Unido. 161p.
- NODARI, R; GUERRA, M. 2000. Implicações dos transgênicos na sustentabilidade ambiental e agrícola. História, Ciências, Saúde. vol. VII(2), 481-91. <http://www.scielo.br>
- POWELL, D. 1999. Cauliflower Mosaic Virus Promoter: Potential Risks. Department of Plant Agriculture. University of Guelph. Disponible en: <http://www.foodsafetynetwork.ca/gmo/camv35s/camv35s.htm>
- PROYECTO DE MEJORAMIENTO DE SEMILLAS (PROMESA), 2002. Biotecnología Agrícola. Managua, Nicaragua. Edición Febrero, #28. pág. 2.
- ROMERO, L; ARIAS, M; AGÜERO, M Y SÁNCHEZ, V. 2002. Bases Técnicas de la PCR. Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA). Valdeolmos. Disponible en: <http://ns1.oirsa.org.sv/Di05/Di0504/Di050412/EpidemiologiayDiagnostico-09.htm>

SANFORD, J. 1990. Biolistic Plant Transformation. *Physiologia Plantarum*. Department of Horticultural Sciences. New York, Estados Unidos. 79: 206-209.

SIMBIOSIS. 2000. "Etiquetado de Alimentos Transgénicos". Foro Virtual. Departamento de Alimentos y Biotecnología Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. 4 al 8 de Diciembre, 2000. Disponible en: <http://www.simbiosis.unam.mx/transgenicos/2oForo.htm>

STRATEGIC DIAGNOSTICS INC. 2000. TraitCheck RUR Bulk Soybean Test Kit. TraitCheck RUR Lateral Flow Test User Guide. Part Number 7000005.

STRATEGIC DIAGNOSTICS INC. 2000. TraitCheck Bt1 Corn Grain Test Kit. TraitCheck Bt1 Lateral Flow Test User Guide. Part Number 7000022.

SEÑORALE, 2002. Preparación de Ácidos Nucleicos y Espectrofotometría de Ácidos Nucleicos. Disponible en: <http://bioquimica.fcien.edu.uy/seccion/distribucion/practicos/5.html>

TOZZINI, A; MARTÍNEZ, C; LUCCA, F; VÁZQUEZ, R; DISTÉFANO, A; VAS, M Y HOPP, E. 2000. Semi-quantitive detection of genetically modified grains based on CaMV 35S promoter amplification. *Electronic Journal of Biotechnology*. Universidad Católica de Valparaíso, Chile. Vol. 3. No. 2.

TIJSEN, P. 1985. Practice and theory of Enzyme Immunoassays. Elsevier Science Publisher B.V. Amsterdam.

TRAITCHECK, 2002. On-site IP Tool for GMO Detection. Disponible en: <http://www.identitypreserved.com/products/traitcheck.htm>

UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES. 2001. Biotecnología aplicada a los alimentos. Disponible en: <http://www.ecoportel.net/articulos/biotec.htm>

VALDEZ, M. 2002. Biotecnología de Plantas y Agricultura Sostenible: Caso Maíz. (Resumen). Universidad de Costa Rica. Escuela de Biología y Centro de Biología Molecular (CIBCM). San José, Costa Rica. Disponible en: <http://www.ceniap.gov.cr/bdigital/congresos/vjornada/presentaciones/biotecnologia.htm>

WURTZEL, E Y MATHEWS, P. 2002. Molecular Biology. Department of Biological Sciences, Lehman College. Disponible en: http://a32.lehman.cuny.edu/molbio_course/blot_protocol.htm

Anexos

Anexo 1

Métodos de extracción de ADN

Figura 17. Método de Extracción Estándar

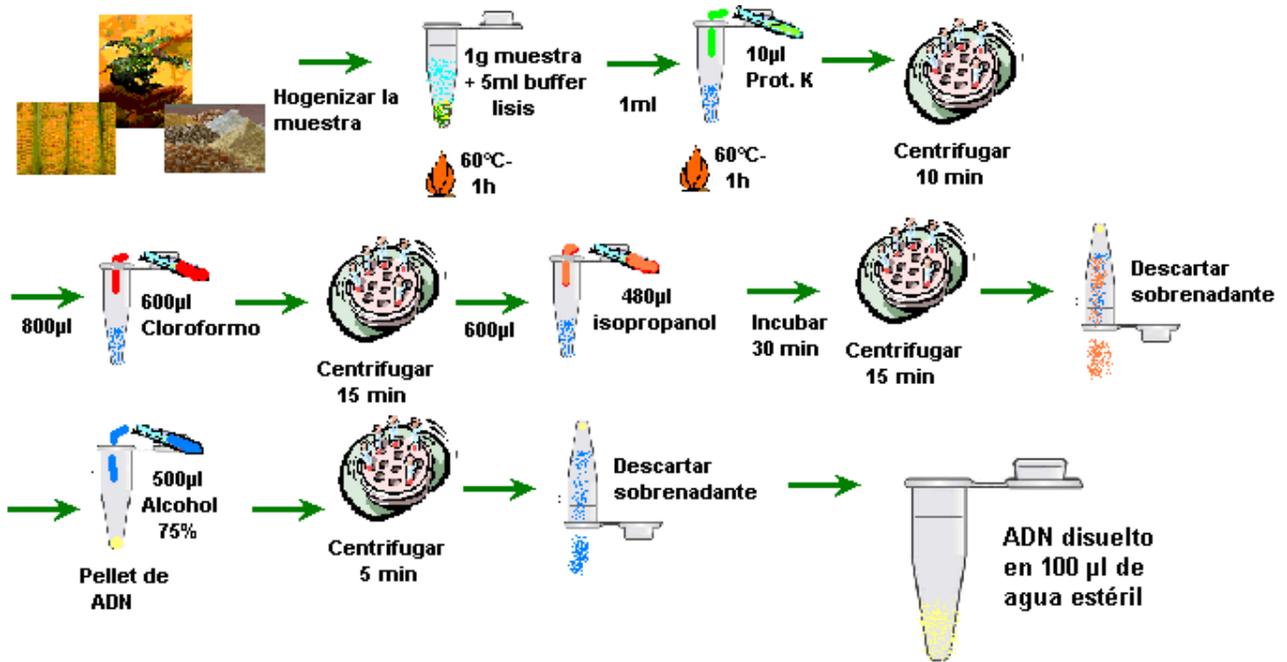
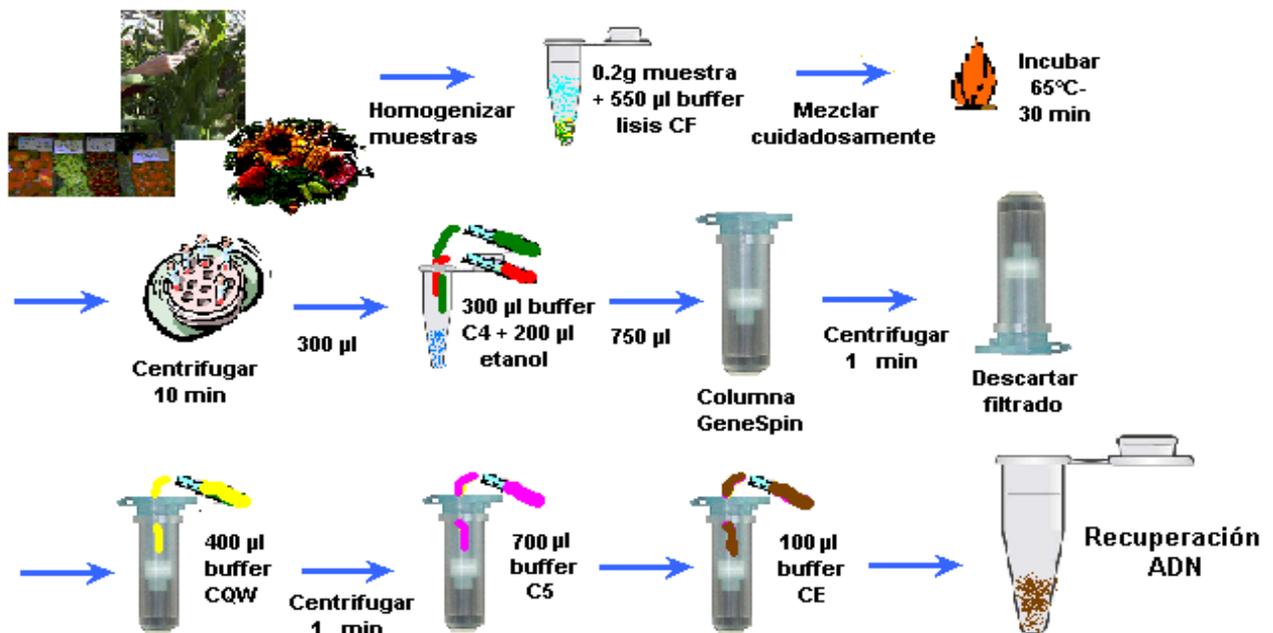


Figura 18. Método de Extracción por Columnas



Anexo 2

Cuantificación de ADN

Cuadro 12. Estimación de la cantidad de ADN presente en diferentes muestras por medio del *GeneQuant Calculator*. (ITCR, 2002)

MUESTRA	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	[ADN] (µg/ µl)	[ARN] (µg/ µl)	PROTEINAS (mg/ml)	% PUREZA	RELACIÓN
Maíz para palomitas 1	STD	0.409	0.329	0.3	107	1.073
Maíz para palomitas 2	STD	0.357	0.285	0.5	104	---
Maíz para palomitas	---	---	---	---	---	---
Harina de soya 1	STD	1.612	1.289	15.7	69	---
Harina de soya 2	STD	0.826	0.661	6.4	74	1.989
Harina de soya	Columna	2.042	1.793	1.1	109	1.975
Tortillas tostadas de maíz 1	STD	0.044	0.035	0	106	1.909
Tortillas tostadas de maíz 2	STD	0.088	0.070	0.1	107	1.941
Tortillas tostadas de maíz	Columna	0.008	0.006	0	134	2.427
Hojuelas de maíz 1	STD	0.035	0.028	0.2	78	1.409
Hojuelas de maíz 2	STD	0.149	0.119	0.6	88	1.592
Hojuelas de maíz	Columna	0	0	0.2	-796	-14.341
Arroz Transgénico	STD	0.094	0.075	0.1	103	1.866
Arroz Transgénico	Columna	0.039	0.031	0.1	98	1.767
Tortillas de maíz	Columna	0.158	0.127	0.1	106	1.923
Carne de soya	Columna	1.06	0.848	0.1	112	2.031
Leche de soya	Columna	0.014	0.011	0	93	1.685
Harina de maíz	Columna	0.369	0.295	0.2	108	1.954
Bizcochos de maíz	Columna	0.036	0.029	0.1	90	1.622
Papas tostadas	Columna	0.015	0.012	0.1	87	1.577
Fécula de maíz	Columna	0.173	0.139	2.7	90	1.635
Mazorca de supermercado	Columna	0.3	0.240	0.2	109	1.968
Maíz enlatado	Columna	0.002	0.002	0	-190	-3.431
Leche de soya del seguro	Columna	0.656	0.525	0.2	111	2.002
Crema de café	Columna	0.007	0.006	0.1	75	1.351
Maíz cascado de mercado	Columna	0.119	0.096	0	111	2.009
Cultivo de maíz A de Guanacaste	STD	0.224	0.237	0.2	107	1.935

<i>Continuación Cuadro 12</i>						
Cultivo de maíz B de Guanacaste	STD	1.270	1.373	10.7	80	1.448
Cultivo de maíz C	STD	0.217	0.234	0.1	111	2.005
Algodón transgénico	STD	0.187	0.149	0	116	2.092

Anexo 3

Soluciones Utilizadas

- Buffer TAE 50X (Tris Acetato EDTA)
 - EDTA 0.5M pH: 8 10 ml
 - Tris Base pH: 8 24.2 g
 - Ácido Acético 5.7
 - Agua Destilada (aforar) 100 ml

- Buffer TAE 1X (Tris Acetato EDTA)
 - TAE 50X 20 ml
 - Agua Destilada 980 ml

- Bromuro de Etidio (10 mg/ml)
 - Bromuro de Etidio 1 g
 - Etanol 95% 1 ml
 - Agua Destilada 100 ml