



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma
de Barcelona

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGÍA MOLECULAR

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOLOGIA I BIOTECNOLOGIA VEGETAL

Tecnologías Ómicas para la evaluación de Riesgos de las Plantas Modificadas Genéticamente

TESIS DOCTORAL 2016

Memòria presentada per Maria Corujo Besga per optar al Grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona

Barcelona, Juliol 2016

Maria Corujo Besga

Directora de la tesis

Director de la tesis

Tutora de la tesis

Maria Pla de Solà- Morales

Jose Luís La Paz Gallego

Maria Carme Espunya Prat

a mun pare, mu mare i es meu germà,
família irrepètible

Diuen que aquesta part és la més difícil d'escriure. Ara mateix, després d'haver escrit tot aquest "totxo" de tesis, no hi ha res que em sembli tan difícil...

Primer de tot, he d'agrair als meus dos directors de tesis, la Dra. Maria Pla i el Dr. Jose L. La Paz, per haver-me donat l'oportunitat d'entrar a fer la tesis en el - ja inexistent - grup. Gràcies per tot el que m'heu ensenyat sobre els transgènics, la normativa europea i la biologia molecular de plantes. Gràcies també per el suport i la confiança en mi que ha fet despertar la meua curiositat per trobar respostes a les meves pròpies preguntes.

A qui he de donar les gràcies immediatament son a les meves companyes de LABORATORI. A ti, Sareta meva, que me has cuidado y apoyado en los momentos más difíciles. Que me has ayudado tanto en todo: molturar millones de hígados, hacer montones de extracciones de DNA, RNA y proteínas. A tí, SARA la Reina de las qPCRs, gracias!! Y gracias a CRISTINA, ¡Cuánta luz trajiste al lab, Cris!! Aaa, con las pruebas de proteómica que no salían, con los momentos de risas, cotilleos y canciones (♪ Lady, running down to de reptide ♪). Te echo muuuucho de menos Cris!! También a SILVIA, por los inicios juntas, y por el súuuuper reencuentro en Potsdam, y a CARLOS por sus chistes y buen humor!!!

A la que no em puc deixar és a la MIREIA, que en realitat, si no hagués estat per ella, aquesta aventura no hagués començat mai! Gràcies! Qui hagués dit que els nostres camins continuarien la mateixa direcció taaaant de temps? A veure quin és el meu pròxim pas...

A tots els meus companys del CRAG, gràcies. MERCÈ, mira que has arribat a "agobiar-me", eeeh? Tot i així, reconec que m'has ajudat molt, sobretot en aquest difícil final, així que moooltes gràcies per haver-me fet costat!! A l'antic equip de Genòmica: la SARA i la JOANA, gràcies per l'ajuda i la paciència, per tots els Bioanalyzer, fluidigm i *microarray* que els hi he portat!! Moltes gràcies a les dues per haver-me ajudat taaant!! I a la Joana, que m'ha ajudat també moooltíssim, sense la Sara, en la nova fase del servei de Genòmica. A ti, SARA, que lo bonito es que nos hemos continuado viendo (cuando coinciden nuestras agendas) ... GRACIAS: por el buen rollo que aportaste al CRAG, por el ánimo y ayuda, por la amistad improvisada, por los paseos con Ron, por las noches en tu casa, por las birras en Barcelona....! Y por todo lo que vendrá... :)!! A la resta de companys de serveis del CRAG, amb qui he compartit tants esmorzars i dinars: PILAR, MONTSE, MIREIA, ÀNGEL, ALEJANDRO, MINA i EVA. Finalment, he d'agrair al SAMI per tota la seva ajuda inestimable en proteómica. També, gràcies a la MARIA JOSE i el MANUEL, per haver compartit taantes coses, sobretot fora del CRAG.

A les persones que, inevitablement, han viscut el meu dia a dia bipolar, de bon humor i de mal humor, casi a l'hora: el MANU, per la convivència fàcil i tranquil·la, per les birres improvisades al Chipen, per les estones al sofà de casa intentant arreglar el món i les nostres vides! A la meua CARLA, que és un àngel que ha aparegut a la meua vida, inspiració i valentia tota ella!! Ens vam conèixer fent BALLETS amb la CRISTINA i

ja ens hem unit per sempre. Carla, t'estimo molt i m'alegra tantíssim que formis part de la meva vida! No hi ha res que vulgui dir, que no t'hagi dit ja... I BALLAR, el BALLEU, el meu salvador...

Gràcies a la meva FAMÍLIA (gracis Sencelles!). A la família que es troba i es crea, a la família alternativa. Cadascuna a la seva manera i amb les seves coses, som una gran família, família bonica. A les que duen temps a fora, RUT i ALBA: mis amores, mis almas gemelas. A les que estan una mica enfora, la XELL, SANDRA BA, sort que sempre tenim excuses per retrobar-nos i veure que "lo nostro" continua intacte. La MARINA i la ELI, la CRIS. A elles tres, que d'alguna manera comencen vides noves: nou pis, nova feina (¿), casament... Gràcies per ser aquí, per aportar alegria i bons consells! A la SANDRA BO, que ja ha començat una nova vida i a l'ANNA, que l'està a punt de començar. A la meva Sandreta, li desitjo tota la sort del món i que la vida doni un camí planer al BRAIS. A l'Anna, li desitjo força i encerts, i espero que els nostres camins es retrobin ben aviat! I finalment, el patriarca de la família, al MARC. Ets una de les millors persones que conec, Marc, ja ho saps! A totes, vos estimo molt!

A ses meves CARXOFES. Ai, nins! Vos enyor tant que es impossible dir-ho. Hem forjat algo infinit. A n'es meu TÒFOL, amic de s'ànima i sa infància, perquè puguem viatjar junts molt més! A na MARTA, n'ALBA, en GERARD, na MAR, na MARTA FERRIOL, na SARAH, na MARIA CIFRE (ja te tocarà tot això a tu!). A n'AINA, per es moments de fotos, de xistes absurds, gracis perquè a vegades pens que només tu m'entens. Mos feim grans, nins, i cada vegada esteim mis desperdigats, però confiem en més bodes, despedides, aniversaris i nouvinguts, per tenir un milió d'excuses per retrobar-nos. Sempre mos quedarà Mallorca!

A sa meva FAMILIA de veres. A ses meves ties, CATI, MALEN, voltros teniu un merescut racó especial. Sou com jo - o jo soc com voltros - i no ho puc expressar d'una altra manera. Vos estimo, i molt, sé que sempre sou i sereu allà. Als meus cosins, ALBERTO i RAMON, que vos ador i vos estimo fins a sa lluna i tornar, ja ho sabeu... I també als més recents de sa família, en DANI (no tan recent) i na CHIAKY, perquè sé que feu feliç a qui teniu devora! Estic molt, molt orgullosa de sa nostra família. Mos duim bé, mos estimam i mos tenim sempre en compte. I això no ho pot dir tothom. Siguin on siguin, als meus abuelos, PACO i PEPE, i en especial a s'abuela CATALINA i MARUJA. No me surten ses paraules...

I òbviament a sa millor família que un pugui desitjar: MAMÀ, PAPÀ i LLUÍS. I és que no hi ha res més a dir. Sou es meu recolzament i inspiració, m'heu convertit amb el que sóc i això no té preu. Gracis, sempre! Vos estimo molt.

I a tu Bagaleu (repte aconseguit!), perquè passi el que passi sempre estarem connectats d'una manera intensa i inexplicable. Gràcies JORDI, per haver aparegut a la meva vida i per haver-me ensenyat tantes coses.

No diria que ha estat difícil, ha estat breu, però intens. He sentit totes les emocions del món.

*brindo per la família i l'amistat,
perquè sentim calor, quan fagi fred,
per una nit de lluna plena, en una nit fosca,
i per tot allò que faci de la nostra vida un camí costa avall*

Mimosa, 2016

Under Pressure

Mr Freddy Mercury and Mr David Bowie, 1981

Pressure pushing down on me
Pressing down on you no man asks for
Under pressure
That burns a building down
Splits a family in two
Puts people on streets

Bah bah bah bah bah bah

It's the terror of knowing
What this world is about
Watching some good friends
Screaming let me out!
Pray tomorrow takes me higher
Pressure on people
People on streets

Do do do bah bah bah bah
O-kay
Chippin' around
Kick my brains round the floor
These are the days
It never rains but it pours

People on streets
People on streets

It's the terror of knowing
What this world is about
Watching some good friends
Screaming let me out!
Pray tomorrow takes me higher higher higher
Pressure on people
People on streets

Turned away from it all
Like a blind man
Sat on a fence but it doesn't work
Keep coming up with love
But it's so slashed and torn
Why why why?
Love love love love

Insanity laughs under pressure we're cracking
Can't we give ourselves one more chance?
Why can't we give love that one more chance?
Why can't we give love give love give love?
Give love give love give love give love give love?
Cause love's such an old fashioned word
And love dares you to care
For people on the edge of the night
And love dares you to change our way
Of caring about ourselves
This is our last dance
This is our last dance
This is ourselves under pressure
Under pressure
Pressure

Contenido

RESUMEN.....	19
INTRODUCCIÓN.....	23
<u>1.</u> Los organismos modificados genéticamente	23
<u>2.</u> Transgénesis en la mejora genética de plantas.....	27
<u>3.</u> Cultivo y comercialización de las PMG.....	33
<u>4.</u> Marco regulador de los OMG en la Unión Europea	40
<u>5.</u> Aspectos críticos de la regulación de los OMG.....	42
<u>6.</u> Evaluación de la seguridad de los cultivos MG.....	46
<u>7.</u> Metodologías alternativas de evaluación de las plantas transgénicas.....	53
<u>8.</u> Desafío actual de la agricultura	59
MARCO DE LA TESIS DOCTORAL.....	63
OBJETIVOS.....	67
RESULTADOS.....	71
<u>1.1</u> Transcriptómica comparativa en embrión de maíz MON810.....	71
1.2 Proteómica comparativa en semilla de maíz MON810	89
1.3 Proteómica comparativa en muestras de maíz contaminado con micotoxinas	101
1.4 Proteómica comparativa de la patata cisgénica A01 A.....	107
2.1 Transcriptómica comparativa en hígado de rata alimentada con maíz MON810.....	113
2.2 Proteómica de hígado de rata alimentada con maíz MON810	139
DISCUSIÓN.....	147
CONCLUSIONES.....	165
MATERIALES Y MÉTODOS.....	169
BIBLIOGRAFÍA.....	195
ANEXOS	205

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Modelo de la transformación genética mediada por Agrobacterium.	24
Figura 2. A) Evolución del área destinada a cultivos biotecnológicos, desde 1996 a 2014, en países industriales y en vías de desarrollo. B) Porcentaje del área destinada a los cuatro cultivos MG más importantes en 2014	28
Figura 3. Evolución del área destinada a cultivos biotecnológicos a nivel global, desde 1996 a 2014	29
Figura 4. Mecanismo de acción de las proteínas Cry.	32
Figura 5. Representación de la mazorca y la parte aérea de la planta de maíz moderno y su probable ancestro salvaje, el teosinte	34
Figura 6. Tipologías de mazorcas de diferentes variedades de maíz.	35
Figura 7. A) Catálogo de semillas de la empresa Garton Brothers. B) En el año 2014 se celebraron los 100 años del nacimiento de N. Borlaug.	35
Figura 8. Cultivo de maíz a escala global.	37
Figura 9. Efectos causados por el taladro de maíz	37
Figura 10. Esquema del inserto del maíz Bt MON810.	38
Figura 11. Producción de maíz Bt MON810 en España desde 1998, en hectáreas.	39
Figura 12. Proceso de obtención de híbridos convencionales y transgénicos	40
Figura 13. Información requerida para la solicitud de Autorización de Alimentos y Piensos Genéticamente Modificados según el Reglamento (UE) nº 503/2013.	41
Figura 14. Proceso de autorización de los OMG.	43
Figura 15. Pasos en un experimento de RNA-Seq	55
Figura 16. Esquema del diseño experimental de los estudios de ómicas sobre material vegetal, y de toxicidad en ratas, del proyecto GRACE.	64
Figura 17. Dendrograma de los transcriptomas de embrión de distintas variedades de maíz cultivadas en dos años consecutivos	73
Figura 18. Análisis de componentes principales de los transcriptomas de embrión de maíz de las 11 variedades.	74
Figura 19. Numero de isoformas diferenciales entre todos los pares de variedades de maíz analizadas.	75
Figura 20. Diagrama de Venn del número de isoformas diferenciales en los tres pares de variedades MON810 vs near-isogenic	75
Figura 21. Niveles de expresión de los IDE comunes en las tres muestras de maíz MON810, respecto a sus near-isogenic, ensayadas.	85
Figura 22. Mapa de interacción de los transcritos diferenciales en los embriones de maíz 67mg_12 versus 66_12.	86
Figura 23. Mapa de interacción de los transcritos diferenciales en los embriones de maíz 48mg_12 versus 16_12.	86
Figura 24. Mapa de interacción de los transcritos diferenciales en los embriones de maíz 48mg_13 versus 16_13.	87
Figura 25. Gel 2D representativo del proteoma de semilla seca de maíz	90
Figura 26. Relación entre los proteomas 2D de las semillas de distintas variedades de maíz, cultivadas en dos años consecutivos.	93
Figura 27. Análisis de componentes principales de los proteomas de semilla de maíz de 16 muestras correspondientes a 8 variedades, cultivadas en 2 años diferentes.	94
Figura 28. Diagramas de Venn del número de spots diferencialmente acumulados en grano maduro y seco de maíz MON810 de diferentes variedades y años de cultivo, respecto a sus controles near-isogenic.	96
Figura 29. Niveles de expresión relativa de las proteínas diferencialmente acumuladas en las variedades MON810 respecto a las variedades convencionales near-isogenic, cultivados en las mismas condiciones ambientales.	100
Figura 30. Niveles de aflatoxinas, fumonisinas y DON en 11 muestras de maíz incluyendo 2 muestras contaminadas cultivadas en el año 2012.	102
Figura 31. Dendrograma de los perfiles proteómicos de las semillas de maíz cultivadas en el año 2012 incluyendo las variedades infectadas por hongos	103

Figura 32. Análisis PCA de los proteomas de semilla de maíz de 2 variedades infectadas contaminadas con micotoxinas (15cont_12 y 17cont_12, en rojo) y 9 variedades sanas (en azul) cultivadas en el 2012.....	104
Figura 33. Niveles de expresión relativa de las proteínas diferencialmente acumuladas en las 2 muestras contaminadas y las 9 no contaminadas de maíz.....	105
Figura 34. Geles bidimensionales de tubérculo de patata de las variedades Desiree y Fontane.....	108
Figura 35. Relación entre los proteomas de tubérculos de patata.....	109
Figura 36. PCA de los proteomas de tubérculo de patata de 15 muestras correspondientes a una variedad MG, su correspondiente convencional isogénica, la variedad parental de la que deriva Des A; más 6 variedades comerciales y 6 variedades experimentales, todas consideradas aptas para el consumo.....	110
Figura 37. Niveles de expresión relativa de las proteínas diferencialmente acumuladas en la variedad MG A01 A de patata respecto a la isogénica (iso) y las otras 13 convencionales (comerciales y experimentales).....	112
Figura 38. Dendrograma de los valores de intensidad normalizados de todos los replicados de los chips de A) hembras (♀♀) y B) machos (♂♂) del ensayo de 90 días.....	116
Figura 39. Dendrograma de los valores de intensidad normalizados de todos los replicados de los chips de A) hembras (♀♀) y B) machos (♂♂) del ensayo de 1 año.....	116
Figura 40. PCA de los valores de intensidad normalizados de los chips de todos los replicados y grupos experimentales de los ensayos de 90 días y 1 año.....	116
Figura 41. PCA de A) hembras (H) y B) machos (M) del estudio de toxicidad de 90 días.....	117
Figura 42. Número de sondas diferenciales entre cada uno de los grupos de ratas del ensayo de 90 días.....	118
Figura 43. Diagrama de Venn de los GDE en los hígados de rata de hembras (A); machos (B) y ambos (C) del ensayo de toxicidad a 90 días.....	119
Figura 44. Categorías funcionales de los transcritos diferenciales en las hembras 5 alimentadas con dieta MG en el ensayo de toxicidad de 90 días.....	120
Figura 45. Categorías funcionales de los transcritos diferenciales en los machos alimentados con dieta MG en el ensayo de toxicidad de 90 días.....	121
Figura 46. Mapa de interacción de las proteínas diferenciales en los dos grupos de hembras que recibieron dieta MG en el ensayo de 90 días.....	123
Figura 47. Mapa de interacción de las proteínas diferenciales en los dos grupos de machos que recibieron dieta MG en el ensayo de 90 días.....	124
Figura 48. Núcleo molecular del reloj circadiano.....	125
Figura 49. Número de genes diferenciales de cada grupo de ratas analizados del ensayo de 1 año.....	128
Figura 50. Rutas metabólicas principales relacionadas en la respuesta a sustancias tóxicas en el hígado.....	129
Figura 51. Expresión relativa de los genes marcadores del metabolismo de xenobióticos en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 90 días.....	130
Figura 52. Expresión relativa de los genes marcadores de metabolismo de ácidos biliares en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 90 días.....	131
Figura 53. Expresión relativa de los genes marcadores de cáncer hepático en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 90 días.....	132
Figura 54. Expresión relativa de los genes marcadores de esteatosis en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG.....	132
Figura 55. Expresión relativa de los genes marcadores de metabolismo de xenobióticos en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 1 año.....	134
Figura 56. Expresión relativa de los genes marcadores de metabolismo de ácidos biliares en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 1 año.....	135
Figura 57. Expresión relativa de los genes marcadores de cáncer hepático en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 1 año.....	135

Figura 58. Expresión relativa de los genes marcadores de esteatosis en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 1 año	136
Figura 59. Proteoma representativo de hígado de rata del estudio de alimentación de 90 días.	140
Figura 60. Representación mediante un dendrograma de los 8 grupos de ratas de machos y hembras.....	141
Figura 61. Análisis de componentes principales de los volúmenes de todos los spots de los proteomas de hígado	142
Figura 62. Diagrama de Venn de los spots diferenciales significativos en los hígados de los estudios A y B de hembras (♀♀) y machos (♂♂).	143
Figura 63. Procesos de amplificación y marcaje de los chips 3' IVT PLUS de Affymetrix.....	183
Figura 64. Ilustración de cómo de aplicar la solución de rehidratación en los sarcófago	188

Tabla 1. Ejemplos de eventos de PMG con tolerancia a herbicida, resistencia a insectos y eventos apilados.....	30
Tabla 2. Resumen de algunos trabajos publicados sobre la evaluación de riesgos de PMG mediante tecnologías ómicas.....	54
Tabla 3. Variedades de maíz analizadas por transcriptómica.	72
Tabla 4. Isoformas diferencialmente expresadas en el embrión de maíz 48mg_12 respecto a su respectiva near-isogenic 16_12.	76
Tabla 5. Isoformas diferencialmente expresadas en el embrión de maíz 48mg_13 respecto a su respectiva near-isogenic 16_13.	77
Tabla 6. Isoformas diferencialmente expresadas en el embrión de maíz 67mg_12 respecto a su respectiva near-isogenic 66_12.	79
Tabla 7. Valores de expresión diferencial de los 4 transcritos diferenciales comunes en las 3 variedades MON810 analizadas.	84
Tabla 8. Rutas celulares (KEGG) y dominios funcionales (InterPro) sobrerrepresentados en los transcriptoma de 67mg_12, 48mg_12 y 48mg_13.....	88
Tabla 9. Tabla de las variedades de maíz ensayadas en el análisis proteómico comparativo.....	90
Tabla 10. Número de spots cuantificados en los geles IEF-SDS-PAGE en cada muestra de maíz analizada	91
Tabla 11. Tabla ANOVA de los perfiles proteómicos de 16 muestras de grano de maíz correspondientes a 8 variedades cultivadas en 2 años consecutivos.....	95
Tabla 12. Identificación por LC-MS/MS de los spots diferenciales en las comparaciones directas de grano de maíz MON810 y convencional near-isogenic, cultivados en las mismas condiciones ambientales	97
Tabla 13. Tabla de las variedades de maíz ensayadas en el análisis proteómico comparativo con muestras de maíz contaminadas.	101
Tabla 14. Identificación por LC-MS/MS de los spots diferenciales en las comparaciones directas de grano de maíz contaminado y no contaminado	104
Tabla 15. Variedades de patata analizadas por proteómica bidimensional y número de spots identificados en los geles 2D.	108
Tabla 16. Identificación por LC-MS/MS de los spots con volúmenes diferenciales en la variedad de patata MG A01 A y la línea convencional isogénica Des A.	110
Tabla 17. Diseño experimental del análisis transcriptómico en hígado de rata en los ensayos de toxicidad aguda (90 días) y crónica (1 año).	114
Tabla 18. GDE en hígado de rata de los grupos de machos y hembras de los estudios A y B.....	119
Tabla 19. Análisis de las rutas metabólicas sobrerrepresentadas en las hembras del Estudio A alimentadas con dieta MG.	122
Tabla 20. Análisis de las rutas metabólicas sobrerrepresentadas en las hembras del Estudio B alimentadas con dieta MG. Se muestran las 30 rutas más significativas.....	122

Tabla 21. Análisis de las rutas metabólicas sobrerrepresentadas en los machos del Estudio B alimentados con dieta MG.....	122
Tabla 22. Valores de expresión de los genes diferenciales del reloj circadiano. En rojo se representan los genes inducidos en los grupos MG y en azul los genes reprimidos.....	126
Tabla 23. Horario de sacrificio de las ratas del ensayo de 90 días.....	126
Tabla 24. Valores de expresión de los genes diferencialmente expresados en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG respecto al control.....	133
Tabla 25. Diseño experimental del análisis proteómico en hígado de rata en ensayo de toxicidad a 90 días.	139
Tabla 26. Análisis ANOVA del efecto de los factores dieta y estudio sobre los proteomas de hígado en machos y hembras	142
Tabla 27. Spots diferencialmente acumulados en los proteomas bidimensionales de hígados de rata en los estudios A y B.	144
Tabla 28. Composición nutricional de las dietas.....	170
Tabla 29. Ingredientes de las dietas	170
Tabla 30. Primers de la validación del análisis RNA-Seq en embrión de maíz.	172
Tabla 31. Primers del análisis de expresión dirigida en hígado de rata.....	174

RESUMEN

RESUMEN

La evaluación del impacto de las plantas modificadas genéticamente (MG) sobre la salud se lleva a cabo, en la UE, mediante un análisis comparativo molecular, composicional, agronómico y fenotípico, así como mediante estudios de toxicidad en roedores basados en las recomendaciones de la OECD y la EFSA. Sin embargo, la relevancia y la necesidad de realizar estudios en animales están siendo cuestionadas cuando se ha demostrado la equivalencia substancial de la planta MG respecto a la convencional comparadora no MG. En esta tesis doctoral se ha evaluado la capacidad de las tecnologías ómicas de análisis masivo para detectar y caracterizar posibles cambios no intencionados nivel transcriptómico y proteómico provocados por la inserción y/o expresión del transgén en la planta transgénica en comparación a variedades convencionales. Se ha usado como modelo el maíz MON810 resistente a insectos, aprobado para su uso en alimentos y piensos, y para la liberación al medio ambiente en la UE. Las mismas variedades de maíz, analizadas mediante ómicas, se han usado en ensayos de toxicidad a 90 días y a 1 año en ratas. Asimismo, estos ensayos se han complementado con análisis transcriptómicos y proteómicos de hígado de las ratas alimentadas con dosis extremas de maíz MON810 para determinar la capacidad de estas técnicas para aportar información adicional sobre los efectos de las plantas MG sobre la salud. Esta tesis doctoral ha demostrado que la proteómica y, especialmente, la transcriptómica son tecnologías muy sensibles e informativas en este campo, y pueden postularse como herramientas complementarias al análisis composicional para una caracterización integral de las plantas MG. Se propone que estas tecnologías pueden reforzar el principio de equivalencia substancial, así como contribuir a formular una hipótesis de partida para los estudios de toxicidad con animales.

INTRODUCCIÓN

1. Los organismos modificados genéticamente

Definición de OMG

Un organismo modificado genéticamente (OMG) se define, en la UE, como

“un organismo, con excepción de los seres humanos, cuyo material genético haya sido modificado de una manera que no se produce naturalmente en el apareamiento ni en la recombinación natural” (Directiva 2001/18/CE, Parlamento Europeo 1991).

Los métodos más comunes para introducir una modificación genética en una planta comercial son: agroinfección o transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens*, bombardeo de células o tejidos con micropartículas y métodos de selección convencional mediante el cruzamiento con un parental MG. Los métodos menos frecuentes serían la fusión celular (incluida la fusión de protoplastos), transferencia directa del DNA a células o protoplastos, electroporación y transformación mediante el tubo polínico (o *pollen-tube pathway*). La mutagénesis, la transformación natural o la inducción de la poliploidía están específicamente excluidas de la definición de OMG.

La definición actual de un OMG se basa, pues, en el uso de unas determinadas técnicas de modificación genética y, por tanto, las políticas que regulan su aprobación se basan en el propio proceso de transferencia de genes (concepto *process-based* en inglés). En otros países como U.S, la aprobación de los OMG se realiza en función del producto final obtenido (*product-based*).

Métodos de transformación de plantas

Como ya se ha comentado, los métodos más frecuentemente usados para introducir un fragmento de DNA en el genoma de una planta son la transformación mediante bacterias del género *Agrobacterium*, principalmente *A. tumefaciens*; y el bombardeo de micropartículas de células o tejidos.

La bacteria fitopatógena *A. tumefaciens* es capaz de transferir de manera natural un fragmento específico de DNA (llamado DNA de transferencia, T-DNA) desde su plásmido inductor de tumores (Ti) hasta un cromosoma de la célula vegetal huésped (Gelvin 1998). El proceso de transformación ha sido extensamente estudiado (ver algunos artículos de (Gelvin 2012; Clarke y Zhang 2013; Subramoni *et al.*

2014; Gohlke y Deeken 2014; Nester 2015) y se resume en la Figura 1. Cuando una planta sufre una herida, ésta libera compuestos fenólicos y azúcares que son reconocidos por el receptor VirA de *Agrobacterium*, lo que facilita la unión del patógeno a la célula vegetal y el subsecuente inicio del proceso de transformación. Dicha unión induce en *Agrobacterium*, a través de VirG, la expresión coordinada del resto de los genes de virulencia (*vir*), codificados en la región no transferida del plásmido Ti, los cuales desarrollan funciones primordiales para la transferencia del T-DNA (Stachel, Nester y Zambryski, 1986). Los genes *virA* y *virG* son los únicos genes *vir* expresados de forma constitutiva en *Agrobacterium*. En las células bacterianas, la cadena de transferencia del T-DNA (cadena T) se une covalentemente a una serie de proteínas Vir formando un complejo (complejo T) que protege la cadena T de la actividad de las nucleasas de la célula huésped (Citovsky, Wong y Zambryski, 1989) y facilita la entrada a la célula vegetal. Una vez el complejo T se encuentra en el citoplasma vegetal, éste penetra en el núcleo para integrarse finalmente en el genoma. La cadena T-DNA se repara en una doble cadena y se integra de manera estable en el genoma huésped mediante una recombinación no homóloga mediada por la cooperación entre los factores bacterianos y componentes nucleares de la célula huésped.

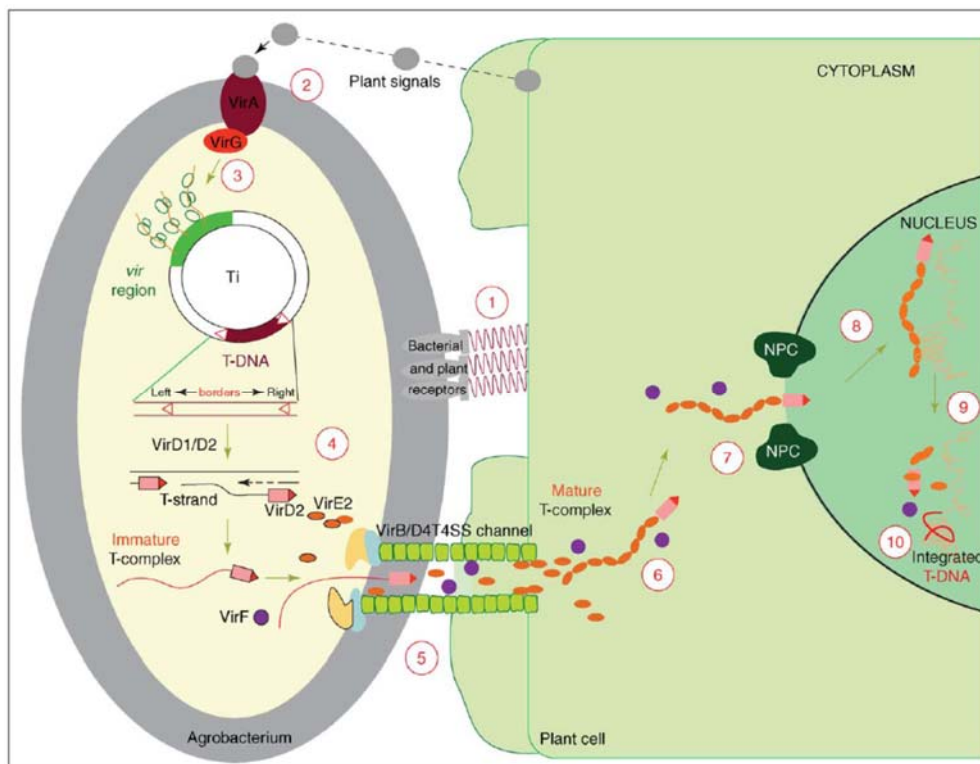


Figura 1. Modelo de la transformación genética mediada por *Agrobacterium*. El proceso de transformación se resume en 10 pasos: (1) Unión de *Agrobacterium* a la planta; (2) reconocimiento de las señales de la planta por VirA y VirG; (3) expresión de los genes *vir*; (4) liberación de una cadena del T-DNA y reparación del plásmido Ti; (5) exportación del complejo inmaduro T a la célula huésped; (6) formación del complejo T maduro; (7) transporte del complejo T al núcleo; (8) acercamiento del complejo T al lugar de inserción; (9) liberación de la cadena T respecto a las proteínas Vir asociadas; (10) integración del T-DNA al genoma de la célula huésped. [Fuente: Extraído de Tzfira y Citovsky, 2006]

En la naturaleza, la infección por *Agrobacterium* causa una enfermedad en la planta llamada agallas del cuello (Smith y Townsend, 1907). En el año 1983 tres grupos de investigación independientes describieron la aplicación de esta característica de *Agrobacterium* como herramienta para la transformación de plantas con genes de interés (Bevan *et al.*, 1983; Fraley *et al.*, 1983; Herrera-Estrella *et al.*, 1983). Sin embargo, para que el uso de esta herramienta fuera una realidad viable en la ingeniería genética de plantas tuvieron

que sucederse algunas mejoras en el sistema de transformación. Primero, Hoekema y colaboradores (Hoekema *et al.*, 1983) modificaron el plásmido Ti hasta conseguir un vector binario. Este sistema incluye un plásmido Ti con la región T-DNA sin los genes patogénicos; y un segundo plásmido con los genes *vir* que permiten la transferencia de DNA a la célula de la planta. Posteriores mejoras en el sistema binario de plásmido Ti y modificaciones en las condiciones de transformación permitieron superar una de las mayores desventajas de la técnica: la transferencia del DNA a plantas monocotiledóneas. Recientemente se ha conseguido transformar con éxito especies monocotiledóneas importantes en agricultura como trigo, maíz, sorgo y cebada (Veluthambi *et al.*, 2003).

Una alternativa muy frecuente a *Agrobacterium* para introducir genes nuevos en las células de plantas es la tecnología de bombardeo de micropartículas o biolística. En esta técnica el DNA se adhiere a la superficie de micropartículas metálicas inertes, normalmente partículas de oro, que se impactan a gran velocidad sobre los tejidos vegetales (Sanford, Smith y Russell, 1993). Una pequeña parte del DNA puede llegar a entrar el núcleo de las células e integrarse en el genoma vegetal. Los primeros eventos de transformación exitosos con esta técnica usaron partículas de tungsteno recubiertas de DNA, que se dispararon sobre células epidérmicas de cebolla (Klein, Wolf, Wu y Sanford, 1987). La biolística se usó para producir los primeros cereales transgénicos de importancia económica como maíz (Fromm *et al.* 1990), arroz (Christou, Ford y Kofron, 1991), caña de azúcar (Bower y Birch, 1992) y trigo (Vasil, Castillo, Fromm y Vasil, 1992).

Los protocolos de transformación estable requieren en general un paso de regeneración *in vitro* para obtener plantas transgénicas después de la transformación de células o tejidos. Para la regeneración de plantas a partir de células transformadas existen dos metodologías principales: la organogénesis y la embriogénesis somática. Ambas implican la dediferenciación de tejidos vegetales en presencia de hormonas; la selección de células transformadas mediante genes de resistencia a antibióticos o herbicidas; y regeneración. Una vez regeneradas, las plantas transformadas pueden incorporarse en los programas de mejora genética convencionales. La transformación genética de plantas tiene como consecuencia, además de la característica buscada, un cierto grado de cambios genómicos no intencionados derivados de los propios mecanismos de inserción, y de los procesos de cultivo *in vitro*. Los mecanismos moleculares por los cuales tiene lugar la inserción del transgén en el genoma huésped son aun parcialmente desconocidos (Tzfira y Citovsky, 2006). Parece ser que la transformación mediada por *Agrobacterium* provocaría deleciones tanto a pequeña escala como a gran escala, así como reordenaciones del DNA de la planta e inserciones de DNA superfluo. Por otra parte, el bombardeo de micropartículas parece estar asociado con disrupciones del genoma, silenciamiento genético, reordenaciones e inserciones de DNA superfluo (Latham, Wilson y Steinbrecher, 2006). Por tanto, las mutaciones inducidas por la transformación genética pueden causar cambios en el lugar de la inserción del transgén o en sitios aleatorios con efectos colaterales no deseados. El uso de plantas MG para fines de investigación y, sobre todo, comerciales, requiere la selección de aquellos eventos de transformación cuyas modificaciones no modifiquen indeseadamente las características fenotípicas, biológicas y comerciales. Esto suele conseguirse por los propios mecanismos de selección y regeneración.

Tecnologías emergentes de obtención de plantas MG

Las modificaciones génicas no deseadas (modificaciones no específicas, pautas de lectura interrumpidas, silenciamiento génico, etc.) y la presencia de genes marcadores de selección pueden provocar efectos no intencionados producidos por la transformación nuclear. Por este motivo, existe un interés general para desarrollar tecnologías más “limpias” y dirigidas. Actualmente existen métodos de obtención de plantas de tipologías muy diferentes que incluyen (ver Anexo II para las definiciones concretas):

- Cisgénesis e intragénesis
- *Oligonucleotide directed mutagenesis* (ODM)
- *Zinc finger nuclease* (ZFN)
- *Transcription Activator-Like Effector Nuclease* (TALENs)
- *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)
- *Reverse breeding*
- *RNA-dependent DNA methylation* (RdDM)
- Genómica sintética

Aunque la mayoría de métodos aún no son una realidad frecuente en la mejora genética de plantas con fines comerciales, se están empezando a estudiar y debatir los aspectos legislativos desde un punto de vista de seguridad alimentaria y ambiental (Lusser, Parisi, Plan, y Rodríguez-Cerezo, 2012). La cisgénesis, la intragénesis y la mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (ODM) son actualmente las tecnologías que más están adoptando las empresas de mejora de variedades vegetales (Lusser *et al.* 2011).

Un cisgénico es un organismo al que se le ha introducido un gen (incluyendo las secuencias reguladoras como intrones, promotores o terminadores) que proviene de la misma especie receptora, y por tanto el acervo genético de la especie no cambia (Schouten, Krens y Jacobsen, 2006). En un organismo intragénico el gen insertado puede ser una combinación de fragmentos de DNA de la propia especie o de una especie sexualmente compatible. Por contraposición, un transgénico es un organismo que ha incorporado en su genoma un transgén, la secuencia del cual procede, al menos parcialmente, de otra especie. Aunque la obtención de cisgénicos y transgénicos requiere el uso de las mismas tecnologías de modificación genética, algunos científicos defienden que son conceptualmente distintos (Schouten *et al.* 2006). Entidades como JRC (*Joint Research Center*) y EFSA (*European Food Safety Agency*) han elaborado documentos respecto a las consideraciones científicas de los intragénicos y cisgénicos (Lusser *et al.*, 2011; EFSA Panel on Genetically Modified Organisms, 2012). La EFSA constató en estos documentos que los cisgénicos no presentan peligros adicionales diferentes a los asociados al cruzamiento de cultivos convencionales (EFSA 2012c). Este hecho es particularmente relevante desde un punto de vista de seguridad alimentaria y regulación (Kok *et al.*, 2008 EFSA Panel on Genetically Modified Organisms, 2012).

Las técnicas basadas en nucleasas (ZFN, TALENS, CRISPR) se presentan como una alternativa muy atractiva (Yau y Neal 2013) ya que permiten la mutagénesis dirigida evitando el uso de genes de selección. El gran número de publicaciones recientes acerca de estas tecnologías indica el interés que suscitan (Belhaj *et al.* 2013; Bortesi y Fischer 2014; Kim y Kim 2014). La ingeniería dirigida del genoma (esto es, la

modificación del genoma en un *locus* preciso y predeterminado) es una tecnología extensamente aplicada en los campos de la biomedicina y la biotecnología, y está progresando de manera rápida en el campo de la mejora vegetal. Esta tecnología supone una ventaja respecto a la mejora clásica de plantas y a los métodos de transformación genética actuales. Hasta hace pocos años, las ZFN eran la única opción viable a la práctica para la edición genómica dirigida (Kim y Kim 2014). A finales del 2011, la revista *Nature Methods* definió las ZFN y las TALENs como herramientas novedosas y prometedoras para la edición genómica (Nature Publishing Group 2012). Un año más tarde, varios grupos de investigación informaron sobre un nuevo tipo de nucleasas, las CRISPR/Cas. Éstas se descubrieron en el sistema adaptativo inmune de las bacterias, y su especificidad viene determinada por un sRNA (*small non-coding RNA*) (Cho *et al.* 2013; Hwang *et al.* 2013; Jiang *et al.* 2013; Sorek *et al.* 2013).

Las nucleasas quiméricas ZFN, TALENs y CRISPR/Cas siguen el mismo mecanismo de acción: cortan el DNA cromosómico en un sitio específico, lo que activa el sistema endógeno de reparación del DNA y, consecuentemente, se puede generar una modificación genética dirigida. La versatilidad de estas nucleasas recae en la posibilidad de modificar el dominio de unión de las nucleasas al DNA para que éstas reconozcan específicamente la secuencia de interés. Estos dominios se pueden combinar con numerosos dominios efectores para alterar cualquier estructura y función genómica, incluyendo nucleasas, factores de transcripción, recombinasas, transposasas y transferasas (Gaj, Gersbach y Barbas, 2013).

El *reverse breeding* y la RdDM son tecnologías mucho menos instauradas; y la biología sintética por ahora está lejos de tener relevancia en el cultivo de plantas. Otras técnicas emergentes como las meganucleasas o transposones también podrían usarse en un futuro para la ingeniería genética de plantas (Kim y Kim, 2014).

2. Transgénesis en la mejora genética de plantas

En los años 70 del siglo XX se consiguió transferir por primera vez DNA entre células bacterianas en el laboratorio (Cohen, Chang, Boyer y Helling, 1973). El genoma de las bacterias o levaduras se ha modificado para mejorar la elaboración de algunos alimentos fermentados (pan, queso o vino, por ejemplo). También se han usado para producir enzimas y proteínas recombinantes de uso terapéutico (insulina, hormona de crecimiento) o industrial. En Europa se usan microorganismos modificados genéticamente desde los años 90. Cabe remarcar la importancia de los OMG para investigación, ya que es posible modificar el genoma de los organismos de estudio para conocer funciones de genes y comprender rutas biológicas. Paralelamente, muchas de las herramientas que se usan en investigación se han obtenido mediante ingeniería genética (vectores, enzimas, etc.).

En el año 1974 se consiguió el primer ratón transgénico, pero la modificación genética no se transmitió a la descendencia (Jaenisch y Mintz, 1974). En el 1982 Richard Palmiter y Ralph Brinster inyectaron el gen de la hormona del crecimiento en un embrión de ratón y lograron que éste se transmitiera a las siguientes generaciones por primera vez (Palmiter *et al.* 1982). En noviembre del 2015, EEUU aprobó un salmón con la hormona de crecimiento modificada (*AquaAdvantage*® de la empresa AquaBounty): se trata del primer animal transgénico para consumo de la historia (www.aquabounty.com, 2016).

Plantas transgénicas

La generación de plantas modificadas genéticamente (PMG), igual que la mejora por cruzamiento convencional, da lugar a plantas con mejores características agronómicas y nutricionales. Si la nueva característica deseada no se encuentra en el acervo genético de aquella especie, ésta se puede obtener mediante transformación (PMG) o a través de métodos clásicos mediante mutagénesis inducida por agentes mutagénicos o radiación ionizante (Ahloowalia y Maluszynski 2001), aunque este proceso es impredecible y puede provocar mutaciones genómicas no intencionadas importantes. La primera PMG obtenida fue un tabaco con resistencia a antibióticos (Fraley *et al.* 1983) y la primera en comercializarse fue el tomate *FlvSavr*® en el año 1994. A partir de entonces el desarrollo y uso de las PMG destinadas a consumo humano y animal ha aumentado de forma continua (Figura 2 A).

Aunque las PMG están sujetas a regulaciones muy estrictas (ver apartado “Marco regulador de los OMG en la Unión Europea” más adelante), a día de hoy suscitan controversias recurrentes a nivel social y político. La evaluación de la seguridad de las PMG destinadas a cultivo y alimentación animal o humana va a ser tratada en esta tesis doctoral.

El año 2016 es el vigésimo primer año consecutivo de comercialización de cultivos biotecnológicos, y durante este período el área global destinada a su cultivo ha ido en rápido aumento. A diferencia de la tendencia en los primeros años, en los últimos cinco años los países en vías de desarrollo han sembrado mayor superficie de cultivos biotecnológicos que los países desarrollados (Figura 2 A). Actualmente, existen eventos transgénicos en 40 países, siendo EEUU, Brasil, Argentina, India y Canadá los países con mayor superficie de cultivos MG. Las especies que predominan el área MG cultivada son la soja, el maíz, el algodón y la colza (ISAAA's GM Approval Database) (Figura 2 B).

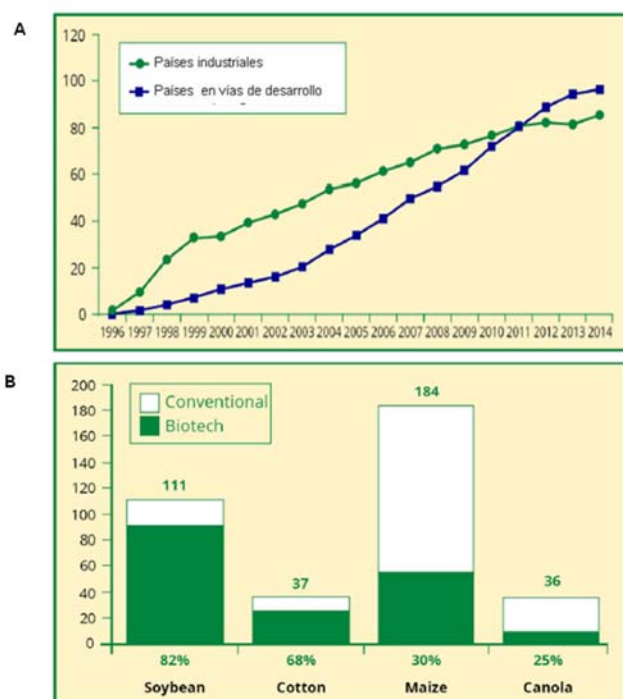


Figura 2. A) Evolución del área destinada a cultivos biotecnológicos, desde 1996 a 2014, en países industriales y en vías de desarrollo (en millones de hectáreas). B) Porcentaje del área destinada a los cuatro cultivos MG más importantes en 2014 (en millones de hectáreas). [Fuente: Clive James (ISAAA 2014)]

A día de hoy (junio 2016) se han autorizado 390 eventos de transformación y existen 107 genes modificados que implican la modificación de 37 caracteres. Los caracteres MG comercializados incluyen (ISAAA's GM Approval Database):

- Tolerancia a herbicidas
- Resistencia a insectos
- Tolerancia a estrés abiótico
- Resistencia a plagas
- Alteración del crecimiento o rendimiento
- Modificación de la calidad nutritiva
- Control del sistema de polinización

Las características agronómicas que han tenido más éxito comercialmente son las que confieren resistencia a insectos o tolerancia a herbicidas. Asimismo, muchas de las PMG que se cultivan llevan eventos apilados (*stacked events*), es decir múltiples eventos de transformación combinados, que expresan dos o más de estos caracteres (Figura 3). Las PMG que aportan beneficios a nivel agronómico son las llamadas de “primera generación”. Algunos ejemplos importantes de este tipo de eventos se muestran en la Tabla 1. Las investigaciones actuales se centran en producir variedades de PMG que aporten mejoras nutricionales o industriales como semillas de soja con niveles de ácidos grasos modificados o maíz que expresa una α -amilasa termostable. Estos son los llamados OMG de “segunda generación” ya que confieren beneficios directamente al consumidor.

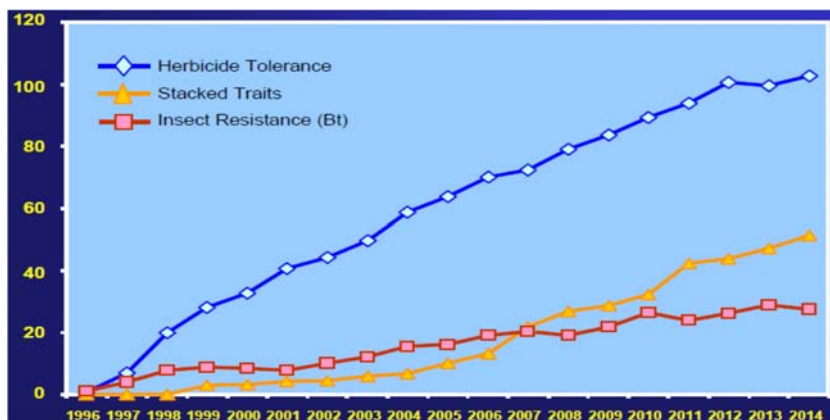


Figura 3. Evolución del área destinada a cultivos biotecnológicos a nivel global, desde 1996 a 2014. [Fuente: Clive James (ISAAA 2014)]

i. PMG tolerantes a herbicidas

Las variedades de PMG tolerantes a herbicidas no selectivos de amplio espectro, como el glifosato y el glufosinato, ofrecen una alternativa muy simple para el control de malas hierbas. El glifosato inhibe la enzima EPSPS (5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa) que está implicado en la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales, además de vitaminas y otros compuestos secundarios importantes. Este herbicida fue desarrollado cerca del año 1970 por la empresa Monsanto bajo el nombre de Roundup®. Las PMG tolerantes a glifosato (llamadas Roundup Ready® o RR) tienen incorporado (i) un gen bacteriano que codifica una variante de EPSPS que es tolerante al glifosato, por ejemplo, el procedente de la cepa CP4 de *A. tumefaciens*, *cp4-epsps*; o bien (ii) un gen que codifica una enzima que degrada el glifosato (gmo-

compass.org, 2016). Por otra parte, el glufosinato (una sal de amonio del aminoácido fosfotricina) bloquea la enzima glutamina sintasa, que está implicada en el metabolismo del nitrógeno. De esta forma, se incrementa el nivel de amonio intracelular, que resulta tóxico para las células. Estos herbicidas se conocen con el nombre de Liberty®, Rely® o Basta® y fueron desarrollados por Bayer en 1984. Las plantas modificadas para tolerar el glufosinato (LibertyLink® o LL) llevan un gen bacteriano *pat* o *bar* (*phosphinothricin N-acetyltransferase*) que produce una enzima que detoxifica la fosfotricina y así se evita que se vean afectadas por el herbicida (gmo-compass.org, 2016).

Tabla 1. Ejemplos de eventos de PMG con tolerancia a herbicida, resistencia a insectos y eventos apilados.

Nombre del evento	Especie	Nombre comercial	Gen(es) introducido(s)	Año autorización
Tolerancia al herbicida Glifosato				
GT73	Colza	Roundup Ready™	<i>cp4 epsps</i>	1994
GTS 40-3-2	Soja	Roundup Ready™	<i>cp4 epsps</i>	1995
MON1445	Algodón	Roundup Ready™	<i>cp4 epsps</i>	1995
GA21	Maíz	Roundup Ready™	<i>mepsps</i>	1997
NK603	Maíz	Roundup Ready™	<i>cp4 epsps</i>	2000
Tolerancia al herbicida Glufosinato				
HCN92 (Topas 19/2)	Colza	Liberty Link™ Innovator™	<i>bar</i>	1995
T14	Maíz	Liberty Link™	<i>pat</i>	1995
A2704-12	Soja	Liberty Link™	<i>pat</i>	1996
Resistencia a insectos lepidópteros				
Bt176	Maíz	NaturGard KnockOut™	<i>cry1Ab; bar</i>	1995
MON810	Maíz	YieldGard™	<i>cry1Ab</i>	1995
MIR162	Maíz	Agrisure™ Viptera	<i>vip3Aa20</i>	2008
Bt Brinjal Event EE1	Berenjena	BARI Bt Begun	<i>cry1Ac</i>	2013
Eventos apilados				
MS8	Colza	InVigor™	<i>bar; barnasa</i>	1996
Bt11	Maíz	Agrisure™ CB/LL	<i>cry1Ab, pat</i>	1996
TC1507	Maíz	Herculex™ I	<i>cry1Fa2; pat</i>	2001
MXB-13	Algodón	WideStrike™	<i>cry1F, cry1Ac</i>	2004

ii. PMG resistentes a insectos

Actualmente se comercializan PMG con resistencia a insectos en soja, maíz, algodón y berenjena (ISAAA's GM Approval Database). Dichas PMG se han desarrollado mediante la inserción de genes que codifican toxinas con propiedades insecticidas derivadas de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (de Maagd *et al.* 1996). Existen PMG que confieren resistencia a coleópteros (comúnmente conocidos como escarabajos) y a lepidópteros (mariposas), siendo estas últimas las más importantes económicamente y exitosas a nivel comercial (Tabla 1). Las plagas de lepidópteros más importantes a escala global son las causadas por el gusano del algodón y el taladro del maíz (www.extension.umn.edu, 2016). Las plantas Bt, se discutirán en detalle más adelante ya que en este trabajo se ha usado como planta MG modelo el maíz MON810 resistente a lepidópteros.

iii. Otras plantas MG

Las PMG con resistencia a insectos han sido las más exitosas, sin embargo, aún no se han logrado plantas resistentes a estrés biótico causado por virus u hongos. Este tipo de caracteres se han empezado a desarrollar sobre todo en patata (*Solanum tuberosum* L. (1753)). Concretamente, se han autorizado 15 eventos de patata resistentes al virus Y de la patata (PVY) mediante la inserción de genes que codifican la proteína de la cápside de este virus (*pvycp* (*coat protein of PVY*)) (ISAAA, 2016).

Se han caracterizado numerosos genes de resistencia (genes R) de diferentes especies de plantas que confieren resistencia a bacterias, hongos, virus, nematodos o insectos. La mayoría de estos forman parte de una familia multigénica muy conservada y se ha trabajado con su posible utilización para el desarrollo de variedades resistentes mediante cisgénesis o intragénesis. Respecto a plantas resistentes a hongos, únicamente se ha autorizado la patata W8, transformada con el gen de resistencia *rpi-vnt1*. Este gen proviene de la patata salvaje *Solanum venturii* H & H. (1960) (ISAAA, 2016), resistente al tizón tardío provocado por el hongo *Phytophthora infestans* (Van Der Vossen *et al.* 2003; Park *et al.* 2005; Champouret *et al.* 2009).

Además, también se han dedicado esfuerzos en la producción de PMG que incorporen diversas modificaciones en los productos de reserva (aceite, almidón), y en consecuencia presenten ventajas nutricionales o industriales. Un ejemplo conocido es la patata Amflora[®], cuyo gen *gbss* (*granule bound starch synthase*) se inactiva por la tecnología antisentido. De esta forma, la patata produce almidón con un contenido muy bajo de amilosa, lo cual es una característica muy atractiva para la industria papelera. La patata Amflora[®] (EH92-527-1) fue aprobada en el año 2010 para cultivo y comercialización con fines industriales (no alimentarios): se trata del tercer evento GM aprobado para cultivo en la UE, después del maíz MON810 (ver apartado “Caso particular del maíz evento MON810”, en la página 33) y el maíz Bt176 (cuya aprobación se suspendió en 2007). Sin embargo, la empresa BASF Plant Science retiró su cultivo de la UE en 2012.

Otras aplicaciones prometedoras de las plantas MG son la fitoremediación, plantas biofactoría (*molecular farming*) o la biofortificación. La fitoremediación consiste en el uso de las plantas para eliminar o degradar contaminantes del suelo o agua como mercurio (Ruiz y Daniell 2009) o contaminantes volátiles (Doty *et al.* 2007). Las plantas biofactoría podrían producir algunas sustancias para uso terapéutico como medicamentos antimaláricos (Pulice *et al.* 2016). Y finalmente, la biofortificación se centraría en obtener cultivos con mayor cantidad de nutrientes y vitaminas, como arroz con mayor contenido de hierro para hacer frente a la desnutrición en algunas zonas, como Asia (Masuda *et al.* 2013).

Plantas Bt

Las plantas Bt son resistentes a insectos por expresar genes de *B. thuringiensis* (de sus iniciales deriva el nombre Bt) con propiedades insecticidas. La característica principal de *B. thuringiensis* es que en su fase de esporulación produce cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para las larvas de insectos. Estas proteínas reciben el nombre de Cry (de cristalinas) y son la base de los insecticidas más extendidos en el mundo. Los cristales están formados por proteínas y cada cuerpo cristalino puede estar

formado por una o varias proteínas Cry. Actualmente se han descrito más de 700 tipos de proteínas Cry que se clasifican en función de su similitud de secuencia. La información actualizada sobre los genes codificantes de Cry se encuentra en la base de datos de las toxinas Bt (Crickmore *et al.* 1998, www.btnomenclature.info). El mecanismo de acción está bien descrito (de Maagd *et al.* 2003; Bravo *et al.* 2007; Sauka y Benintende 2008) (Figura 4) y se resume a continuación.

Las toxinas de *B. thuringiensis* son ingeridas por el insecto y solubilizadas por las proteasas intestinales y el pH alcalino de los insectos, para pasar del estado inactivo protoxina al estado activo de la toxina. La forma monomérica de la toxina es capaz de atravesar la membrana peritrófica y unirse covalentemente a proteínas del tipo cadherina. De acuerdo con estudios realizados en cultivos celulares de insectos se inicia a continuación una cascada de señalización dependiente del ion magnesio, que culminaría en muerte celular. Por otro lado, en base a experimentos *in vitro* se ha propuesto que la unión de monómeros de Cry a cavadherinas facilita el clivaje proteolítico en el extremo N-terminal de la toxina. Esto induciría el ensamble de los monómeros para formar una forma oligomérica preporo. Finalmente, un receptor secundario del tipo aminopeptidasa N (APN) o fosfatasa alcalina (ALP) se uniría al pre-poro para facilitar la formación de un poro, provocando un desequilibrio osmótico y consecuentemente la muerte celular.

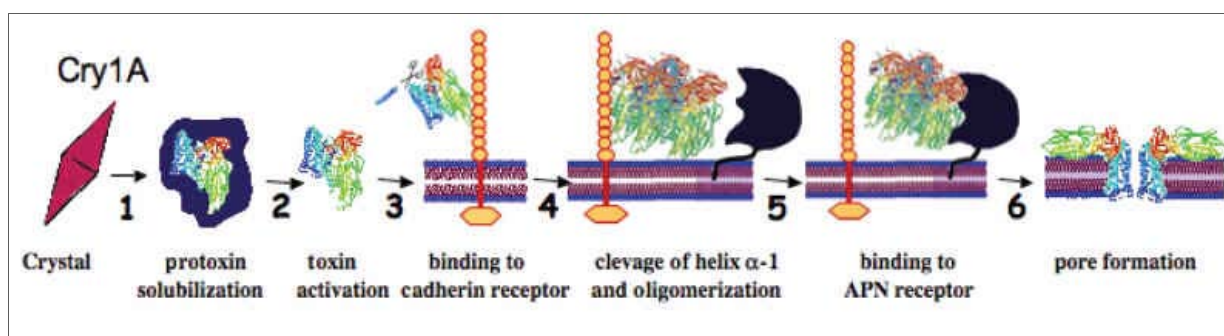


Figura 4. Mecanismo de acción de las proteínas Cry. 1) Solubilización de la protoxina; 2) activación de la toxina; 3) unión de la toxina a la cadherina y formación de la forma monomérica activa; 4) formación de la estructura oligomérica preporo; 5) unión de la APN o ALP; 6) formación del poro y muerte celular. [Adaptado de de Maagd RA1, Weemen-Hendriks M, Molthoff JW, 2003]

Es importante tener en cuenta que no existen sitios específicos de unión de las endotoxinas Cry de *B. thuringiensis* en las superficies de las células intestinales de mamíferos, de forma que ni el ganado ni los humanos somos susceptibles a estas proteínas. Existen muchos estudios de revisión que reportan dicha inocuidad: McClintock *et al.* 1995; Betz *et al.* 2000; Siegel 2001 y más recientemente Koch *et al.* 2015.

A pesar de que la mayor parte de PMG autorizadas actualmente se basan en proteínas Cry (fundamentalmente Cry1, fuertemente tóxica para lepidópteros), se conocen en *B. thuringiensis* otros factores de virulencia, también específicos contra insectos, como las proteínas Vip, Cyt, y Sip. Concretamente Vip3 confiere resistencia a lepidópteros en PMG de maíz y algodón autorizadas.

3. Cultivo y comercialización de las PMG

Situación en la UE

Actualmente, el número de PMG autorizadas en la UE para uso en alimentos y piensos asciende a 55; e incluyen eventos de maíz, algodón, soja, colza y remolacha azucarera. Por otra parte, se están tramitando 58 expedientes de solicitud, 17 de los cuales han recibido una evaluación favorable por parte de EFSA faltando la aprobación final por parte de los Estados Miembros (EEMM) y de la Comisión Europea. La lista de PMG autorizadas y el alcance preciso de la autorización puede consultarse en el registro de alimentos y piensos modificados genéticamente de la UE, que se encuentra en la siguiente dirección: ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm. Existen 8 solicitudes de cultivo de PMG en la UE todavía no resueltas, entre los que se incluye la renovación de la autorización del maíz MON810 (ec.europa.eu/index_en.htm, 2016).

En la UE se necesitan unos 40 millones de toneladas de soja al año para alimentar al ganado. Sin embargo, se producen menos de 2 millones de toneladas de soja (que es soja no MG, porqué en la UE no se ha autorizado ningún evento de soja MG para cultivo) (faostat.fao.org, 2016). Por tanto, el sector ganadero de la UE depende en gran medida de la producción en terceros países para la proteína de origen vegetal en los que el cultivo de OMG está muy extendido. Concretamente en 2013, la UE importó más del 60% de sus necesidades de proteína vegetal proveniente de Brasil, Argentina, Estados Unidos y Paraguay. Por lo que se refiere a los alimentos, el número de productos con ingredientes MG que pueden adquirirse en el mercado de la UE es pequeño. La UE, pues, importa grandes cantidades de piensos MG, pero un volumen muy pequeño de alimentos MG (ec.europa.eu/index_en.htm, 2016). Muchas empresas alimentarias han tomado la decisión de no vender alimentos que contengan ingredientes, o estén fabricados a partir de OMG. Esto puede estar relacionado con las obligaciones en materia de etiquetado establecidas en la normativa europea (ver apartado “Etiquetado y trazabilidad”), así como con la disponibilidad de alternativas convencionales no transgénicas. Actualmente, el único evento MG que está autorizado en la UE para cultivo y producción de semillas es el maíz MON810.

Caso particular del maíz evento MON810

El maíz

El maíz, *Zea mays* L. (1753), es una especie de la familia de las gramíneas que se considera originaria de América Central y debió aparecer en los albores de la agricultura, hace entre siete y diez mil años. A pesar de los estudios arqueológicos y biológicos realizados, existe todavía cierta discrepancia acerca de su origen. La presencia de restos de mazorcas pequeñas en yacimientos arqueológicos de hace más de 5.000 años en México, así como el descubrimiento de polen de maíz fósil, soportan la idea de que esta planta se originó en México. Sin embargo, el hallazgo de palomitas de maíz antiguas en la zona de los Andes en Bolivia y Perú sugeriría un origen en esta región. También podría haberse formado en la región asiática del Himalaya (Ranum, Peña-Rosas y Garcia-Casal, 2014), por un cruce entre alguna especie del género *Coix spp* y alguna especie de *Andropogoneae*, probablemente del género *Sorghum*. Respecto a sus ancestros, la idea más aceptada actualmente es que el maíz habría evolucionado a partir del teosinte

por selección humana. Se considera que el maíz fue una de las primeras plantas domesticadas ya que los agricultores primigenios guardarían las semillas con mejores características para la cosecha del año siguiente. De hecho, el maíz es un claro ejemplo de planta seleccionada artificialmente porque no puede crecer de manera salvaje sin los cuidados del hombre. Se piensa que la evolución del maíz desde el teosinte se dio de forma relativamente rápida e implicó cambios en cinco regiones importantes del genoma que provocarían diferencias morfológicas dramáticas (Doebly y Stec, 1993). El maíz moderno presenta menos ramas por tallo, tiene una mazorca mayor y los granos más expuestos (no encapsulados) que el teosinte, como se puede comprobar en la Figura 5.

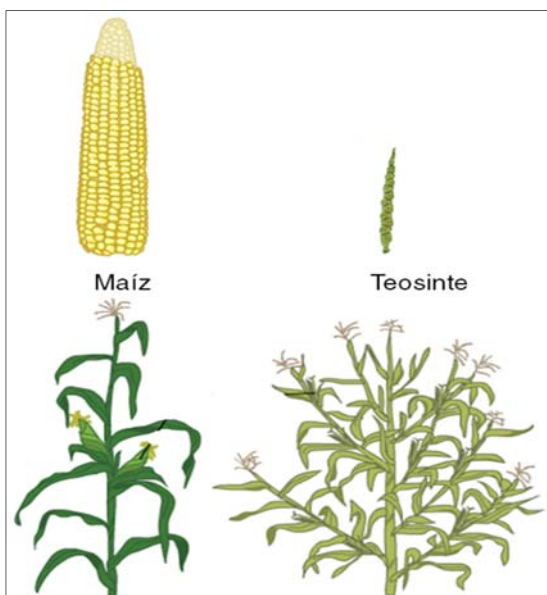


Figura 5. Representación de la mazorca y la parte aérea de la planta de maíz moderno (izquierda) y su probable ancestro salvaje, el teosinte (derecha). [Fuente: *University of Utah*]

Durante los últimos dos mil años de domesticación del maíz, los nativos americanos lo expandirían por todo el continente, de forma que se adaptó de manera diferente en cada región, lo que habría dado lugar a gran número de variedades. Los cambios genéticos que han provocado la obtención del maíz que se cultiva actualmente (*Zea mays* spp. *mays*) habrían implicado cambios menores en muchos genes (Doebly y Stec, 1993). El cambio más significativo fue el aumento de tamaño de las mazorcas, lo que permitió que el maíz fuera una buena fuente de alimento. Además, el maíz es una planta C4 con una alta tasa fotosintética y, por tanto, tiene un buen rendimiento. La plasticidad del genoma del maíz ha facilitado que, durante la domesticación de este cereal, se obtengan variedades con características muy diversas (tipo, forma y color del grano; niveles de almidón; adaptación a diferentes climas y resistencia a plagas) (Figura 6).

Los primeros exploradores europeos introdujeron este cereal en Europa durante los siglos XVI y XVII y más tarde en otras partes del planeta gracias a la habilidad del maíz de crecer en climas muy diversos. La importancia del maíz para la alimentación en Europa no fue relevante hasta el siglo XIX. Hacia principios del siglo XX se obtuvieron las primeras semillas híbridas y nació la disciplina que ahora conocemos como mejora vegetal. La mejora genética vegetal vino impulsada gracias al redescubrimiento de las teorías de la herencia genética de Mendel, el descubrimiento de los cromosomas, la enunciación de la teoría de la selección natural y el conocimiento de la polinización de las plantas. En Europa, la empresa Gartons Brothers, en Inglaterra, es considerada la primera empresa de mejora de semillas (Figura 7 A). Norman Borlaug, en la década de los años 40 del siglo XX, fundó el CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento

de Maíz y Trigo) en México mediante el apoyo de la fundación Rockefeller y el gobierno mexicano. Este centro es uno de los más importantes a nivel de mejora de cultivos. De hecho, en el CIMMYT fue donde se gestó la revolución verde ya que se impulsaron programas rigurosos y sistemáticos para el mejoramiento del trigo, el maíz y otros cereales. Estos programas supondrían un mayor rendimiento de los cultivos gracias a la modernización de las técnicas agrícolas, expandiendo los sistemas de irrigación, distribución de semillas híbridas, fertilizantes y pesticidas. La revolución verde implicó que México pasara de ser importador de trigo a ser exportador neto en los años 60. Además gracias al aumento de producción agrícola se disminuyó la hambruna a nivel mundial (Weckwerth 2011; faostat.fao.org, 2016). N. Borlaug recibió el Premio Nobel de la Paz en el año 1970 (Figura 7 B). Más tarde, la ingeniería genética, y como resultado el cultivo y comercialización de PMG supuso un paso más en la tecnificación de la agricultura. El maíz resistente a insectos (o maíz *Bt*) fue el primer maíz MG que se autorizó en EEUU en el 1996. A partir de entonces, el cultivo y producción de maíz transgénico se expandió rápidamente: en el año 2014, el 30% del maíz producido mundialmente provenía de cultivos MG (ISAAA 2014) Figura 2 B.

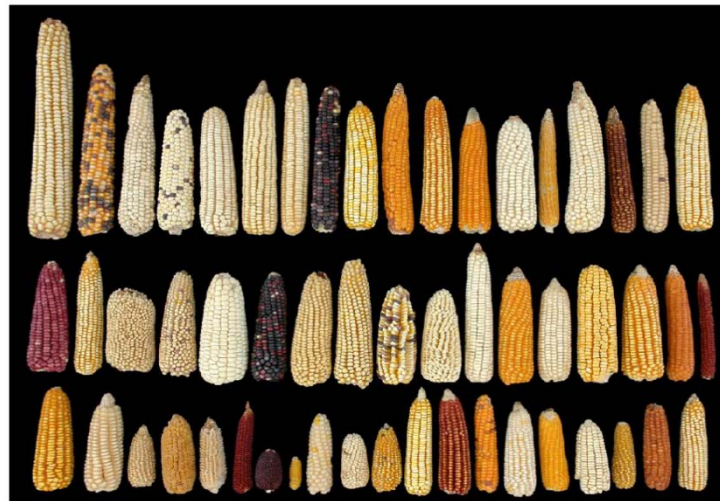


Figura 6. Tipologías de mazorcas de diferentes variedades de maíz. [Fuente: CIMMYT]

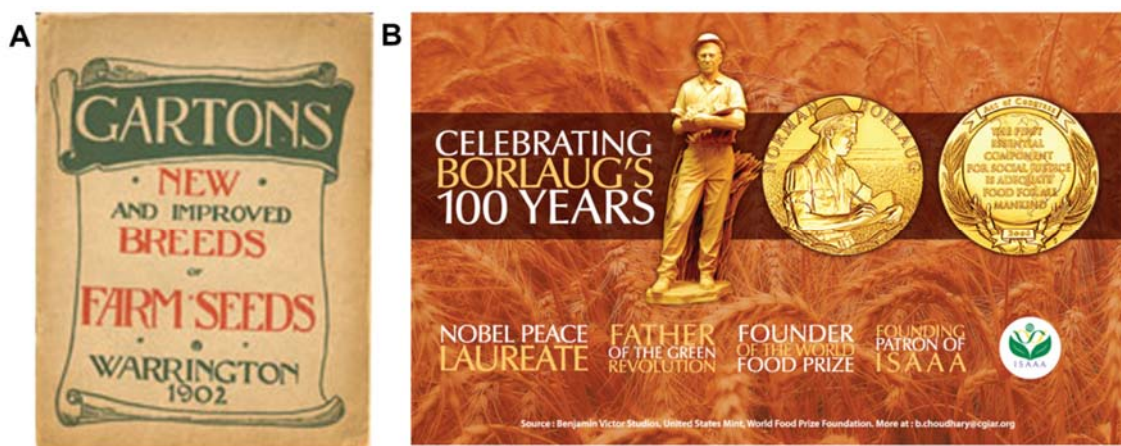


Figura 7. A) Catálogo de semillas de la empresa *Garton Brothers*. B) En el año 2014 se celebraron los 100 años del nacimiento de N. Borlaug. (Fuente: ISAAA).

La secuencia del primer genoma vegetal, de *Arabidopsis*, fue publicada en el año 2000 (Arabidopsis Genome Initiative 2000). Cinco años más tarde se publicó el de la primera planta monocotiledónea, el arroz (International Rice Genome Sequencing Project, 2005) y en el 2009 se lanzó la secuencia completa del genoma del maíz, *Zea mays* cv. B73 (RefGen_v1) (Schnable *et al.*, 2009). El genoma del maíz tiene unas 2,4 gigabases (Gb) con un número haploide de cromosomas igual a 10; consta de 63.391 genes, que codifican 39.469 proteínas (plants.ensembl.org, 2016). El maíz además se ha usado como planta modelo y herramienta para estudios de fisiología y genética vegetal. Por ejemplo, Barbara McClintock (Premio Nobel de Medicina, 1983) descubrió los transposones en *Cold Spring Harbor* hacia los años 1950 gracias a sus estudios de genes en el maíz (McClintock 1950).

Importancia actual del maíz

El maíz se cultiva prácticamente en todas las zonas del mundo (Figura 8 A), bajo ambientes muy diversos: desde climas tropicales a templados y desde zonas montañosas a costeras. Desde hace más de una década, el maíz es el cereal con mayor producción en el mundo, seguido por el arroz, el trigo, la cebada y el sorgo (Figura 8 C). En los últimos 20 años, los mayores productores de maíz a escala global han sido EEUU, China y Brasil, produciendo conjuntamente el 67% del maíz mundial (faostat.fao.org, 2016) (Figura 8 B). En la Unión Europea, la producción de cereales la encabeza el trigo, seguido del maíz; siendo Francia, Rumania e Italia los mayores productores europeos de este cereal (faostat.fao.org, 2016)

El grano del maíz, uno de los más versátiles, puede ser cocinado, secado y/o molturado, para producir harinas, aceites y jarabes. El maíz para consumo humano se presenta en una gran diversidad de productos: maíz tostado, maíz dulce, palomitas, copos de maíz, tortitas, almidón, etc. Los países con mayor tasa de consumo de maíz para alimentación humana son Lesotho, Malawi, México, Zambia y Zimbabue (faostat.fao.org, 2016). Sin embargo, el uso principal del maíz es la producción de piensos para alimentación del ganado, aprovechándose también la parte verde de la planta para obtener ensilados. En el año 2014, el continente europeo destinó un 74% del maíz para fabricar piensos, cerca del 20% para uso industrial ("International Grains Council," 2015) en forma de almidones, aceites o para obtener bioetanol; y únicamente el 5% restante se destinó a la alimentación humana.

El maíz MON810

El evento MON810 de maíz (comercialmente conocido como YieldGard®) fue desarrollado por Monsanto en el año 1996 para ser resistente a los insectos *Ostrinia nubilialis* y *Sesamia nonagrioides*, conocidos como taladro europeo que causan una de las plagas más importantes del maíz. Las larvas de estos insectos atacan el maíz por el tejido vascular, a nivel de la base del tallo o de la mazorca, obstruyendo la circulación de agua, azúcares y nutrientes. Como consecuencia se debilita la caña, lo que hace la planta vulnerable al viento; y los granos se desarrollan de forma defectuosa, con menor "llenado", lo que conlleva un menor rendimiento. Además, el ataque del taladro facilita, a través de las heridas, otras infecciones de microorganismos oportunistas como hongos (muy frecuentes los del género *Fusarium sp.*), algunos de los cuales producen micotoxinas, especialmente fumonisinas y zearalenonas tóxicas para humanos y animales (EFSA 2009) (Comisión Europea, Reglamento N° 1881/2006). El taladro genera, pues, pérdidas en el rendimiento y la calidad de la cosecha de maíz, lo que conlleva importantes pérdidas económicas.

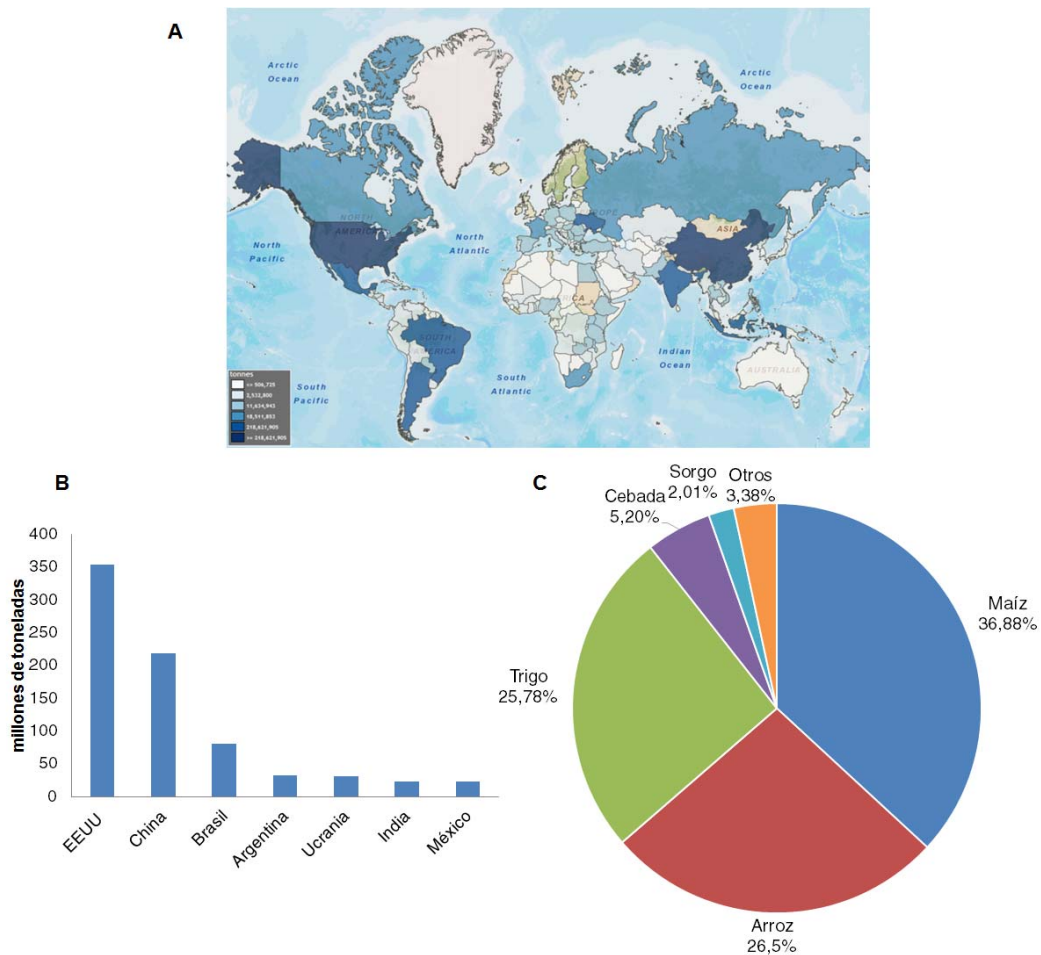


Figura 8. Cultivo de maíz a escala global. A) Mapa de la producción de maíz por países. B) producción anual (año 2014) de maíz de los 7 países con mayor producción. C) Porcentaje de producción anual de los cinco cereales más producidos en el mundo (maíz, arroz, trigo, cebada y sorgo), respecto a la producción de cereales global. Los datos corresponden a 2013, año en que la producción global de cereales fue 2.759 millones de toneladas. [Fuente: adaptado de los datos de la FAO, 2016]

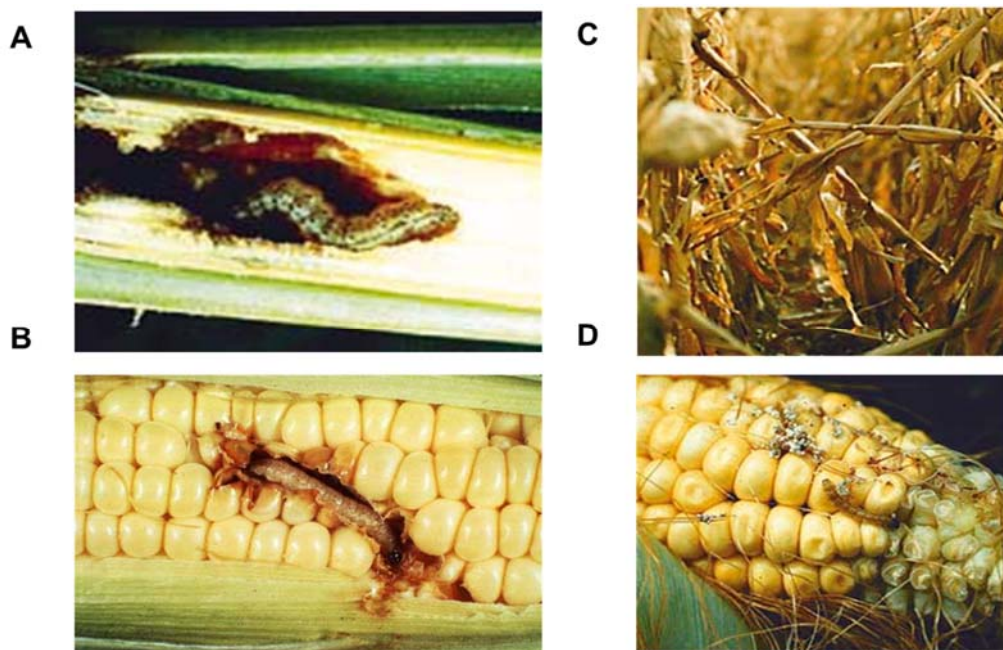


Figura 9. Efectos causados por el taladro de maíz: Galerías excavadas en A) las cañas de maíz y B) en las mazorcas. Como síntomas secundarios de infestaciones severas del taladro puede ocurrir C) Rotura y caída de las cañas de maíz y D) infección de hongos fitopatógenos en las mazorcas. [Fuente: *University of Minnesota*]

El maíz MON810 fue obtenido mediante la transferencia de un gen sintético, codificante de una versión truncada de la δ -endotoxina Cry1A(b) derivada de *B. thuringensis*, mediante transformación biolística del cultivar de maíz Hi-II. La expresión de este transgén está controlada por el promotor constitutivo y modificado 35S CaMV y el intrón Hsp70 de maíz (Figura 10). El método de transformación por biolística está asociado a inserciones truncadas y reorganizaciones genómicas (Latham *et al.* 2006), lo que probablemente tuvo lugar durante el proceso de integración. En el extremo 3' una pequeña parte del gen *cry1A(b)* y el terminador NOS-T, que formaban parte del *cassette* de transformación, no están presentes (Hernández *et al.*, 2003).

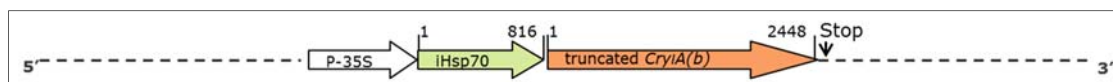


Figura 10. Esquema del inserto del maíz Bt MON810. Se indica el tamaño (en pares de bases, pb) de cada uno de los elementos.

La caracterización molecular del maíz MON810 revela que contiene una única inserción del transgén con el promotor 35S, el intrón del maíz Hsp70 y parte de la secuencia codificante de *cry1A(b)* (EFSA 2009). Los datos obtenidos indican que no existen trazas de otros elementos del vector de transformación en el maíz MON810 y por tanto no hay restos de genes de selección. En 2008 se identificó el lugar de inserción del transgén en MON810: la secuencia de DNA de maíz flanqueante en 5' es homóloga a la secuencia LTR del gen α -zeina de 22kDa (Holck *et al.* 2002); mientras que en región 3' es uno de los intrones (intrón 8) del gen de maíz que codifica una ubiquitin ligasa HECT E3, que se encuentra orientada en sentido inverso al transgén (Rosati *et al.* 2008). La transcripción de *cry1A(b)* sobrepasa el extremo 3' del transgén, y se generan transcritos de diferente longitud, alargándose hasta aproximadamente 1 kpb *downstream* (Rosati *et al.* 2008; La Paz *et al.* 2010; Pla *et al.* 2012). No obstante, la presencia de un codón stop en la posición +7 *downstream* del sitio de truncamiento conduce a la producción de una proteína Cry1A(b) con 363 aminoácidos menos que la original, e incorpora dos aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal.

El maíz MON810 se empezó a cultivar en EEUU en el 1996, seguido rápidamente de Canadá, Argentina y Europa. En Europa este maíz se autorizó bajo la Directiva 90/220/EEC para cultivo, importación, producción de semillas y para fabricación de alimentos y piensos (gmo-compas.org, 2016, cera-gmc.org, 2016). En el año 2007 se sometió para la renovación de la autorización y la EFSA emitió un informe favorable en respuesta a la aplicación de la renovación (EFS Panel on Genetically Modified Organisms, 2009). En este informe, la EFSA, concluyó que el maíz MON810 es tan seguro como su homólogo convencional. La autorización para el cultivo fue finalmente renovada en el 2013. Se trata actualmente del único maíz MG autorizado en UE para el cultivo y producción de semillas. En el año 2014 en Europa se cultivaron 131.538 hectáreas de maíz MON810 (gmo-compass.org, 2016): esta cifra representa menos del 1,5% del total de la superficie dedicada al cultivo de maíz en la UE (aunque a nivel global, el maíz MG representa un 30%). El 90% del maíz MG producido en Europa se cultiva en España, produciéndose el 10% restante en Portugal, Eslovaquia, República Checa y Rumania (gmo-compass.org, 2016).

Desde 1998 el maíz convencional coexiste en España con el maíz MON810, donde representa el 30% de la producción total. Aragón es la comunidad autónoma donde más maíz MG se cultiva, y le siguen Catalunya y Extremadura. En el 2014 (Figura 11) en España disminuyó ligeramente el cultivo del maíz convencional, y también del MG, debido probablemente al bajo precio del cereal y a las condiciones

climáticas (MAGRAMA, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2016). Sin embargo, la proporción de cultivo MG se ha mantenido relativamente estable. En algunas zonas con especial incidencia de taladro, por ejemplo, en l'Empordà, Catalunya, la proporción de campos de maíz MON810 ha llegado a representar más del 70% del total de maíz (Departament d'Agricultura, Ramadaria, Pesca i Alimentació, 2016).

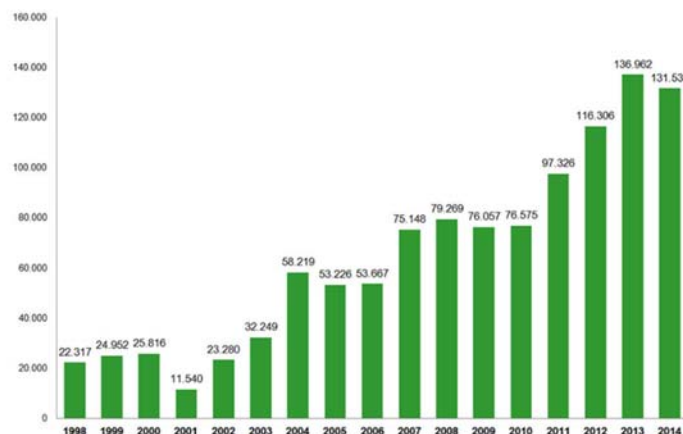


Figura 11. Producción de maíz Bt MON810 en España desde 1998, en hectáreas. [Fuente: Fundación Antama]

El transgén de MON810 fue generado por Monsanto en una línea de maíz con una buena eficiencia de transformación y regeneración, pero sin características agronómicas valiosas (ello es necesario en algunas especies como el maíz). Las empresas semilleras usan la línea transgénica parental de MON810 para introducir el transgén en líneas parentales convencionales con características agronómicas de interés. Mediante programas de retrocruzamientos, se obtienen variedades de maíz híbridas portadoras del transgén en el fondo genético perteneciente a la variedad de interés comercial. De esta manera, las empresas mejoradoras obtienen sus propias variedades transgénicas comerciales, con características agronómicas adaptadas a las diferentes necesidades. Por tanto, la variedad MG comercial portará, además del transgén, una pequeña proporción del genoma de la línea transgénica parental (Figura 12). La línea convencional parental, transformada para obtener MON810, se denomina convencional isogénica y es el mejor comparador respecto a la línea transformada. Sin embargo, las empresas mantienen el proceso de retrocruzamientos como información confidencial, de forma que no es posible acceder a la información respecto a la relación genética exacta entre las variedades. La variedad convencional (no MG) disponible comercialmente más cercana a una cierta variedad MON810 se denomina variedad *near-isogenic*. Las parejas de variedades convencionales y *near-isogenic* comparten la mayor parte del genoma y presentan características agronómicas similares, exceptuando el transgén y una pequeña cantidad (a priori desconocida) del genoma del parental donador del transgén. Esto tiene relevancia en el contexto de evaluación de riesgos de los OMG, ya que se fundamenta en la comparación de la planta MG con la variedad convencional genéticamente más cercana (ver apartado Principio de equivalencia sustancial, en la página 46). En el año 2016, el Registro Nacional de Variedades Comerciales incluye 126 variedades MON810 para cultivo en España (MAGRAMA Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2016).

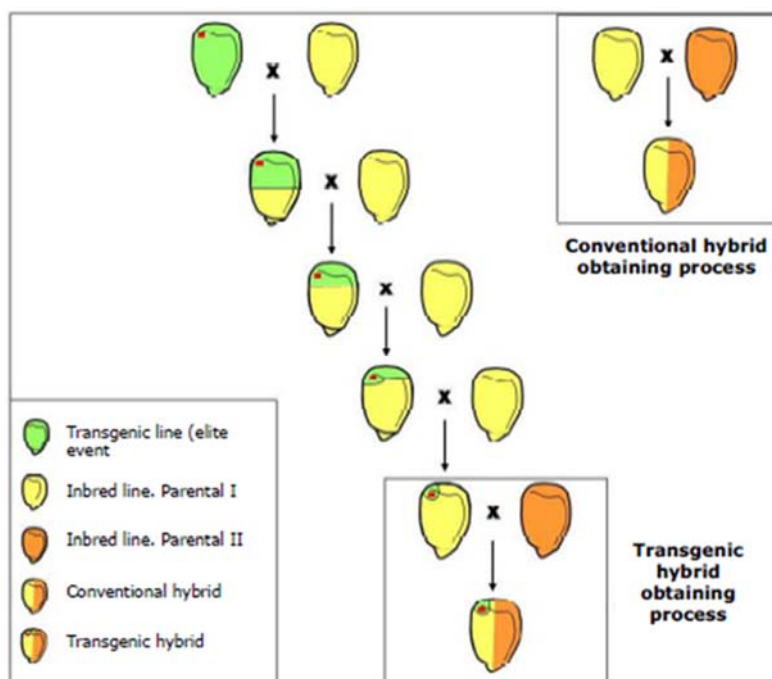


Figura 12. Proceso de obtención de híbridos convencionales y transgénicos [Fuente: Palauelmàs 2009]

4. Marco regulador de los OMG en la Unión Europea

En la Unión Europea impera el principio de precaución por lo que respecta a la legislación de los OMG. Por este motivo se impone una autorización previa al cultivo y comercialización de cualquier evento de transformación que se desee introducir en el mercado europeo. Esto convierte la legislación europea sobre OMG en una de las más estrictas del mundo.

En los primeros reglamentos sobre nuevos alimentos (años 90 del siglo XX) se establecía el procedimiento de equivalencia sustancial para la regulación de los nuevos OMG (ver Principio de equivalencia sustancial, en la página 46). Este procedimiento se basa en que el nuevo producto objeto de la autorización debe ser equivalente a nivel nutricional, organoléptico y de calidad al alimento o producto convencional ya existente. Sin embargo, este concepto no constituye en sí mismo una evaluación de seguridad. En reglamentos posteriores, como el Reglamento N° 1829/2003 sobre alimentos y piensos MG, se instauró un procedimiento para aceptar o denegar las autorizaciones para la comercialización de alimentos y piensos MG; así como para el cultivo de plantas MG destinadas a la producción de alimentos y piensos. En este documento se especifica qué pruebas deben realizarse y qué procedimiento debe seguirse para obtener dichas autorizaciones. En el año 2011 el Comité Científico de la EFSA publicó unos documentos guía para la evaluación de riesgos de alimentos y piensos derivados de plantas MG (EFSA 2011a). También publicó un documento guía para adaptar los protocolos de los estudios de toxicidad oral de 90 días en roedores (*90 day feeding trials*) para la evaluación de las plantas MG (EFSA Scientific Committee, 2011; basado en la guía TG 408 de la OCDE, OCDE, 1998), en la que se incide sobre aspectos de diseño, ejecución, análisis e interpretación de resultados. El reglamento actualmente vigente en la UE para la autorización de OMG (Reglamento N° 503/2013, Parlamento Europeo 2013) detalla las pruebas requeridas para demostrar la seguridad de la planta MG sobre la salud humana y animal, y sobre el medioambiente; indicando como requerimiento la realización de un estudio de alimentación de ratas durante 90 días en todos los casos.

La información que debe incluir una solicitud de autorización para alimentación humana o animal, y/o cultivo de un nuevo evento MG se resume en la Figura 13. La identificación y caracterización de los peligros potenciales se basa en los siguientes conceptos (König *et al.* 2004; Parlamento Europeo 2013):

- Caracterización de las plantas parentales: información fenotípica y agronómica; distribución geográfica; historia de uso; análisis composicional de nutrientes, antinutrientes, toxinas y alérgenos.
- Caracterización molecular del organismo donador: información del proceso de transformación, caracterización del DNA recombinante insertado, determinación del lugar de inserción y número de copias del transgén.
- Caracterización del producto genético (proteína o metabolito recombinante): modo de acción, evaluación de la toxicidad y alergenicidad.
- Caracterización de la nueva planta MG: información fenotípica y agronómica, análisis composicional comparativo (basado en el principio de equivalencia sustancial) y estudios toxicológicos en ratas (ver Evaluación de la seguridad de los cultivos MG, en la página 46).

SOLICITUD AUTORIZACIÓN DE ALIMENTOS Y PIENSOS GENETICAMENTE MODIFICADOS
Reglamento de Ejecución (UE) nº 503/2013

PARTE I. INFORMACIÓN GENERAL

- Designación y especificación de la planta modificada genéticamente y sus productos.
- Objeto de la solicitud (alimento modificado genéticamente; pienso modificado genéticamente o plantas modificadas genéticamente para su utilización en alimentos o piensos)
- Descripción del método de producción y fabricación.
- Condiciones de comercialización del alimento o alimentos o del pienso o piensos modificados genéticamente, incluidas las condiciones específicas de utilización y manipulación.
- Situación del alimento o pienso o de las sustancias relacionadas con arreglo a otras disposiciones d del Derecho de la Unión.

PARTE II. INFORMACIÓN CIENTÍFICA

1. Identificación y caracterización de los factores de peligro
 - Información relativa a las plantas receptoras o (en su caso) parentales
 - Caracterización molecular
 - Análisis comparativo
 - Toxicología (incluye estudios de 90 días en ratas)
 - Alergenicidad
 - Evaluación nutricional
2. Evaluación de la exposición: ingesta prevista o grado de utilización
3. Caracterización del riesgo
4. Seguimiento postcomercialización de los alimentos o piensos modificados genéticamente
5. Evaluación medioambiental
6. Plan de seguimiento medioambiental
7. Información adicional relacionada con la inocuidad de los alimentos o piensos modificados genéticamente

PARTE III. PROTOCOLO DE CARTAGENA

PARTE IV. ETIQUETADO

PARTE V. MÉTODOS DE DETECCIÓN, MUESTREO E IDENTIFICACIÓN Y MATERIAL DE REFERENCIA

PARTE VI. INFORMACIÓN ADICIONAL QUE DEBE FACILITARSE EN RELACIÓN CON LAS PLANTAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE O LOS ALIMENTOS O PIENSOS QUE CONTENGAN O ESTÉN COMPUESTOS POR PLANTAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

Figura 13. Información requerida para la solicitud de Autorización de Alimentos y Piensos Genéticamente Modificados según el Reglamento (UE) nº 503/2013.

5. Aspectos críticos de la regulación de los OMG

Proceso de autorización

De acuerdo con la legislación de la UE un OMG sólo puede introducirse en el mercado o cultivarse en la UE si cumple todos los requisitos de seguridad establecidos en la reglamentación. De acuerdo con el principio de precaución, dicha evaluación se establece caso a caso. Las solicitudes deben presentarse a la autoridad competente de un Estado Miembro (por ejemplo, en el Estado Español a la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, AECOSAN). La EFSA, en colaboración con las respectivas agencias competentes de los EEMM, realiza la evaluación científica del peligro para la salud humana y animal, y el medio ambiente. El informe de evaluación es de libre acceso y se abre una consulta pública durante un período de un mes. Una vez finalizada, la evaluación del riesgo sirve como base a partir de la cual la Comisión propone una decisión a los EEMM por la que se acepta o se rechaza la autorización de comercialización de un OMG.

En un plazo de tres meses a partir de la recepción del dictamen emitido por la EFSA, la Comisión elabora un proyecto de decisión para la concesión o la denegación de la autorización. La Comisión puede disentir de la recomendación científica de la EFSA, pero, justificando su posición. El proyecto de decisión de la Comisión presentado a los EEMM se somete a votación por mayoría cualificada; en caso de no llegar a una decisión por mayoría, la Comisión tomaría la decisión final (European Commission 2016, ec.europa.eu/index_en.htm) (Figura 14). El proceso de evaluación y autorización por la EFSA, EEMM y CE suele durar entre uno y dos años, aunque se puede alargar mucho más tiempo. Las autorizaciones son válidas por un período de tiempo de 10 años, renovables. Consecuentemente, el proceso de aprobación de una planta MG es más costoso a nivel de tiempo y dinero, que el de las plantas convencionales

Recientemente se ha aprobado una nueva directiva que da más flexibilidad a los EEMM para restringir o el cultivo de OMG en su territorio, llamada “Cláusula de salvaguardia” (Parlamento Europeo 2015). Esta nueva directiva se ve reflejada en la Decisión de Ejecución (Comisión Europea 2016) aprobada el marzo de 2016 que ha tenido como consecuencia la prohibición oficial del cultivo de MON810 en 21 países de la UE (ec.europa.eu/index_en.htm, 2016) sin tener que justificar argumentos de riesgo para la salud humana, animal o ambiental de los cultivo MG.

Etiquetado y trazabilidad

En el Reglamento (CE) Nº 1831/2003 se establecen las instrucciones para el etiquetado y trazabilidad de los OMG. En esta regulación se incluye todo pienso o alimento que se componga, contenga o se haya producido a partir de un OMG (contenga o no, DNA y/o proteínas que resulten de la modificación genética). Los OMG que han sido aprobados se consideran sanos y, por tanto, el etiquetado fue introducido para asegurar el derecho a la información y dar libertad de elección a los consumidores de la UE (esto es, permitiendo la elección entre la agricultura convencional, transgénica u orgánica). Frecuentemente los consumidores consideran el etiquetado como una señal de los peligros para la salud de los OMG. Sin embargo, esta concepción es errónea ya que se trata, únicamente, de una cuestión comercial.

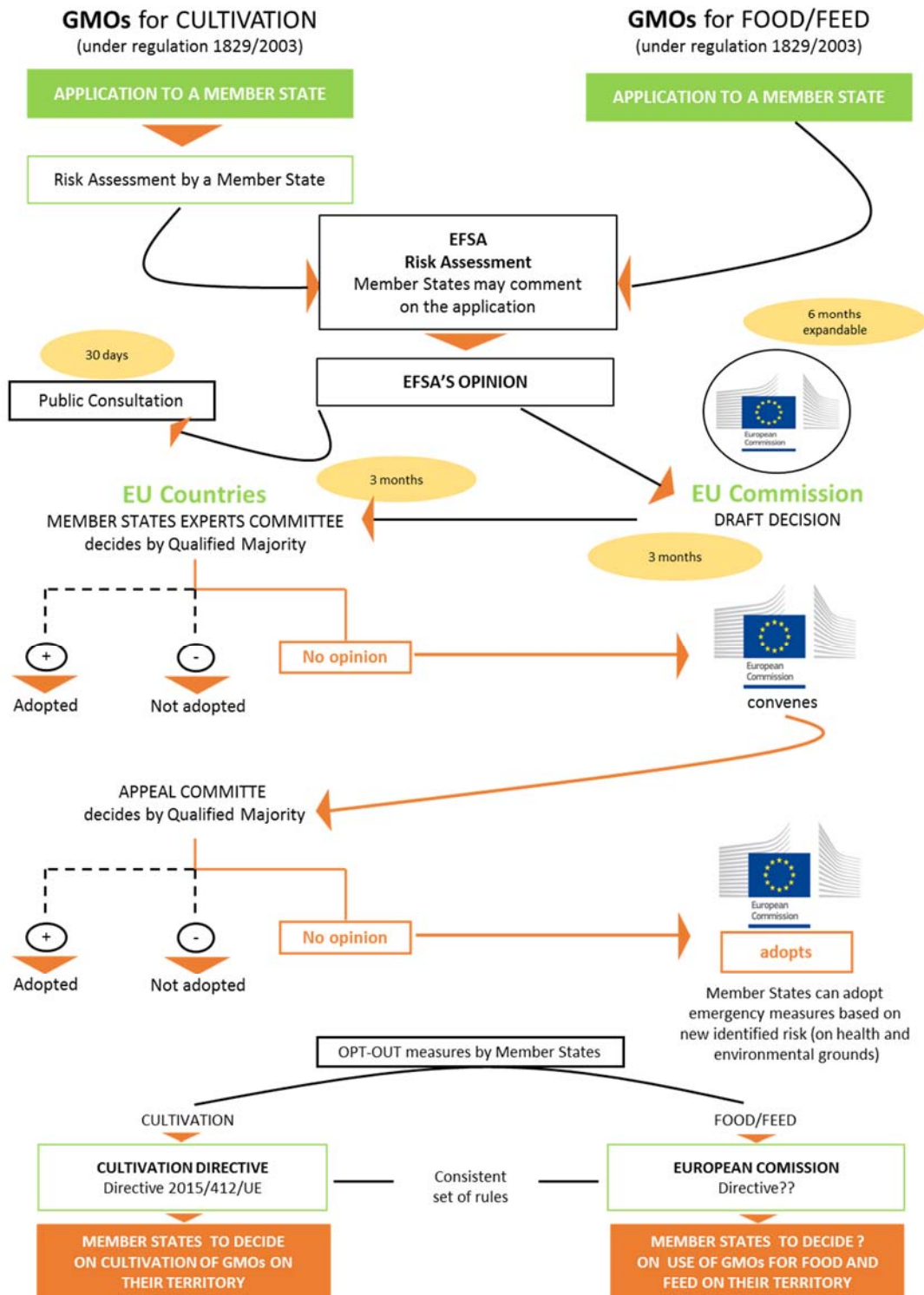


Figura 14. Proceso de autorización de los OMG. [Fuente: adaptado de Comisión Europea, 2016]

Durante los procesos de producción, transporte, y procesado se puede dar accidentalmente una mezcla de cultivos de diferentes orígenes. Por esto, los requisitos de etiquetado establecen un límite para la presencia accidental de los OMG que pretende ser un equilibrio entre las “peticiones” de los productores y las “exigencias” de los consumidores. Se establece pues, un límite de 0,9% de presencia de OMG autorizados para el etiquetado obligatorio.

La trazabilidad se define como “la capacidad de seguir los OMG y los productos producidos a partir de los mismos a lo largo de las cadenas de producción y distribución en todas las fases de su comercialización”. Los objetivos generales de la trazabilidad son facilitar el etiquetado de los OMG, controlar los posibles efectos sobre el medioambiente y la salud y retirar del mercado el producto si se detectan evidencias de riesgo.

Como ya se ha comentado la cantidad de cultivos y productos MG está aumentando rápidamente, como consecuencia del interés de las empresas biotecnológicas de seguir innovando y desarrollando nuevas tecnologías de obtención de plantas. El término *Low Level Presence* (LLP) se ha adoptado para describir la presencia accidental de pequeñas cantidades de eventos biotecnológicos que han sido autorizados en uno o más países, pero no en otros debido a la asincronía de las aprobaciones (Kalaitzandonakes, 2011). La UE, por ejemplo, importa grandes cantidades de productos MG de otros países donde el cultivo de OMG está muy extendido. Para evitar la presencia de trazas de OMG en las importaciones de piensos MG que no se han autorizado en la UE se han establecido los métodos de muestreo y análisis para controlar los eventos no autorizados o desconocidos (Parlamento Europeo 2011).

Métodos de detección

Para cumplir con los requisitos normativos de etiquetado y trazabilidad, existe la necesidad de desarrollar métodos fiables de muestreo, detección e identificación de OMG en las materias primas y en los productos procesados. Los métodos para la detección de OMG en la UE deben ser validados por el JRC (*Joint Research Center*) que se constituyó en el 2003 y está avalado por la ENGL (*European Network of GMO Laboratories*) (Reglamento N° 120/2014, Parlamento Europeo 2014).

Los métodos basados en la detección de DNA en los alimentos MG son los más eficientes ya que el DNA es la molécula más estable durante el procesado de los alimentos. Los métodos de referencia más frecuentemente usados se basan en la PCR (y PCR cuantitativa a tiempo real o qPCR) usando diferentes *primers* específicos para las regiones promotoras y terminadoras, las regiones codificantes de los transgenes insertados, o las regiones flanqueantes de inserción del transgén en el genoma huésped de la planta (Broeders *et al.* 2014; Milavec *et al.* 2014; Datukishvili *et al.* 2015; JRC, 2016). El procedimiento tradicional incluye la detección cualitativa (*screening*), identificación del/de los evento/s contenidos en la muestra y su cuantificación posterior. La detección cualitativa es el paso crítico para la detección de los OMG ya que solo las muestras positivas son sujetas a una identificación y cuantificación.

En el 2016 se han autorizado 388 eventos de transformación en 27 especies de plantas para cultivo y comercialización (ISAAA's GM Approval Database, 2016) y parece que el número de OMG autorizados continuará aumentando. Debido al gran número de variedades MG en el mercado el *screening* es un paso caro y largo. Por esto han surgido los métodos de PCR multiplex ya que es una aproximación prometedora a la hora de discriminar un gran número de eventos transgénicos en una sola reacción (Nadal *et al.* 2006; Leimanis *et al.* 2008; Pla *et al.* 2008; Datukishvili *et al.* 2015). Aunque se han realizado muchos avances en este sentido, el análisis de los OMG todavía supone un reto. En un informe de la CE del 2013 se enfatizaba de la dificultad de detectar los eventos transgénicos no autorizados o desconocidos (Parlamento Europeo 2013; Kok *et al.* 2014). Se han creado bases de datos de métodos de detección de los

transgénicos basados en la PCR, por ejemplo, la desarrollada por el mencionado JRC (gm-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods/), que facilitan la identificación de diferentes OMG internacionalmente. Recientemente, se ha empezado a percibir el potencial de la secuenciación masiva como herramienta para la detección de OMG que permitiría además la identificación de eventos desconocidos o no autorizados (La Paz *et al.* 2014; Liang *et al.* 2014; Pauwels *et al.* 2015; Willems *et al.* 2016).

Coexistencia

El aumento progresivo del área destinada a cultivos biotecnológicos (Figura 2) ha comportado la aparición de situaciones de coexistencia. El concepto de coexistencia se define como “el principio por el que los agricultores pueden elegir libremente los cultivos que siembran, tanto si se trata de agricultura transgénica, convencional u orgánica”. A día de hoy no existen medidas regulatorias de coexistencia en la UE, pero la Comisión publicó un informe con recomendaciones sobre coexistencia (Comisión Europea, 2009, 2010) y por ahora la competencia de desarrollar una legislación en esta materia recae en cada uno de los EEMM. Muchos países de la UE ya han adoptado medidas específicas sobre coexistencia, algunas de las cuales solo aplican a nivel local. La coexistencia trata sobre las consecuencias económicas de la presencia adventicia de material de un sistema de agricultura sobre otro, sean MG, convencionales u orgánicos; y no de aspectos sobre la seguridad de los OMG ya que esta cuestión está cubierta por la legislación (Parlamento Europeo y Consejo Europeo, 1991).

En el proyecto europeo PRICE (*Practical Implementation of Coexistence in Europe*), que transcurrió entre 2012 y 2015, se han estudiado varios métodos para garantizar la coexistencia entre el maíz MG y el convencional. Una de las regiones de estudio fue el Baix Empordà, donde se comprobó experimentalmente que el seguimiento de las recomendaciones de la Asociación Nacional de Obtentores Vegetales (Anove 2015) por parte de los agricultores, resultaba en producciones de maíz convencional con niveles adventicios de OMG por debajo de 0,9%, incluso en campos con fuerte presión de polen MG (Nadal *et al.* 2016). Estas prácticas evitan o reducen la polinización cruzada evitando superar el umbral del 0,9% de presencia de maíz MG en campos convencionales.

En estos ensayos se ha demostrado la eficacia de las medidas de contención físicas, como son separación entre campos (entre 25 m y 600 m), el uso de zonas de refugio (tampón) y la separación de las fechas de siembra, para inducir un desfase en la floración (Messeguer *et al.* 2006; Palaudelmàs *et al.* 2009; Palaudelmàs *et al.* 2012; Melé *et al.* 2015). Estas estrategias se han seguido en otras zonas con características especiales como una región insular como Mallorca, llegando a resultados similares (Vives *et al.*, 2016 artículo aún no publicado). Por otra parte, ensayos de campo llevados a cabo en Alemania, la República Checa y Catalunya con maíz androestéril (no productor de polen), han mostrado que esto podría ser también una estrategia de contención biológica eficaz para asegurar la coexistencia (Weingartner *et al.* 2004; Bückmann *et al.* 2016). El proyecto concluyó que, con estas medidas se evitaría la presencia accidental de maíz MG en campos convencionales, debida a la polinización cruzada.

A raíz de la necesidad de controlar los niveles de contaminación de OMG en campos de cultivo, se ha creado GIMI. Se trata de una aplicación muy rápida y sencilla para estimar el porcentaje de OMG en un campo convencional en función de los campos MG vecinos, datos de siembra y dirección del viento (Melé

et al. 2014). Desafortunadamente, en muchos casos, existe una falta de armonización entre los resultados científicos y las medidas de segregación adoptadas por los diferentes EEMM (Commission of European Communities 2003; Ramessar *et al.* 2010; Melé *et al.* 2014).

6. Evaluación de la seguridad de los cultivos MG

Como ya se ha mencionado, los cultivos MG y los alimentos y piensos derivados están regulados bajo varias legislaciones que cubren diferentes aspectos de seguridad y protección para el consumidor. La aproximación seguida en la evaluación de los riesgos de los cultivos y alimentos derivados de OMG fue establecida colaborativamente entre la OECD (OECD 1993) y la FAO (World Health Organization 2000). En estos documentos se establecía como punto de partida el procedimiento de equivalencia sustancial (FAO/WHO 1996) que fue aplicado por primera vez en el ámbito clínico (*Food and Drug Administration* de EEUU). Las agencias de seguridad alimentaria de muchos países adoptaron este principio para la evaluación de riesgos de los OMG. Este procedimiento se basa en el principio de que el nuevo producto objeto de la autorización debe ser composicionalmente equivalente al alimento o producto comparador convencional.

Principio de equivalencia sustancial

El principio de equivalencia sustancial es una aproximación comparativa que asume la seguridad de los cultivos convencionales basándose en su consumo tradicional seguro; y consecuentemente, éstos se toman como control para evaluar los cultivos MG. Los primeros informes sobre seguridad alimentaria establecieron el principio de equivalencia sustancial para la seguridad alimentaria (OECD 1993; FAO/WHO 1996), que actualmente se asume como punto inicial en el análisis comparativo de cultivos biotecnológicos (Kok y Kuiper, 2003). Dicho análisis comparativo incluye la composición (nutrientes, antinutrientes, alérgenos y toxinas naturales mayoritarias) y las características fenotípicas y agronómicas.

Se han definido algunos aspectos clave para la aplicación óptima de este principio en el análisis de riesgos de las PMG (Kok y Kuiper 2003; Cellini *et al.* 2004; König *et al.* 2004; Kok *et al.* 2008):

i. Selección de los compuestos

La comparación composicional entre un cultivo MG y su comparador convencional se realiza mediante análisis dirigidos (*targeted analysis* en inglés) en una selección de compuestos determinados. Se trata de compuestos esenciales como proteínas, grasas y azúcares, así como toxinas naturales, nutrientes esenciales (minerales y vitaminas) y antinutrientes. La OECD ha publicado unos documentos describiendo los elementos que deben analizarse en soja, colza, patata, remolacha azucarera, maíz, trigo, arroz, algodón, girasol, tomate y otros cultivos (www.oecd.org/biotrack). Además, en función del conocimiento previo del evento MG a analizar, se requieren análisis adicionales que se establecen caso a caso.

ii. Comparador

El mejor comparador de una variedad MG es su línea parental convencional no MG, o sea la línea isogénica (“segregante nulo”) que tiene el mismo fondo genético, pero con ausencia del transgén. Sin embargo, para

muchos cultivos comerciales la línea isogénica no está disponible y el comparador más próximo disponible es una variedad *near-isogenic* (Figura 12). La variedad *near-isogenic* y la MG pueden presentar diferencias a nivel genético no relacionadas con la modificación genética. Ello es especialmente importante en especies como el maíz, en el que se suele transformar una línea no comercial y el transgén se incorpora por retrocruzamiento a una de las líneas parentales del híbrido comercial.

- iii. Discriminación de los efectos de la modificación genética, respecto a la variabilidad natural de la especie, incluidas diferentes condiciones ambientales.

En la comparación de las variedades MG se incluyen otras líneas convencionales comerciales para determinar el rango de variabilidad natural de los compuestos analizados en la especie. Además, para limitar la interpretación errónea de las diferencias causadas por las condiciones ambientales, se recomienda la comparación de parejas MG y no MG bajo diferentes condiciones climatológicas (Kok y Kuiper, 2003).

El análisis dirigido de compuestos determinados como nutrientes o tóxicos ha sido ampliamente aceptado por organismos internacionales como parte del concepto de equivalencia sustancial y ha sido aplicado en los cultivos MG (Cellini *et al.* 2004). Por este motivo, las plantas modificadas genéticamente pertenecen a los alimentos más analizados que conocemos. Por otra parte, este tipo de aproximación ha sido criticada ya que se basa en la elección de compuestos conocidos (Millstone, Brunner y Mayer, 1999) y tiene limitaciones a la hora de detectar posibles efectos no intencionados y no esperados (en función del conocimiento científico en el momento del análisis). Tal como sucede con muchos conceptos científicos, el concepto de equivalencia sustancial debe evolucionar y revisarse.

Los cultivos MG de segunda y tercera generación incluyen propiedades nutricionales mejoradas y con efectos metabólicos importantes. La modificación de rutas biosintéticas en plantas puede resultar en alteraciones no explicables en base al conocimiento actual sobre el metabolismo de plantas. Puede suceder que se den efectos no intencionados impredecibles o niveles alterados de metabolitos no detectados por el análisis dirigido (Cellini *et al.* 2004). Las nuevas tecnologías de caracterización masiva (discutidas en el apartado “Ómicas: tecnologías de caracterización molecular masiva”, en la página 53) tienen la capacidad de aumentar drásticamente el número de analitos analizados y prometen ser un gran complemento para el estudio de la seguridad de los cultivos MG (Ricroch 2013).

Efectos no intencionados

Los efectos no intencionados se definieron por Cellini y colaboradores (Cellini *et al.* 2004) como las diferencias estadísticamente significativas entre una planta MG y su respectivo comparador, independientemente del transgén insertado. Estos pueden ser predecibles (si los efectos son los esperados y explicables en términos del conocimiento existente sobre fisiología y metabolismo de plantas) o no predecibles (que son cambios que se alejan del nivel actual de conocimiento).

El análisis de los efectos no intencionados derivados de los cultivos biotecnológicos ha ganado importancia en los últimos años. Como ya se ha comentado, la transformación genética mediada por *Agrobacterium* o bombardeo de micropartículas puede provocar cambios en el genoma no deseados e impredecibles *a priori*. La integración del transgén en el genoma de la planta es un proceso aleatorio que suele darse en las regiones ricas en genes (Koncz, Németh, Rédei y Schell, 1992), por tanto la interrupción, modificación o silenciamiento genético de genes activos y la producción de nuevos productos proteicos puede tener lugar (efectos posicionales del transgén). Además, los efectos pleiotrópicos pueden aparecer como resultado de la interacción del transgén con elementos regulatorios de otros genes o la actividad de otras proteínas (Miki *et al.* 2009). La transferencia horizontal de genes ha sido también considerada como un posible efecto no intencionado aunque es muy infrecuente (EFSA 2009). Sin embargo, durante el desarrollo de una nueva variedad de planta transgénica, se testan todos los clones para seleccionar solo aquellos con las características comerciales deseadas. Así, se descartan muchas líneas transformantes en los pasos de aclimatación en invernadero o en campo. Esto resulta en la eliminación de los mayores efectos no intencionados derivados del proceso de transformación relacionados con las características agronómicas (Cellini *et al.* 2004). Los efectos no esperados detectados deberán evaluarse específicamente en cuanto a su posible riesgo medioambiental, seguridad nutricional y riesgo toxicológico.

Estudios de toxicidad animal

Como ya se ha comentado anteriormente, la determinación del riesgo de cualquier alimento o pienso MG se basa en la caracterización molecular, análisis comparativo agronómico, fenotípico y composicional, así como en estudios de toxicidad en animales. La finalidad de los estudios toxicológicos es identificar cualquier efecto adverso en los animales de laboratorio cuando éstos reciben repetida y diariamente el OMG, y determinar el riesgo que existe de sufrir patologías que pueden causar efectos neurotóxicos o inmunológicos. Desde el año 2013 se exigen estudios de toxicidad aguda en roedores para cualquier planta MG que quiera usarse como alimento o pienso entero MG. Los estudios de toxicidad oral (mediante alimentación) a 90 días en roedores se basan en los ensayos elaborados por la OECD (OECD 1998) para la evaluación de sustancias químicas. En casos específicos, y cuando la evaluación de los resultados toxicológicos generales lo requiera, se realizarán estudios crónicos o carcinogénicos adicionales (OECD 2009a; OECD 2009b; OECD 2009c). Los estudios propuestos por la OECD se usan para testar sustancias químicas en alimentos. Por tanto, se han elaborado adaptaciones de estos protocolos para la evaluación de alimentos/piensos enteros MG.

Los parámetros a determinar a lo largo de los estudios de toxicidad animal son (OECD 1998): el peso corporal, el consumo de agua y alimentos y exámenes oftalmológicos periódicos. Al final de los estudios de toxicidad deben realizarse las siguientes mediciones (OECD 1998):

- Hematología y bioquímica clínica. Los análisis bioquímicos sirven para investigar efectos tóxicos en órganos vitales, como el riñón y el hígado.
- Análisis urinarios opcionales durante la última semana del estudio
- Necropsia
- Peso final corporal y de todos los órganos vitales
- Histopatología. La histopatología se realiza en todos los órganos de todos los animales de los grupos control y de dosis mayor. Se procede a la examinación de los grupos intermedios sólo en caso de observar cambios en los animales que han recibido la dieta con mayor contenido en OMG.

A continuación, se definen algunos conceptos para llevar a cabo los estudios de toxicidad animal en alimentos o piensos MG.

I. Definición de alimento o pienso entero MG

Un alimento o pienso entero es un producto que se consumirá por humanos o animales, que está compuesto de muchas sustancias individuales. Los alimentos/piensos MG normalmente están formulados a base de maíz, soja, colza y algodón transgénicos; y otros productos más refinados como harinas o aceites.

II. Toxicidad aguda

La toxicidad aguda, por administración continuada, incluye estudiar los efectos adversos que aparecen en los animales de laboratorio cuando están expuestos diariamente a la misma durante un período de tiempo breve, en comparación con sus expectativas de vida (en ratas se considera 90 días). Estos ensayos deben contribuir a identificar los órganos diana de la toxicidad, así como las dosis tóxicas y no tóxicas. Puede ser necesario realizar investigaciones complementarias en profundidad mediante estudios a largo plazo (toxicidad crónica).

III. Toxicidad crónica

Los productos carcinógenos pueden clasificarse como genotóxicos o no genotóxicos, según el supuesto mecanismo de acción. La prueba de toxicidad por administración continuada durante más tiempo incluye la evaluación de los cambios histopatológicos observados como, por ejemplo, la hiperplasia en ciertos tejidos diana. Estos estudios, junto a la información sobre toxicocinética, pueden ayudar a detectar los alimentos o piensos MG que presenten potencial carcinogénico, y se pueden requerir más estudios en profundidad, en un ensayo de carcinogénesis.

IV. Dosis, grupos control y datos históricos control

Se recomienda utilizar dos niveles de dosis (alto y bajo) en los ensayos de alimentos/piensos MG más el grupo control ya que los posibles efectos deben ser dependientes de la dosis. La dosis más alta corresponderá al nivel máximo del alimento/pienso entero que puede incorporarse en la dieta del roedor sin provocar desequilibrios nutricionales. El nivel bajo será entre un cuarto y un medio de la dosis alta. Los comparadores usados como control serán las líneas isogénicas (o *near-isogenic*). Así, por ejemplo, para maíz se considera que la cantidad máxima en la dieta se sitúa en torno al 33% de la misma (aunque en algún ensayo se ha aumentado a l 50%). De esta forma se pueden ensayar tres dietas con diferentes dosis: 33% de maíz MG, 11% de maíz MG más 22% de maíz *near-isogenic*, y 0% de maíz MG más 33% de maíz *near-isogenic*.

Normalmente, se usan ratas de laboratorio, *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769, en lugar de ratones, ya que tienen un mayor uso tradicional en los estudios de toxicidad. Es la especie modelo más empleada en investigación biomédica, y, por tanto, existe un gran volumen de información sobre ella. Los estudios deben realizarse en los dos sexos por separado; disponiendo una pareja de animales del mismo sexo en cada jaula. Los resultados y su interpretación se presentarán en función del sexo y de la dosis. El número total de ratas a ensayar por dieta depende de la duración del ensayo, situándose en torno a los 12 individuos por sexo y tratamiento en los ensayos de 90 días.

Se debe recopilar información de datos históricos de los animales de la misma edad, sexo y cepa obtenidos en el mismo laboratorio durante los últimos cinco años. Estos datos informaran sobre la variabilidad de los valores de los parámetros a estudiar. En caso de que el laboratorio no disponga de esta información, el diseño experimental de los estudios de alimentación deberá incluir grupos control de referencia.

V. Autopsia general

Se deberá practicar una autopsia general completa a todos los animales del ensayo. Al menos el hígado, los riñones, las glándulas suprarrenales, los pulmones y los testículos se deben pesar húmedos, lo más rápidamente posible después de la disección para evitar que se sequen. Los órganos y tejidos deben conservarse en un medio apropiado para que puedan realizarse exámenes histopatológicos posteriores en las vías respiratorias, el hígado, los riñones, el bazo, los testículos, las glándulas suprarrenales y el corazón, así como todos los órganos que presenten lesiones macroscópicas o modificaciones volumétricas. Los pulmones deben extraerse enteros, pesarse y tratarse con un fijador adecuado para conservar la estructura pulmonar.

VI. Examen histopatológico

Se practica un examen histopatológico de los órganos y tejidos conservados expuestos a la dosis más alta y control. Los órganos y los tejidos que presenten lesiones atribuibles a la PMG deben ser examinados en todos los grupos de las dosis bajas.

VII. Órganos diana

Después de finalizar los ensayos de toxicidad se realizarán observaciones histopatológicas sobre los órganos vitales. También se ha propuesto realizar estudios moleculares profundos (ómicas) sobre éstos para detectar cambios a nivel de expresión de genes, proteínas o metabolitos que indiquen un efecto nocivo. Para evaluar los efectos provocados por la alimentación de los OMG se consideran de importancia, por ejemplo, los órganos digestivos como el intestino e hígado y órganos inmunes como el bazo.

a. Intestino

Después del estómago se encuentra el intestino delgado que continúa con el intestino grueso. El intestino delgado es un conducto largo que se divide en tres zonas: una próxima o **duodeno**, una media o **yeyuno** y otra final denominada **íleon**. La mayor parte de la digestión ocurre en el intestino delgado. Cuando el quimo (porciones de comida parcialmente degradadas liberadas desde el estómago) llega a la región del duodeno, entra en contacto con las secreciones enzimáticas pancreáticas y sales biliares, las cuales degradan aún más los alimentos. Además, en la superficie de las células del epitelio del intestino delgado también hay enzimas que ayudan en la digestión (mmegias.webs.uvigo.es, 2016). El intestino es también la parte del digestivo donde se produce una mayor absorción de los productos de la digestión, como los aminoácidos, azúcares y grasas. Además, se reabsorbe agua y electrolitos. Al igual que el resto del tubo digestivo el intestino está formado por una mucosa, submucosa, muscular y una adventicia (Netter 2012).

b. Hígado

El hígado es la víscera más grande del cuerpo y está recubierto por tejido conectivo fibroso que forma tabiques que lo dividen en lóbulos y lobulillos. Los hepatocitos son las células que forman la mayor parte del hígado (representan aproximadamente el 75% del peso del hígado) y son los que realizan principalmente las funciones hepáticas (Netter 2012).

La organización celular del hígado se basa en la repetición de una estructura básica denominada lobulillo hepático, con forma de hexágono. En los vértices del hexágono se encuentran las tríadas portales, compuestas por una rama de la vena porta, una rama de la arteria hepática y un conductillo biliar. La vena porta hepática trae el 70-75% del flujo sanguíneo y contiene sangre poco oxigenada y rica en nutrientes proveniente del sistema digestivo y del bazo, mientras que la arteria hepática contiene sangre oxigenada. Los conductos biliares recogerán el contenido exocrino de los hepatocitos que se denomina bilis (mmegias.webs.uvigo.es, 2016).

Los hepatocitos son los responsables de la secreción endocrina de una gran cantidad de proteínas plasmáticas como albúmina, lipoproteína (transportan colesterol), glucoproteínas como la transferrina, protrombina y fibrinógenos (responsables de la coagulación sanguínea). También almacenan y modifican vitaminas tales como la A, D o K, y hormonas como hormona del crecimiento. La insulina y el glucagón son hormonas degradadas principalmente en el hígado. Los hepatocitos también son centros de detoxificación participando en el catabolismo de toxinas y moléculas externas al organismo (como la mayoría de fármacos). Son importantes en el metabolismo de carbohidratos (gluconeogénesis, glucogenolisis y glucogenogénesis) y lípidos (síntesis de triglicéridos y colesterol). Además, sintetizan, a

partir de amonio, la mayor cantidad de la urea que se produce en el organismo, y que posteriormente será excretada en los riñones. En el hígado también se elimina por fagocitosis un 20% de los glóbulos rojos envejecidos (el 80% restante se elimina en el bazo) por medio de macrófagos denominados células de Kupffer (Netter 2012).

La bilis, producida por los hepatocitos, es recogida en los conductos que salen de los lóbulos hepáticos y convergen en el conducto hepático común, el cual está conectado a la vesícula biliar, que almacena la bilis. La bilis es una solución acuosa que contiene productos de desecho, y también componentes que ayudan a la digestión como sales biliares – que ayudan a la digestión de grasas - proteínas, colesterol y hormonas (Netter 2012).

c. Bazo

El bazo es el órgano linfático de mayor tamaño y realiza funciones inmunes y hematopoyéticas y como consecuencia está fuertemente irrigado. Posee una gran cantidad de linfocitos, macrófagos y células reticulares, las cuales crean una malla y conductos vasculares. Este tejido contiene unas células especiales denominadas miofibroblastos, los cuales son contráctiles. El bazo es capaz de almacenar grandes cantidades de eritrocitos que son liberados por las contracciones de estos miofibroblastos (mmegias.webs.uvigo.es, 2016). La zona interna del bazo que no es conectivo se denomina parénquima o pulpa, de dos tipos, la blanca y la roja. La primera está formada por una gran cantidad de linfocitos que se disponen alrededor de una arteria denominada central, formando lo que se denomina vaina linfática periarterial. La pulpa roja contiene una gran cantidad de eritrocitos y senos venosos (Netter 2012).

En muchos casos (Tabla 2) se ha determinado que la planta MG no muestra ningún cambio significativo respecto a su comparador en cuanto el análisis composicional ni tampoco existen indicios de presentarse efectos no intencionados. Aunque sea este el caso, donde no existe una hipótesis específica a testar, los estudios de toxicidad son obligatorios y para ello se necesitan criterios estandarizados de calidad para interpretar los resultados de estos estudios (Schmidt *et al.*, artículo no publicado). En los últimos años los estudios en animales con alimentos y piensos MG ha sido un tema controvertido para la evaluación de la seguridad de las plantas MG y de los productos derivados. Dentro de la comunidad científica y otros colectivos existen diferentes posiciones al respecto sobre cómo deben ser realizados, analizados e interpretados estos estudios; y sobre la información relevante que aportan y si estos deben ser obligatorios en todos los casos (EFSA 2012a; Arjó *et al.* 2013; Kuiper *et al.* 2013; Séralini *et al.* 2013, www.grace-fp7.eu). A pesar de que el Reglamento de Ejecución (EU) N° 503/2013 exige como obligatorios estudios de alimentación a 90 días en roedores, la controversia aún continua. Además, algunos estudios, controvertidos en la comunidad científica, proponen la necesidad de extender los estudios animales a uno o dos años e incluso a diversas generaciones. En el contexto del debate sobre la evaluación de los OMG, es importante también tener en cuenta aspectos como la ética asociada a los estudios de toxicidad puesto que se utiliza un gran número de animales en cada ensayo. Es por esta razón que la Comisión Europea se plantea revisar estos aspectos financiando varios proyectos como GRACE y G-TwYST con el compromiso de reconsiderar estos aspectos en base a la información científica y cumplir con los objetivos de substituir, reducir y reemplazar la experimentación con animales.

7. Metodologías alternativas de evaluación de las plantas transgénicas

Los análisis composicionales dirigidos a la evaluación de riesgos de los OMG implican la selección de un número limitado de analitos. Por esta razón, los efectos no intencionados, y especialmente, los efectos no esperados podrían no ser detectados. Actualmente existen tecnologías de análisis masivo de compuestos, llamadas ómicas, que tienen el potencial de mejorar sustancialmente la evaluación de la seguridad alimentaria de los cultivos MG (Ricroch 2013). La caracterización molecular masiva podría facilitar un análisis comparativo más completo y holístico, y detectar posibles cambios a nivel molecular. Además, esta aproximación podría revelar información sobre las rutas y mecanismos involucrados en los posibles efectos no intencionados.

Ómicas: tecnologías de caracterización molecular masiva

Desde la publicación de las primeras secuencias completas de genomas, la biología cuantitativa ha sido un éxito y han aparecido proyectos de secuenciación de los genomas a gran escala. Esto marcó el nacimiento de la “era genómica” y desde entonces el sufijo “-ómicas” se ha añadido a muchos campos de la biología para referirse al estudio masivo de éstas.

Las ómicas han revolucionado la cantidad de mediciones simultáneas que se pueden realizar, permitiendo tener una visión general de los procesos biológicos y su regulación a nivel de célula o tejido. Los distintos métodos de caracterización masiva permiten investigar estos procesos biológicos a distintos niveles y de una forma integrada: desde la expresión génica (transcriptómica), las proteínas (proteómica) hasta los metabolitos (metabolómica). También existen ómicas en otros tipos moleculares como la epigenómica, lipidómica, metalómica, etc.

El número de trabajos basados en las ómicas para estudiar patologías relacionadas con toxicidad o cáncer en animales y humanos ha aumentado en los últimos años. También se ha empezado a considerar su potencial en el análisis de riesgos relacionados con el consumo de dieta derivada de OMG (EFSA 2008; Van Eenennaam 2013; Schiemann *et al.* 2014). Así mismo lo han hecho las publicaciones basadas en la transcriptómica, proteómica y/o metabolómica para evaluar la equivalencia sustancial de plantas transgénicas, así como para detectar cambios no intencionados derivados de la modificación genética. En este contexto, estas nuevas metodologías se han propuesto como metodologías complementarias al análisis de riesgos de las PMG en diversos artículos (Cellini *et al.* 2004; Kok *et al.* 2008; Ricroch 2013) y proyectos europeos (GMO CARE, SAFEFOOD). En numerosas publicaciones recientes se ha demostrado la utilidad de las tecnologías de caracterización masiva para evaluar posibles efectos no intencionados en plantas MG (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de algunos trabajos publicados sobre la evaluación de riesgos de PMG mediante tecnologías ómicas.

Ómicas	Planta MG	Referencia
Transcriptómica	Maíz	La Paz <i>et al.</i> 2014
Transcriptómica, metabolómica	Maíz	Zeng <i>et al.</i> 2014
Transcriptómica	Maíz, Patata	van Dijk <i>et al.</i> 2014
Proteómica	Maíz	Pechanova <i>et al.</i> 2013
Proteómica	Arroz	Wang <i>et al.</i> 2012
Transcriptómica	Maíz	Coll <i>et al.</i> 2010
Transcriptómica, Proteómica, Metabolómica	Maíz	Barros <i>et al.</i> 2010
Transcriptómica	Maíz	Coll <i>et al.</i> 2008
Transcriptómica	Soja	Cheng <i>et al.</i> 2008
Transcriptómica, metabolómica	Arroz	Dubouzet <i>et al.</i> 2007
Metabolómica	Trigo	Baker <i>et al.</i> 2006
Transcriptómica	Trigo	Baudo <i>et al.</i> 2006
Proteómica	Patata	Lehesranta <i>et al.</i> 2005
Transcriptómica	Arabidopsis	El Ouakfaoui <i>et al.</i> 2005

i. Transcriptómica

El análisis masivo de la expresión genética, transcriptómica, se puede determinar, actualmente, mediante varias técnicas. El análisis de expresión es una aplicación muy importante de la transcriptómica en investigación. En plantas se han realizado varios experimentos para estudiar diferentes factores (por ejemplo, diferentes tejidos, estadios de desarrollo, condiciones ambientales) y concretamente en el análisis de riesgos de las PMG (Tabla 2). En animales, la transcriptómica también ha sido ampliamente usada para diferentes estudios. Concretamente, estas metodologías se han usada habitualmente en ensayos de toxicidad animal (Ditewig *et al.* 2014; Sahini *et al.* 2014; de Abrew *et al.* 2015).

El *microarray* (o chips de DNA) y la secuenciación masiva (RNA-Seq) son dos de las técnicas más comunes para el análisis de expresión génica en investigación. El *microarray* es un método basado en la hibridación entre una molécula de DNA con una sonda complementaria. La muestra de DNA se marca con un fluorocromo e hibrida de manera específica con las sondas inmovilizadas en una superficie sólida. Los RNA mensajeros (mRNA) de las muestras se retrotranscriben a cDNA, se marcan con el fluorocromo y se hibridan, permitiendo la cuantificación de muchos mRNA diferentes en un solo experimento. Además, el uso de fluorocromos con diferentes espectros de emisión y excitación permite el análisis simultáneo de dos muestras diferentes en el mismo *microarray* (por ejemplo, una muestra control marcada con un fluorocromo competirá por hibridar las sondas con una muestra tratada marcada con un fluorocromo de emisión diferente). El nivel de hibridación entre la sonda y la diana se mide normalmente mediante intensidad de fluorescencia. Finalmente se normalizan los datos de emisión de luz para convertirlos en niveles de expresión relativa para cada gen y muestra.

Existen *microarray* de cDNA (NimbleGen de Agilent) y de oligonucleótidos (GeneChips de Affymetrix) comerciales para varias especies de plantas como maíz, algodón, vid y tomate entre otras; en animales como rata, ratón y *Drosophila*, y humano. Uno de los más comunes, y que se ha usado en este trabajo, es *GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array de Affymetrix*. Es una herramienta potente para estudios

toxicológicos y neurobiológicos ya que permite el análisis simultáneo de más de 31.000 sondas que representan 28.000 genes de rata. Los datos de fluorescencia tienen que ser procesados para obtener los niveles de expresión relativa de cada gen en las muestras analizadas. Para esto, existen diferentes métodos dependiendo del tipo de chip. En el caso de los *microarray multiple channel* el método más usado para procesar los datos es el método *Robust Multi-array Average* (RMA) que incluye corrección del ruido de fondo y normalización.

En contraste a las metodologías basadas en la hibridación, como el *microarray*, existen herramientas transcriptómicas basadas en la secuenciación del DNA o RNA de alto rendimiento (NGS: *Next Generation Sequencing*). La secuenciación del RNA (RNA-Seq) es una de éstas tecnologías. En general, una muestra de RNA (total o parcial como poli(A)) se convierte en librerías de fragmentos de cDNA (Figura 15). Cada molécula, se secuencia para obtener secuencias cortas (*reads* o lecturas) de un extremo (*single-end*) o de dos (*pair-end*). Las plataformas de secuenciación más comunes actualmente son Illumina (illumina.com) y Ion Torrent (thermofisher.com). Después de la secuenciación, las lecturas obtenidas se alinean a un genoma de referencia o son ensamblados *de novo* sin unas secuencias de referencia, para producir un mapa o perfil transcriptómico que consiste en la cuantificación de los niveles de cada gen (Wang *et al.* 2009). Existen múltiples metodologías para el análisis de los resultados generados por RNA-Seq (Rapaport *et al.* 2013; Seyednasrollah *et al.* 2013; Sonesson y Delorenzi 2013). Cada uno de ellos presenta diferentes ventajas e inconvenientes, y aunque no existe un consenso actual, dos de los métodos más comunes son Cufflinks (Trapnell *et al.* 2010) y edgeR (Robinson *et al.* 2010). El RNA-Seq, al contrario que las aproximaciones basadas en hibridación, no está limitado a detectar transcritos de secuencias genómicas existentes. Por esto, es muy atractivo para detectar secuencias nuevas no anotadas o para trabajar con organismos no modelo.

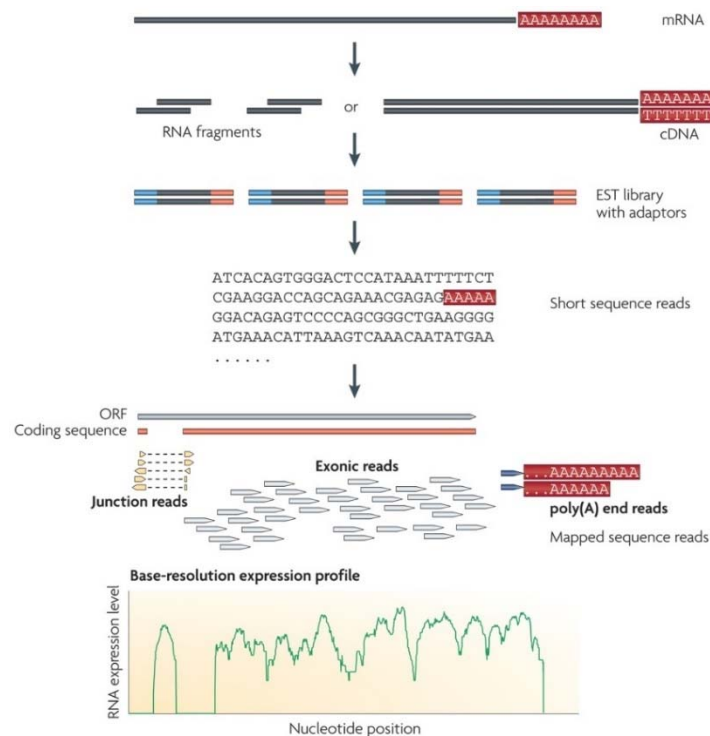


Figura 15. Pasos en un experimento de RNA-Seq. Las secuencias de RNA se convierten en librerías de fragmentos de cDNA. Los adaptadores (en azul y naranja) se añaden a cada fragmento de cDNA y se obtienen las secuencias de cada cDNA mediante RNA-Seq. Las lecturas resultantes se alinean en un genoma de referencia para genera perfiles de expresión de cada gen [Fuente: Wang *et al.* 2009].

La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) es un método común para analizar la expresión de genes debido a la sensibilidad y especificidad de la PCR. Esta metodología se usa para validar datos obtenidos en análisis transcriptómicos de experimentos de *microarray* o RNA-Seq (Coll *et al.* 2008; Hansey *et al.* 2012; Liu *et al.* 2015). Gracias a los avances tecnológicos realizados en los recientes años, la metodología de la PCR también puede usarse para realizar cuantificaciones de expresión génica a nivel masivo mediante el uso de *array* de PCR. Para poder usar esta tecnología se necesitan avances paralelos para calcular los cambios de expresión relativos considerando las eficiencias de las reacciones de la PCR. Entre estos, existe el método de comparación de los ciclos de la reacción, sin embargo, este método requiere que las eficiencias de las reacciones de la PCR sean iguales y cercanas al 100%. Se ha descrito que el mejor método para calcular las eficiencias de PCR es a partir de la construcción de las curvas estándar (Hellemans *et al.* 2007). Una de las ventajas de los *microarray* comerciales de PCR como OpenArray (Thermo) o de los *arrays microfluidic dynamic* (Fluidigm), es la facilidad para construir curvas estándar de varios *array* usando las muestras diluidas al mismo factor. Por tanto, esto permite usar la cuantificación relativa para comparar las concentraciones de múltiples muestras y comparar los perfiles de expresión génica en varios ensayos. También es importante el desarrollo de programas que permitan el análisis relativamente automático de los datos de expresión génica masivo. El programa *DAG expression* (Ballester *et al.* 2013) permite el análisis de los datos obtenidos de los *array* de PCR mediante la construcción de las curvas estándar para la cuantificación relativa, permitiendo el uso de varios genes de referencia para la normalización.

ii. Proteómica

Las técnicas de proteómica estudian las proteínas a nivel cualitativo y cuantitativo en una célula, tejido u organismo en un momento específico, y también permite investigar las modificaciones postraduccionales. En las plantas, esta metodología se ha propuesto para evaluar posibles cambios en los niveles de expresión de las proteínas debidos a la presencia de modificación genética en *Arabidopsis*, patata, soja y maíz (FAO/WHO 2002 y Tabla 2). En animales una de las aplicaciones más frecuentes de la proteómica ha sido la investigación de perfiles proteómicos alterados por un agente tóxico, y esta técnica se ha usado en estudios de toxicidad, patogenicidad y alergenidad (Liu *et al.* 2016; Ljunggren *et al.* 2016; Miller *et al.* 2016).

La aproximación más usada se basa en la separación y cuantificación electroforética de las proteínas en un gel bidimensional seguida de la identificación de los *spots* diferenciales por espectrometría de masas (MS). Esta tecnología se denomina proteómica bidimensional (2D) ya que separa las proteínas en función de dos parámetros. Primero, se separan según su punto isoeléctrico (pI) en el enfoque isoeléctrico (IEF) y seguidamente se separan según el peso molecular (PM) en una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulphate polyacrylamide*) (O'Farrell 1975). Los *spots* de proteínas en los geles se pueden detectar mediante diferentes métodos de tinción como *Coomassie Brilliant Blue*, sales de plata o fluorescencia. Para detectar cambios cuantitativos en los niveles de expresión de las proteínas entre diferentes tejidos o condiciones se necesitan programas especiales para el análisis de los perfiles proteómicos. La mayoría de éstos permiten la detección de los *spots*, corrección del ruido de fondo, el emparejamiento de los diferentes geles, normalización y comparación. Los *spots* de interés pueden ser recortados del gel e identificados por espectrometría de masas (MS).

Existen distintos tipos de MS, aplicadas a la identificación de proteínas retenidas en geles. La más utilizada hasta la fecha ha sido la identificación mediante huella peptídica (MALDI-TOF/TOF). Esta técnica se basa en la digestión trípica, ionización y transferencia de moléculas para ser analizadas desde una fase condensada a una fase gas para identificar la masa molecular y la carga de la proteína. Los espectrómetros de masas consisten en tres módulos: fuente de ionización (genera los iones), analizador de masas (distribuye los iones por su masa aplicando fuerzas electromagnéticas) y el detector (dispone los datos para calcular las abundancias de cada ion).

La espectrometría de masas se puede usar para determinar no solo la masa molecular de los péptidos sino para determinar otras características como las secuencias de aminoácidos en lo que se llama espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Existen varias aproximaciones de espectrometría de masas en tándem con características analíticas diferentes (ver una revisión en Domon y Aebersold, 2006). Finalmente, la cromatografía líquida de fase reversa da mayor sensibilidad y especificidad ya que concentra y separa los péptidos antes de secuenciarse por MS (Gygi *et al.*, 2001). Esta técnica ha evolucionado y perfeccionado hasta permitir separar extractos proteicos completos e identificar mezclas complejas de péptidos (hasta 10.000 péptidos) sin tener que utilizar geles de acrilamida (Jorrín-Novo *et al.* 2015). En este trabajo se han identificado las proteínas mediante el espectrómetro de trampa iónica (LTQ) Orbitrap Velos acoplado a HPLC (LC-MS/MS).

Aunque se ha avanzado mucho en el conocimiento de los proteomas de muchas especies y en la mejora de esta tecnología, la proteómica 2D-MS tiene algunas limitaciones como la baja solubilidad de las proteínas de membrana, rango dinámico limitado y dificultad para visualizar e identificar las proteínas menos abundantes (Oliveira *et al.* 2014). Se ha informado que la profundidad conseguida por la 2D es de máximo unos 2.000 *spots*, lo que representa aproximadamente un 2% del proteoma total (Martyniuk *et al.* 2012). Pese a los considerables avances en la proteómica comparativa por MS/MS, algunos autores concluyen que por ahora no existe una técnica de análisis masivo del proteoma completo. De hecho, las proteínas son física y químicamente mucho más diversas que los ácidos nucleicos y el número de especies proteicas distintas supera en varios órdenes de magnitud el número de genes, lo cual dificulta el obtener una metodología de análisis de proteomas completos o incluso de muestras complejas. En este sentido todas las tecnologías analíticas son importantes y complementarias (Martyniuk *et al.* 2012; Oliveira *et al.* 2014).

iii. Metabolómica

La identificación de alteraciones del perfil metabolómico, conocido como metabolómica, es el último nivel de análisis postgenómico y también se ha incluido en la propuesta de técnicas de caracterización para la determinación de efectos no intencionados derivados de la inserción del transgén en la planta (FAO/WHO, 2002). La metabolómica se refiere al conjunto de todos los metabolitos sintetizados a partir de todos los procesos enzimáticos en una ruta metabólica. La metabolómica de plantas se ha expandido en los últimos años tal como se refleja en el número de publicaciones (Tabla 2) con aplicaciones en diferentes campos y sobre todo para detectar riesgos no intencionados en plantas MG. En el reino animal, el análisis masivo de metabolitos permite identificar perfiles metabolómicos alterados en muestras de tejidos diana como plasma o tejidos tumorales (Griffin y Kauppinen 2007; Want *et al.* 2013; James y Parkinson 2015).

La estimación del número de compuestos químicos presentes en el reino vegetal parece oscilar entre 100.000 y 200.000 (Oksman-Caldentey y Inze, 2004) y se caracterizan por ser de naturaleza muy diversa. Debido a su complejidad – mayor que la proteómica – solo la combinación de distintas técnicas permitiría analizar gran parte del metaboloma de un organismo (Roessner *et al.* 2001). La resonancia magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*, NRM) es una alternativa a los ensayos basados en MS para el análisis metabólico. Es una técnica cuantitativa y no destructiva que se puede usar para una caracterización rápida de un gran número de muestras (Cellini *et al.* 2004).

Bioinformática

El análisis de efectos perjudiciales y la identificación de riesgos biológicos de los OMG, se basa en los análisis *in vivo* en animales. También hay que remarcar la relevancia de los estudios *in vitro* e *in silico*. El análisis de datos de las tecnologías ómicas ha llevado asociado un desarrollo informático importante ya que se han necesitado metodologías de análisis masivo. Por una parte, se han implantado nuevos modelos estadísticos que permiten la identificación de datos con relevancia estadística y biológica. Y por otra parte se han desarrollado multitud de programas informáticos como herramientas para el análisis de los datos derivados de las ómicas.

Los diseños experimentales de la transcriptómica, proteómica y metabolómica suelen basarse en la comparación de dos grupos, usando las tasas de cambio (*fold change*, FC) asociadas a estrictos análisis estadísticos para identificar genes, proteínas o metabolitos diferenciales. Los test de significancia estadística aplicados a las ómicas necesitan el uso de métodos de corrección (*multiple testing correction*) para evitar los falsos positivos debido al alto número de compuestos analizados simultáneamente. Los métodos de Bonferroni o Benjamini y Hochberg (*False Discovery Rate*, FDR) son los métodos más comunes para corregir la tasa de error general (Benjamini y Hochberg 1995). Así mismo estos experimentos basados en las comparativas de múltiples grupos generan una cantidad de datos importante que se pueden interpretar fácilmente mediante estadística multivariada como el análisis de componentes principales (*Principle Component Analysis*, PCA), clúster jerárquico y *heatmaps*.

Paralelamente, se han implantado programas informáticos que permiten la ejecución de la estadística y la visualización de datos. Actualmente el lenguaje de programación “R” es uno de los más usados para este fin, ya que permite usar diferentes paquetes con algoritmos para análisis de datos generados en diferentes metodologías y la creación de gráficos y figuras.

Otro aspecto a destacar es la generación de bases de datos *on line* de genes, transcritos, proteínas y otras moléculas en diferentes organismos (microorganismos, plantas y animales), tejidos y estadios de desarrollo, así como en diferentes estados fisiológicos (salud o enfermedad). Con esta información se pueden interpretar la relevancia biológica de diferentes rutas celulares y estados fisiológicos. Paralelamente se han establecido sistemas de clasificación funcional de los constituyentes moleculares y rutas para unificar y globalizar la información. Dos ejemplos de sistemas de clasificación de moléculas biológicas son *Gene Ontology* (Ashburner *et al.* 2000) y *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Kanehisa y Goto 2000).

8. Desafío actual de la agricultura

Aumento de la demanda de alimentos

El constante y acelerado crecimiento de la población mundial desde el siglo XIX se ha visto apoyado desde mediados del siglo XX por la revolución verde que, gracias al incremento de los rendimientos en la producción agrícola, ha contribuido a la disminución de la desnutrición de la población.

Esta tendencia se mantiene hoy en día y según las Naciones Unidas, se especula que la población mundial va a aumentar de los 7.300 millones de personas en el 2015 hasta los 9.150 millones en el 2050 (FAO 2009; Alexandratos y Bruinsma 2015). Se estima, por tanto, que la producción global de alimentos tendrá que aumentar en un 70% en este período para alimentar a la creciente población (FAO 2009). Consecuentemente, la demanda de cereales tanto para consumo humano como animal va a aumentar también hasta los 3.000 millones de toneladas necesarias en el 2050 (en el 2014 se produjeron 2.800 millones de toneladas de cereales (faostat.fao.org, 2016). Este crecimiento se va a dar sobre todo en países en vías de desarrollo, que además van a demandar más cantidad de productos lácteos, cárnicos y pesqueros y por tanto necesitarán más cereales para consumo animal.

Estas predicciones, sin embargo, están sujetas a un grado alto de incertidumbre debido al entorno en el que se mueve la producción agrícola y los factores que inciden sobre ella. Un primer factor es la tierra fértil disponible, si bien en los últimos años se han roturado enormes extensiones de tierra ocupada por bosques en países en vías de desarrollo, en los países desarrollados una parte importante del suelo arable se ha convertido en suelo urbano o industrial, por lo que la oferta de tierra fértil se convertirá en un factor limitante de la producción agraria. El cambio climático, las políticas reguladoras, así como conflictos internacionales como guerras son factores que van a influir de manera importante en la oferta de alimentos para el consumo humano. El precio de la energía, en la medida que afecta al creciente uso de los cultivos para la obtención de biocombustibles, podría hacer cambiar las tendencias y provocar una mayor demanda de cereales. Los llamados biocombustibles de primera generación (producidos de biomasa vegetal y, por tanto, compiten con la producción de alimentos) se obtienen principalmente del maíz en EEUU y de la caña de azúcar en Brasil para producir bioetanol. Los biocombustibles de segunda y tercera generación (que no competirían con los cultivos) no son aún una realidad porque no se ha rentabilizado su producción. Sin embargo, la mejora tecnológica de los procesos de optimización pronostica un buen futuro (Puigdomènech y Caparrós 2011; Alexandratos y Bruinsma 2015).

Seguridad alimentaria

Después de las crisis alimentarias que habían sacudido Europa en los años 90 del siglo XX (las vacas locas, dioxinas) la Comisión Europea creó la EFSA (*European Food Safety Authority*) en el 2002 como organización que, con criterios estrictamente científicos, emitiría opiniones para asesorar en la implantación de la normativa europea sobre seguridad alimentaria. Se forjó un compromiso en materia de comercio internacional de alimentos, así como el cumplimiento del Protocolo de Cartagena (Convenio sobre la Diversidad Biológica 2000). La EFSA convive y coopera con las agencias de seguridad alimentaria a nivel estatal, como el caso de AECOSAN en España.

El concepto de seguridad alimentaria (*food security* en inglés) fue acuñado por primera vez en la FAO en el año 1975, y se revisó en la Cumbre Mundial sobre la Alimentación del 1996 para ofrecer la definición actual:

“La seguridad alimentaria existe cuando todas las personas tienen, en todo momento, acceso físico, social y económico a alimentos suficientes, inocuos y nutritivos que satisfacen sus necesidades energéticas diarias y preferencias alimentarias para llevar una vida activa y sana”.

Este término no debe confundirse con lo que en inglés se denomina *food safety*, que hace referencia al concepto de seguridad referido a la calidad e inocuidad de los alimentos en toda la cadena de producción, procesado y comercialización.

Actualmente la comunidad científica y agrícola necesitan de nuevos enfoques intelectuales que reúnan ciencia, industria y otros sectores implicados, para explotar nuevas y emergentes oportunidades de investigación para promover un desarrollo coherente y sostenible; asegurar la disponibilidad de recursos a largo plazo y conservar una tierra sana y arable para las generaciones futuras. Los resultados de las investigaciones derivadas de esta tesis doctoral se consideran de relevancia en este sentido ya que se propone una mejora de la evaluación de la seguridad de las PMG.

MARCO DE LA TESIS DOCTORAL

MARCO DE LA TESIS DOCTORAL

Esta tesis doctoral ha sido desarrollada en el contexto de un proyecto europeo del 7º Programa Marco con el acrónimo GRACE: *GMO Risk Assessment and Communication of Evidence* KBBE.2012.3.5-04 (www.grace-fp7.eu). Los objetivos principales de este proyecto fueron:

- a) Reconsiderar el diseño, la ejecución y la interpretación de los resultados de los estudios de toxicidad en animales, así como desarrollar aproximaciones experimentales alternativas para la evaluación de los riesgos de alimentos y piensos MG.
- b) Elaborar una revisión sistemática de las evidencias actuales del impacto de las plantas MG comercializadas, sobre la salud humana y animal, el medioambiente y la economía.

La actividad de GRACE, comprendida entre el 2012 y 2015, contó con la participación de 10 grupos de investigación, mayoritariamente europeos. Una característica remarcable del proyecto fue la comunicación con todas las partes interesadas o *stakeholders* (empresas, organizaciones de consumidores, representantes de autoridades competentes, etc.), que pudieron participar en el diseño experimental y en la interpretación de los resultados a lo largo de todo el proyecto.

Los bloques de trabajo en que se desarrolló la investigación presentada en esta tesis doctoral se centraron en la re-evaluación de los estudios de toxicidad en ratas; y en la evaluación de las nuevas tecnologías ómicas para complementar el análisis de riesgos de las plantas MG. y poder, en algunos casos, evitar los estudios en animales.

El planteamiento del proyecto contempló utilizar maíz MON810 como planta MG modelo; y analizarla mediante (i) métodos analíticos clásicos, (ii) nuevas tecnologías ómicas; y (iii) estudios de toxicidad en ratas durante 90 días y 1 año, siguiendo las recomendaciones de la OCDE y EFSA, y con la inclusión de análisis ómicos en una selección de órganos diana. Remarcablemente, se utilizó el mismo material vegetal en todos los análisis anteriores. El maíz se produjo durante las temporadas de siembra de los años 2012 y 2013 en la región de l'Empordà. Se produjeron únicamente variedades comerciales de maíz: dos variedades MG MON810, las dos variedades *near-isogenic* respectivas, y 5 variedades convencionales adicionales (solamente 4 en 2013).

Los piensos destinados a la alimentación de las ratas se elaboraron en una empresa especializada llamada Mucedola (Italia). Éstos se formularon a base de un 33% de maíz (considerado como contenido máximo de esta especie vegetal en una dieta equilibrada para ratas), complementado con diferentes productos de origen vegetal, específicamente seleccionados como no MG. Se elaboraron dietas con diferentes dosis de

maíz MG: dosis alta (33% de maíz MG); dosis baja (11% de maíz MG y 22% *near-isogenic*) y dosis control (0% maíz MG y 33% *near-isogenic*). Las variedades convencionales se usaron para formular dietas con un 33% de maíz convencional. En total se produjeron 10 dietas con el maíz del 2012 destinadas al estudio de 90 días y 4 con el maíz del 2013 destinadas al estudio de 1 año.

Tanto el grano de maíz como las dietas se analizaron a nivel composicional siguiendo las recomendaciones de EFSA; se incluyó el análisis de alérgenos, micotoxinas, antinutrientes y trazas de otros OMG. Como se ha comentado, el grano de maíz se analizó, adicionalmente, mediante las técnicas ómicas transcriptómica, proteómica y metabolómica.

Los ensayos en animales se llevaron a cabo en la Universidad Médica de Eslovaquia, miembro del consorcio GRACE. El diseño experimental de los ensayos de toxicidad a 90 días contempló ensayar las 10 dietas y utilizar 16 animales por sexo y dieta. Por otro lado, únicamente 4 dietas se testaron en ensayos de toxicidad a 1 año, con 20 animales por sexo y dieta.

Durante los ensayos se realizaron observaciones periódicas a todos los animales: observaciones clínicas, control del consumo de agua y pienso, control del peso corporal y análisis serológicos e inmunológicos. Una vez concluido el período de cada estudio de toxicidad, cada uno de los animales fue sometido a necropsia y se conservaron muestras de algunos órganos, notablemente el hígado, para análisis mediante ómicas. Como es preceptivo en este tipo de estudios, se realizaron estudios histopatológicos de todos los órganos vitales empezando con los grupos de dosis altas y control y en caso de detectarse una alteración clara, se analizaron los grupos de dosis intermedias.

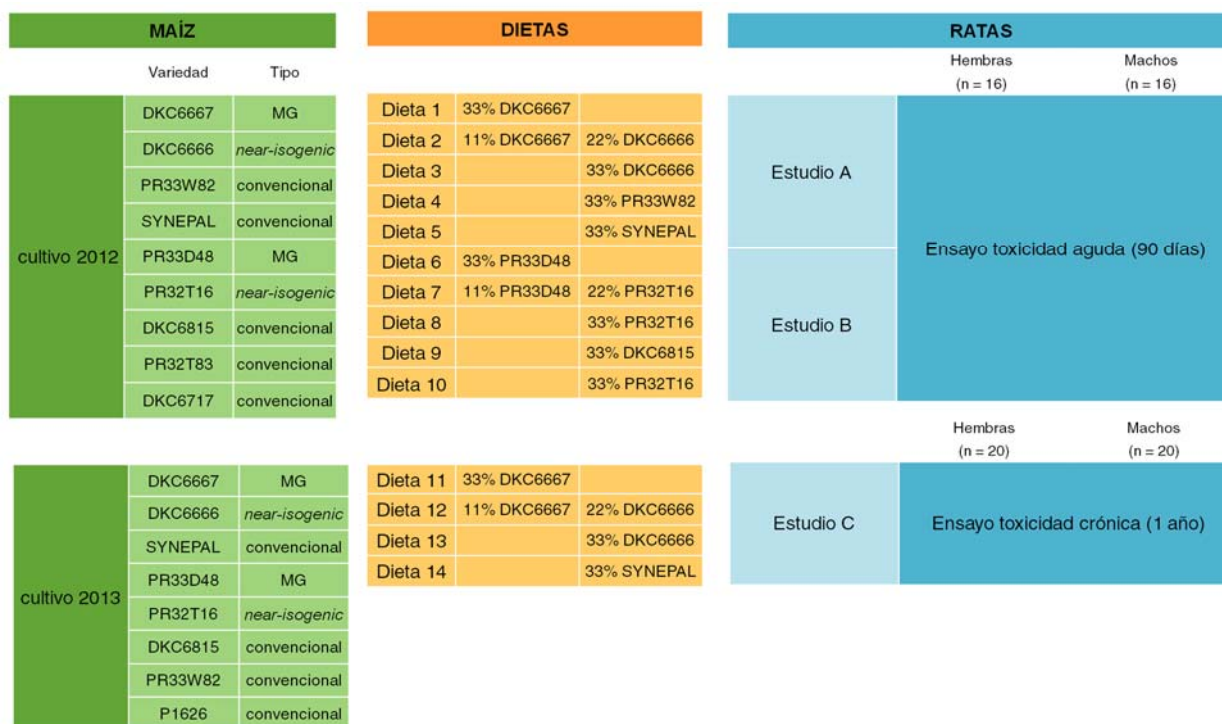


Figura 16. Esquema del diseño experimental de los estudios de ómicas sobre material vegetal, y de toxicidad en ratas, del proyecto GRACE.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

La presente tesis doctoral pretende contribuir en la valoración de la transcriptómica y la proteómica como herramientas para la evaluación de la seguridad de las plantas MG en el marco de la normativa europea, utilizando como modelo el maíz evento MON810. A tal efecto se definieron los siguientes objetivos:

1. Análisis comparativo de semillas de maíz MON810 con las correspondientes variedades *near-isogenic* y variedades convencionales para detectar posibles efectos no intencionados en el maíz MON810 y evaluar su impacto sobre la seguridad alimentaria.
 - 1.1. Comparación transcriptómica del maíz MON810 y variedades convencionales mediante tecnología de secuenciación masiva RNA-Seq.
 - 1.2. Comparación proteómica del maíz MON810 y variedades convencionales mediante proteómica bidimensional.
 - 1.3. Comparación proteómica de maíz contaminado con micotoxinas y variedades convencionales mediante proteómica bidimensional.
 - 1.4. Comparación proteómica de tubérculos de patata MG resistente a hongos y variedades convencionales mediante proteómica bidimensional.
2. Análisis comparativo de los hígados de ratas de estudios de alimentación a 90 días y 1 año con dietas elaboradas con el maíz MON810
 - 2.1. Comparación de los transcriptomas hepáticos de ratas sometidas a estudios de toxicidad de 90 días y 1 año, que han recibido dietas con un 33% de maíz MON810 o convencional, mediante (i) análisis por *microarray* y (ii) análisis de expresión dirigida de una selección de genes marcadores de toxicidad hepática.
 - 2.2. Comparación de los proteomas hepáticos de ratas sometidas a un estudio de toxicidad de 90 días, que han recibido dietas con 33% de maíz MON810 o convencional, mediante proteómica bidimensional.

RESULTADOS

1.1 Transcriptómica comparativa en embrión de maíz MON810

El transcriptoma es el conjunto de todos los transcritos expresados específicamente en un tejido, en un estadio de desarrollo o condición fisiológica concreta de un organismo. La secuenciación masiva de transcritos (RNA-Seq) es una técnica de gran sensibilidad y versatilidad que permite estudiar la expresión de varios miles de genes en diferentes condiciones, sin necesidad de conocer previamente la identidad de esos genes. Esta técnica, tiene una especial relevancia en el estudio comparativo de plantas ya que permite conocer genes y rutas con aplicaciones en la mejora genética de variedades de interés (Thompson y Goggin, 2006; Davidson *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2014; Imadi *et al.*, 2015).

En este trabajo se realizó el análisis transcriptómico usando la plataforma de secuenciación Illumina HiSeq 2000, como herramienta para detectar posibles efectos no intencionados derivados de la inserción del transgén *cry1A(b)* en el maíz MON810. Se secuenció el RNA de embrión de maíz de semilla seca porque este órgano es destinado mayormente para alimentación humana y animal. Se eligió el embrión porque este tejido permite la obtención de RNA de mayor concentración y pureza. Además, el endospermo es un tejido donde más del 65% de genes expresados pertenecen a zeinas, que son proteínas de almacenaje, vitales para el desarrollo de la semilla (Chen *et al.*, 2014), lo cual podría provocar una disminución de la profundidad de la secuenciación.

El análisis de los resultados generados por el RNA-Seq requiere de protocolos bioinformáticos complejos. Actualmente se han desarrollado metodologías de análisis, con diferentes algoritmos y características. Se usó el protocolo de Cufflinks ya que se consideró bien implantado y ampliamente aceptado por la comunidad científica para cuantificar expresión génica por RNA-seq en maíz (Chettoor *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2014; Salvo *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015).

Diseño experimental

Se obtuvieron los perfiles transcriptómicos de embriones de maíz de un total de 11 variedades entre las que se incluyeron dos pares de variedades de maíz transgénico MON810 de dos empresas diferentes (Monsanto-Dekalb y Pioneer Hi-Bred) que han sido desarrolladas a través de programas de mejora específicos y consecuentemente tienen fondos genéticos diferentes. Además, se incluyeron las dos respectivas líneas *near-isogenic* no MG, que corresponden a las variedades comerciales más cercanas genéticamente, y que, por tanto, en este trabajo se usaron como controles comparadores directos.

Adicionalmente, se incluyeron 4 variedades de maíz convencional para investigar la variabilidad natural de los transcriptomas del maíz. Finalmente, se estudiaron las variedades PR33D48 (MG), PR32T16 (*near-isogenic*) y DKC6815 (convencional) cultivadas en los años consecutivos 2012 y 2013, con el fin de ensayar la influencia de las condiciones ambientales sobre la modificación genética. En la Tabla 3 se especifican las variedades usadas en este experimento. Como se indicó en “MARCO DE LA TESIS DOCTORAL” en la p. 63 se analizaron también estas mismas variedades a nivel proteómico, y fueron las que se destinaron a los ensayos toxicológicos de 90 días y 1 año en ratas.

Tabla 3. Variedades de maíz analizadas por transcriptómica.

Variedad	Tipo	Año cultivo	Código	Empresa
PR33D48	MG	2012	48mg_12	Pioneer Hi-Bred
		2013	48mg_13	
PR32T16	<i>near-isogenic</i>	2012	16_12	Pioneer Hi-Bred
		2013	16_13	
DKC6667	MG	2012	67mg_12	Monsanto Dekalb
DKC6666	<i>near-isogenic</i>	2012	66_12	Monsanto Dekalb
DKC6815	convencional	2012	15_12	Monsanto Dekalb
		2013	15_13	
SYNEPAL	convencional	2012	AL_12	Koipesol Semillas
PR33W82	convencional	2012	82_12	Pioneer Hi-Bred
PR32T83	convencional	2012	83_12	Pioneer Hi-Bred

Se realizaron dos extracciones independientes de RNA total de un *pool* de 30 embriones de maíz por cada variedad. Las muestras con RIN>8 y relación de rRNA>2 se usaron para realizar las carreras de secuenciación, con lecturas de 50 pb SE (*single-end*) con una profundidad de 40M de lecturas. Previamente a la secuenciación, se testaron todos los endospermos de las variedades convencionales y *near-isogenic* por qPCR para asegurar la ausencia de la inserción *cry1a(b)*.

Control de calidad

Los resultados de las carreras devolvieron más de 44 millones de lecturas SE limpias. Los datos de las lecturas se analizaron para comprobar la calidad de la secuenciación mediante el programa FastQC v 0.11.5. Se obtuvieron los parámetros relacionados con la calidad de cada base de las secuencias, el contenido en bases en cada secuencia, la distribución de los tamaños de las lecturas, así como el porcentaje de duplicaciones o el contenido de *K-mers*. Todas las carreras realizadas superaron los test de calidad. Posteriormente, se procedió al análisis de expresión diferencial siguiendo el procedimiento bioinformático de Cufflinks v 2.2.0 (Trapnell *et al.* 2012). El primer paso para el análisis de expresión diferencial es el mapeo de las lecturas con el genoma de referencia. Se usó el ensamblaje del genoma de referencia AGPv3 (genoma de la variedad B73) donde están anotados 39.469 genes codificantes y 63.391 transcritos. Para el mapeo se usó la aplicación Tophat v 2.0.9 basada en los algoritmos de Bowtie 2.1.0. El porcentaje de mapeo en todos los replicados fue superior a 70%, y de promedio un 65% de las lecturas mapearon en sitios únicos del genoma (ver Anexo III). Las lecturas mapeadas se ensamblaron para construir el transcriptoma mediante los algoritmos de Cufflinks, y posteriormente se cuantificaron los

niveles de expresión para realizar el análisis de expresión diferencial por pares mediante el Cuffdiff (ver Anexo III). Cuffdiff calcula los niveles de expresión en FPKM (*Fragments Per Kilobase of exon per million fragments Mapped*) de cada transcrito y gen en cada carrera de RNA-Seq. Los FPKM de los transcritos primarios y genes se computan por la suma de FPKM de cada transcrito en cada grupo de transcritos primarios o de genes. En este trabajo se han utilizado los resultados generados a nivel de transcritos primarios o isoformas.

Variabilidad general de los perfiles transcriptómicos de embriones de maíz

En la exploración inicial de los datos, se pudo apreciar que todas los replicados fueron muy consistentes; ya que las correlaciones (R, coeficiente de correlación de Pearson) entre replicados fueron $R > 0,89$. Las correlaciones entre los transcriptomas de las diferentes variedades variaron entre 0,55 y 0,93, lo que indica que entre distintas variedades puede haber hasta un 50% de diferencias transcriptómicas. Se representó la relación de similitud entre los transcriptomas de todas las variedades analizadas, visualizado a través de un dendrograma y jerarquización por clúster calculada por el método Ward y por la distancia euclídea (Figura 17). En el dendrograma se apreció cómo las variedades de Pioneer cultivadas en los dos años diferentes se situaban en un mismo clúster. Los genotipos de Monsanto (67mg_12, 66_12, 15_12 y 15_13), así como la variedad 83_12 también se agruparon en un clúster específico. Además, las parejas de variedades cultivadas en dos años diferentes mostraron las mayores similitudes. Remarcablemente, cada variedad MG se situó inmediatamente próxima a su respectiva variedad *near-isogenic*. Las variedades convencionales 82_12 y AL_12 formaron un clúster alejado del resto de variedades. Esto también se pudo apreciar en el análisis de componentes principales (PCA), donde la primera componente (que explica más del 90% de la variabilidad) separó estas dos variedades del resto (Figura 18). Estas dos variedades resultaron tener un ciclo FAO de 600 mientras que el resto de variedades testados tuvieron un ciclo FAO de 700¹. Se trata pues, de dos variedades con importantes diferencias a nivel de características agronómicas; lo cual podría explicar las diferencias observadas.

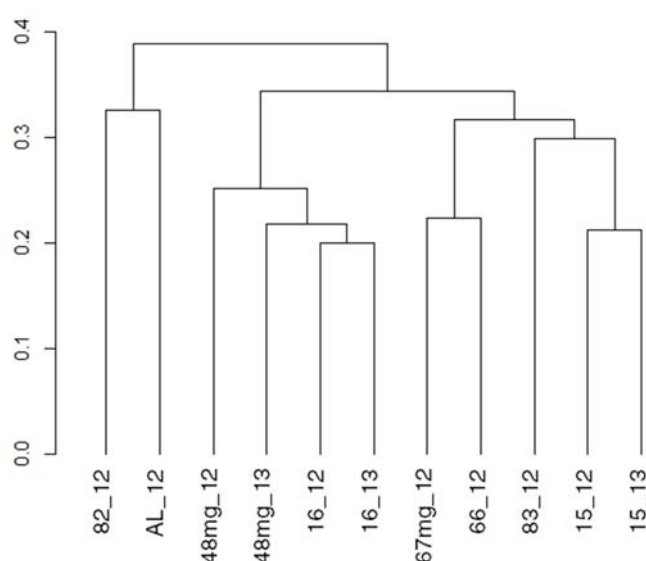


Figura 17. Dendrograma de los transcriptomas de embrón de distintas variedades de maíz cultivadas en dos años consecutivos

¹ Ciclo FAO: unidad basada en el tiempo y la temperatura necesarios para alcanzar la madurez fisiológica del maíz.

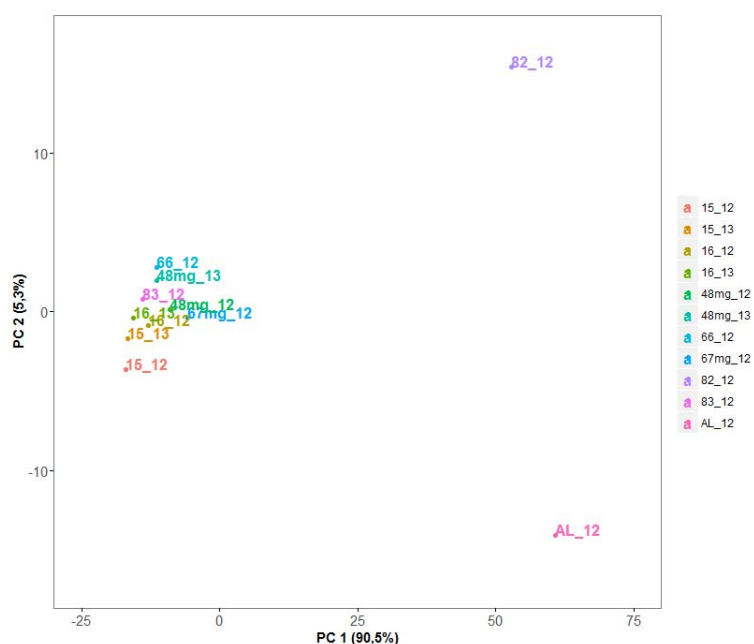


Figura 18. Análisis de componentes principales (PCA) de los transcriptomas de embrión de maíz de las 11 variedades. Se muestra el PC1 respecto al PC2.

Tránscritos diferenciales en los embriones de maíz MON810 y *near-isogenic*

Para determinar la expresión diferencial se utilizaron los tránscritos expresados con valor FPKM > 0,1 y se realizaron comparaciones por pares de todas las variedades de maíz analizadas. Se consideraron criterios de significancia de tasa de cambio (FC, *fold change*) logarítmica $|\log_2(FC)| > 1$ y q valor < 0,01 ajustado por el método Benjamini–Hochberg (Benjamini y Hochberg, 1995) para controlar los FDR (*False Discovery Rate*).

En la Figura 19 se muestra un resumen de las isoformas diferencialmente expresadas (IDE) entre todos los pares de variedades. El número de IDE entre las variedades se situó entre 1.789 y 34, siendo las variedades convencionales las que mostraron las diferencias mayores. Tal y como ya se mostró en el dendrograma, las mismas variedades cultivadas en dos años consecutivos mostraron una gran similitud (de 53 a 87 isoformas diferenciales). En concordancia con los resultados del PCA (Figura 18) las variedades AL_12 y 82_12 presentaron hasta 50 veces más IDE cuando se compararon con el resto, llegando a representar el 1,3% del total de isoformas. En cambio, los pares de variedades MG y *near-isogenic* presentaron las diferencias menores, con 34, 65 y 132 IDE en 48mg_12 vs 16_12, 48mg_13 vs 16_13 y 67mg_12 vs 66_12 respectivamente. Estos valores significaron menos del 0,01% del total de isoformas expresadas e identificadas en el transcriptoma.

Posteriormente, se analizaron en detalle estas IDE entre los transcriptomas de las variedades de maíz MON810 y *near-isogenic*, en diferentes genotipos y temporadas de cultivo (Tabla 4-Tabla 6). En las tres comparativas se obtuvieron 4 tránscritos comúnmente desregulados (Figura 20). Dos de estas isoformas correspondieron a proteínas ribosomales y las otras dos correspondieron a tránscritos noveles no anotados que estuvieron localizados en regiones donde se han anotado transposones.

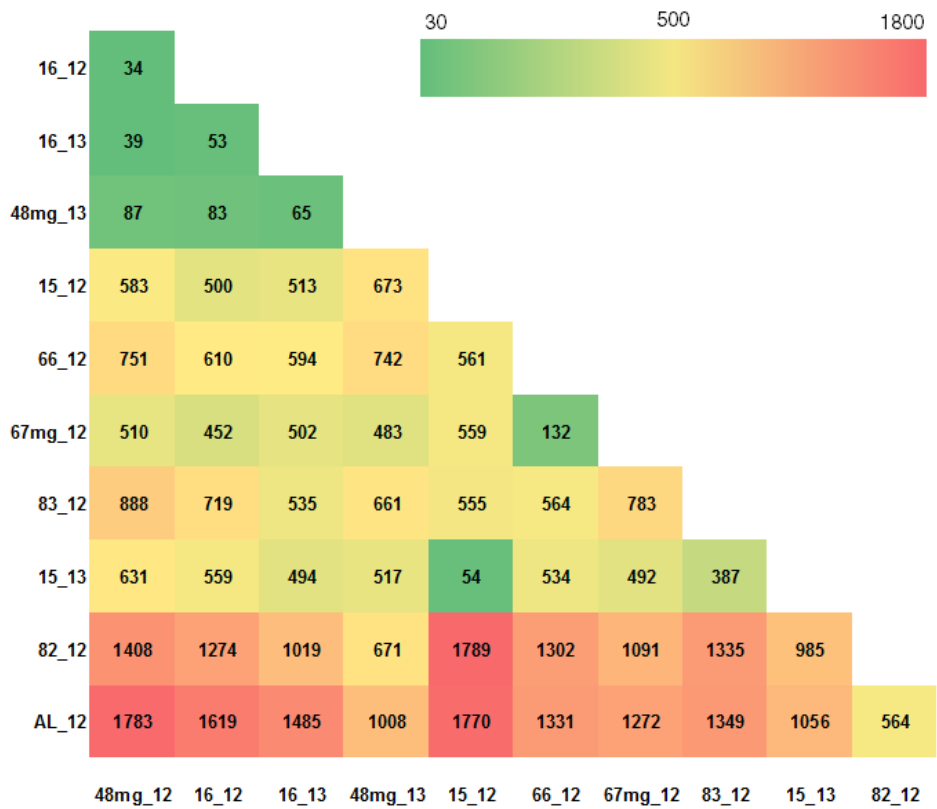


Figura 19. Numero de isoformas diferenciales entre todos los pares de variedades de maíz analizadas.

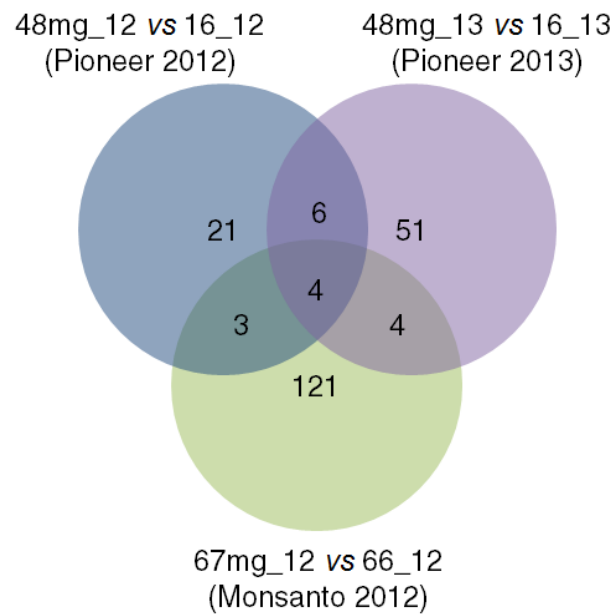


Figura 20. Diagrama de Venn del número de isoformas diferenciales en los tres pares de variedades MON810 vs near-isogenic

Tabla 4. Isoformas diferencialmente expresadas en el embrión de maíz 48mg_12 respecto a su respectiva *near-isogenic* 16_12.

Isoforma	Gen	Locus	Nombre del gen	Uniprot	Descripción
GRMZM2G069427_T01	GRMZM2G069427	1:234624109-234627012	rps7	Q6R9A4	Putative uncharacterized protein rps7
TCONS_00160245	-	9:116918173-116918571			
TCONS_00134908	-	8:24341948-24346387			
TCONS_00088127	-	4:111693068-111698168			
GRMZM5G839924_T01	GRMZM5G839924	Mt:101543-102116	nad9	Q6R9L0	NADH dehydrogenase subunit 9
TCONS_00022518	-	1:3468155-3468582			
GRMZM2G013970_T01	GRMZM2G013970	6:156942650-156944698	LOC100275360	B6SRT5	
TCONS_00105920	-	5:2060791-2061377			
GRMZM2G406378_T01	GRMZM2G406378	9:88181437-88190176	Zm.86052	K7WA97	Uncharacterized protein
GRMZM5G821527_T01	GRMZM5G821527	Mt:484680-502648	orfX	Q6R993	Transport membrane protein
GRMZM2G154278_T02	GRMZM2G154278	8:26070964-26074984	IDP144	B6T6R6	Pre-mRNA-splicing factor cwc15
TCONS_00031937	-	10:101797507-101798955			
GRMZM2G443343_T01	GRMZM2G443343	9:73999008-74003872	orf110-c	Q6R984	Putative uncharacterized protein orf110-c; Uncharacterized protein
GRMZM5G844030_T01	GRMZM5G844030	Mt:511893-514104	orf101-c	Q6R989	Putative uncharacterized protein orf101-c
GRMZM5G807592_T01	GRMZM5G807592	Mt:356473-356917	orf147-b	Q6R9C1	Putative uncharacterized protein orf147-b
GRMZM5G897562_T01	GRMZM5G897562	9:73813633-73815548	orf111-a	Q6R9G4	Putative uncharacterized protein orf111-a; Uncharacterized protein
GRMZM2G407837_T01	GRMZM2G407837	9:73853548-73856953	ccmC	Q6R9H6	Cytochrome c biogenesis C
GRMZM2G358236_T02	GRMZM2G358236	9:88199900-88204568	orf127	K7VAH0	Uncharacterized protein
AC225309.2_FG003	AC225309.2_FG003	1:128125104-128128515		A0A096PNB6	
GRMZM2G556515_T01	GRMZM2G556515	1:13994736-13995667	Zm.113381	A0A096U2H8	
GRMZM2G019039_T01	GRMZM2G019039	3:27443065-27449595		A0A096Q224	
GRMZM2G356639_T02	GRMZM2G356639	4:111721573-111726256	Zm.104332	K7U0N7	Uncharacterized protein
TCONS_00105945	-	5:4429176-4429584			
GRMZM2G411652_T01	GRMZM2G411652	4:156821140-156829630	Zm.25043	K7TZG1	Uncharacterized protein
TCONS_00105955	-	5:5334718-5335114			
CUFF.29762.1	GRMZM5G810054	5:3350032-3353992			
GRMZM2G141605_T01	GRMZM2G141605	9:69026390-69030671		K7VUY1	Uncharacterized protein
GRMZM2G347978_T01	GRMZM2G347978	2:236640837-236641371		A0A096TC44	
GRMZM2G450825_T01	GRMZM2G450825	1:234708253-234711462	COI	Q7HRM0	Cytochrome c oxidase subunit 1
GRMZM2G043657_T01	GRMZM2G043657	5:3094195-3094631	Zm.131774	A0A096QHN6	
GRMZM2G050625_T01	GRMZM2G050625	8:96784882-96789434		K7UV43	Uncharacterized protein

TCONS_00053190	-	2:66007605-66008052			
GRMZM2G083875_T01	GRMZM2G083875	8:62938177-62941497		K7VCY6	Uncharacterized protein
GRMZM2G456487_T01	GRMZM2G456487	8:64571422-64575093		K7V141	Putative WAK receptor-like protein kinase family protein

Tabla 5. Isoformas diferencialmente expresadas en el embrión de maíz 48mg_13 respecto a su respectiva *near-isogenic* 16_13.

Isoforma	Gen	Locus	Nombre del gen	Uniprot	Descripción
TCONS_00134908	-	8:24341948-24346387			
CUFF.2559.1	GRMZM5G867121	1:83018830-83021770			
GRMZM2G174347_T01	GRMZM2G174347	8:120487037-120488230	Zm.84657	B6SIZ8	Ethylene-responsive transcription factor 4 (AP2/EREBP)
GRMZM2G320506_T01	GRMZM2G320506	5:4670692-4674066	Zm.65	C0P4A7	calcium-dependent protein kinase 1-like
GRMZM2G136663_T01	GRMZM2G136663	7:100291727-100293586	Zm.132443	A0A096S9K4	Putative uncharacterized protein
TCONS_00092026	AC225718.2_FG006	5:48530505-48532951			
GRMZM2G177050_T01	GRMZM2G177050	7:172920910-172923332	LOC100280939	B6SPQ5	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 11
GRMZM2G355572_T01	GRMZM2G355572	3:7938774-7940982	Zm.2671	A0A096TDH7	Transposon protein CACTA, En/Spm sub-class
GRMZM2G172485_T01	GRMZM2G172485	2:217679509-217682041	Zm.20898	B6SS05	Putative uncharacterized protein
GRMZM2G162065_T01	GRMZM2G162065	5:55421258-55424903	LOC100304328	A0A096SR18	exocyst complex component exo70a1-like
CUFF.29863.1	AC159612.1_FG007	5:4582795-4585519			
GRMZM2G426046_T01	GRMZM2G426046	3:147659494-147660806	Zm.10267	A0A096TQV4	
GRMZM2G147014_T01	GRMZM2G147014	5:193902114-193903647	LOC100281087	B4G1H1	dehydrin cor410
GRMZM2G052720_T01	GRMZM2G052720	4:237684791-237686205	Zm.9621	B6TLY6	Ethylene-responsive transcription factor 3 (AP2/EREBP)
GRMZM2G144648_T01	GRMZM2G144648	3:41742537-41744737	Zm.79249	B6SIU4	Peroxidase 24
GRMZM5G819965_T01	GRMZM5G819965	1:47910537-47911634	Zm.10210	Q946U8	Long cell-linked locus protein
GRMZM2G380377_T01	GRMZM2G380377	6:62712929-62714535	DBP4	C3UZ69	DRE-binding protein 4
GRMZM2G020054_T01	GRMZM2G020054	10:65437298-65438594	EREB54	K7TL41	AP2-EREBP transcription factor (fragment)
GRMZM2G436593_T01	GRMZM2G436593	1:200669881-200671531		A0A096TST0	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein
GRMZM2G366910_T01	GRMZM2G366910	5:157240565-157242713	Zm.156180	A0A096TFI2	
GRMZM2G041809_T01	GRMZM2G041809	4:181903741-181906080		C0PHS9	Uncharacterized protein
GRMZM2G123394_T01	GRMZM2G123394	8:166704449-166706350	Zm.96220	K7VNA8	Uncharacterized protein
GRMZM2G324248_T01	GRMZM2G324248	9:94152457-94153254	LOC100274790	B6SJ91	Uncharacterized protein
GRMZM2G373522_T01	GRMZM2G373522	4:154337341-154339063	Zm.4870	C4J477	Dehydrin
GRMZM2G015605_T01	GRMZM2G015605	10:87281298-87285057		C0HIJ6	NaCl stress protein1
GRMZM2G474755_T01	GRMZM2G474755	8:91126488-91127653	LOC100304059	K7VUH8	Polcalcine Jun o 2
GRMZM2G061487_T01	GRMZM2G061487	1:217638317-217640370	EREB204	A0A060D7H3	DRE binding factor 1

GRMZM2G374074_T01	GRMZM2G374074	4:239966110-239967227		K7U8X3	Uncharacterized protein
GRMZM2G414727_T01	GRMZM2G414727	1:224437175-224438294	Zm.19299	A0A096TNR0	SAUR56-auxin-responsive SAUR family member
GRMZM2G423917_T01	GRMZM2G423917	8:159241882-159244984	Zm.80550	K7V9Q6	Src2-like protein
GRMZM2G056014_T02	GRMZM2G056014	8:132408283-132413739		K7V5W7	Calcium pump1
GRMZM2G438202_T01	GRMZM2G438202	10:141249355-141251027		K7TSB0	Putative AP2/EREBP transcription factor superfamily protein
GRMZM2G050625_T01	GRMZM2G050625	8:96784882-96789434		K7UV43	Uncharacterized protein
GRMZM2G443343_T01	GRMZM2G443343	9:73999008-74003872	orf110-c	Q6R984	Putative uncharacterized protein orf110-c
GRMZM2G358236_T02	GRMZM2G358236	9:88199900-88204568	orf127	K7VAH0	ribosomal protein s12
GRMZM2G066111_T01	GRMZM2G066111	9:58990476-58992884	atp4	K7VUK2	ATP synthase protein MI25
TCONS_00088260	-	4:128631263-128631723			
GRMZM2G162359_T01	GRMZM2G162359	7:10656436-10658172	LOC100274481	B4G1C2	xylanase inhibitor protein 1-like
GRMZM2G019039_T01	GRMZM2G019039	3:27443065-27449595		A0A096Q224	atpase subunit 9
TCONS_00148935	-	9:20468348-20470634			
TCONS_00089045	-	4:236008701-236009217			
GRMZM2G170017_T01	GRMZM2G170017	5:188907399-188909179	umc2600	B4FSX7	Carbonyl reductase 1
TCONS_00159508	-	9:20602837-20603227			
GRMZM2G011151_T01	GRMZM2G011151	9:128226159-128228208		K7WDC8	alpha-humulene synthase-like
TCONS_00081253	-	4:43193264-43195570			
TCONS_00133661	-	7:153285829-153286438			
TCONS_00088600	-	4:178624008-178624310			
TCONS_00022518	-	1:3468155-3468582			
GRMZM2G556515_T01	GRMZM2G556515	1:13994736-13995667	Zm.113381	A0A096U2H8	
GRMZM2G162486_T01	GRMZM2G162486	9:139006145-139008686	LOC100282090	B4FUN3	IN2-1 protein
TCONS_00053689	-	2:128168289-128168618			
TCONS_00012031	GRMZM2G171181	1:8612131-8615308			
CUFF.8139.1	GRMZM2G180258	10:2140026-2144013			
TCONS_00072157	-	4:1078821-1079977			
TCONS_00160957	GRMZM6G837083	scaffold_177:847-1567			
TCONS_00094832	GRMZM2G386811	5:163983244-163985765			
TCONS_00160245	-	9:116918173-116918571			
GRMZM2G478430_T01	GRMZM2G478430	10:114373613-114374457	Zm.104455	K7UIA9	Uncharacterized protein
TCONS_00053688	-	2:128137339-128137624			
GRMZM5G816453_T01	GRMZM5G816453	Mt:8751-9915	orf387	Q6R9N9	Uncharacterized 29 kDa protein in mitochondrial S-1 DNA

GRMZM2G000236_T01	GRMZM2G000236	9:7308583-7310337	Zm.103646	K7V5I3	12-oxophytodienoate reductase 2
TCONS_00120060	-	6:60923395-60923848			
GRMZM2G083875_T01	GRMZM2G083875	8:62938177-62941497		K7VCY6	Uncharacterized protein
AC205274.3_FGT001	AC205274.3_FG001	8:51816720-51817224	TIDP2793	B4FQY1	Pathogenesis-related protein PRMS
GRMZM2G069427_T01	GRMZM2G069427	1:234624109-234627012	rps7	Q6R9A4	Ribosomal protein S7

Tabla 6. Isoformas diferencialmente expresadas en el embrión de maíz 67mg_12 respecto a su respectiva *near-isogenic* 66_12.

Isoforma	Gen	Locus	Nombre del gen	Uniprot	Descripción
TCONS_00160767	-	Mt:514399-516262			
GRMZM2G575038_T01	GRMZM2G575038	4:111652226-111655275	orf99-g	Q6R9A8	Putative uncharacterized protein orf99-g
TCONS_00019094	GRMZM2G523971	1:234607182-234612397			
GRMZM2G314927_T01	GRMZM2G314927	3:8313287-8314107	Zm.132767	A0A096T6L3	
GRMZM2G122028_T01	GRMZM2G122028	3:215559622-215561400	Zm.1915	A0A096RZS1	
TCONS_00146850	-	8:6341461-6341906			
TCONS_00022743	-	1:30022464-30023513			
GRMZM2G704282_T01	GRMZM2G704282	9:99504970-99505232		K7WAV9	Uncharacterized protein
GRMZM5G822401_T01	GRMZM5G822401	Mt:191868-192351	orf160-a	Q6R9H9	Putative uncharacterized protein orf160-a
GRMZM2G121654_T01	GRMZM2G121654	1:234670922-234672417	Zm.64734	A0A096RZJ4	
TCONS_00160781	-	Mt:558400-560430			
GRMZM2G155432_T01	GRMZM2G155432	4:111635109-111649656	Zm.90127	K7U0N1	Uncharacterized protein
GRMZM2G049767_T01	GRMZM2G049767	3:20649548-20650492	LOC100282956	B6SLV6	16.9 kDa class I heat shock protein 3
GRMZM2G375517_T01	GRMZM2G375517	2:220266946-220268779	Zm.3740	A0A096TGY6	22.0 kDa class IV heat shock protein
CUFF.43375.2	AC213455.3_FG008	7:158167267-158172375			
GRMZM2G121647_T01	GRMZM2G121647	1:234674143-234676023	orf113-b	Q6R9B3	Putative uncharacterized protein orf113-b
GRMZM2G346839_T01	GRMZM2G346839	10:119779162-119781368	Zm.32438	K7TTJ0	Class IV heat shock protein
GRMZM2G002805_T01	GRMZM2G002805	5:2378612-2379912		A0A096PR12	ZFP16-2
GRMZM5G889299_T01	GRMZM5G889299	Mt:60823-63559	orf911	Q6R9M2	DNA polymerase
GRMZM2G038874_T01	GRMZM2G038874	5:142084360-142085001		A0A096QEHO	
GRMZM2G408158_T01	GRMZM2G408158	2:235244889-235246909		A0A096TMG0	
GRMZM5G894376_T01	GRMZM5G894376	Mt:42602-43923	Zm.56987	A0A096UI66	
TCONS_00133655	-	7:152905365-152906515			
GRMZM2G109848_T01	GRMZM2G109848	9:73859764-73867242	Zm.104389	K7VDZ6	Uncharacterized protein
GRMZM2G112204_T01	GRMZM2G112204	4:156797614-156800204	orf105-e	Q6R991	Putative uncharacterized protein orf105-e

CUFF.50121.2	GRMZM2G173090	9:59460404-59463579			
GRMZM2G316362_T01	GRMZM2G316362	8:164731499-164733879	cl27608_1	B6UI69	Acyl-desaturase
GRMZM2G069427_T01	GRMZM2G069427	1:234624109-234627012	rps7	Q6R9A4	Ribosomal protein S7
TCONS_00160768	-	Mt:516412-522509			
CUFF.39771.1	GRMZM2G039886	6:164577125-164579770			
GRMZM2G131356_T01	GRMZM2G131356	9:58946595-58947117	orf100-a2	Q6R9I2	Putative uncharacterized protein orf100-a1
GRMZM5G892983_T01	GRMZM5G892983	Mt:24645-25498		A0A096UHZ7	
GRMZM2G358236_T02	GRMZM2G358236	9:88199900-88204568	orf127	K7VAH0	Uncharacterized protein
GRMZM5G863003_T01	GRMZM5G863003	Mt:129508-132560	orf101-b	Q6R9J7	Putative uncharacterized protein orf101-b
GRMZM2G069126_T01	GRMZM2G069126	7:141170322-141171382	Zm.128370	A0A096QZY0	DRE-binding protein 3
GRMZM2G123394_T01	GRMZM2G123394	8:166704449-166706350	Zm.96220	K7VNA8	Uncharacterized protein
GRMZM2G361210_T01	GRMZM2G361210	1:293235243-293236062		A0A096TEH9	
TCONS_00160685	GRMZM5G860062	Mt:35401-42546			
TCONS_00089497	GRMZM5G808292	5:2297967-2299182			
GRMZM5G853409_T01	GRMZM5G853409	Mt:10293-19143	orf248	Q6R9N6	Putative uncharacterized protein orf248-1
TCONS_00107289	-	5:187905975-187906515			
TCONS_00054003	-	2:169271610-169272228			
GRMZM2G406378_T01	GRMZM2G406378	9:88181437-88190176	Zm.86052	K7WA97	Uncharacterized protein
TCONS_00160774	-	Mt:31145-32680			
TCONS_00082434	GRMZM2G054687	4:111703647-111709421			
GRMZM2G466044_T01	GRMZM2G466044	5:191270860-191272390	EREB195	A0A060D1N6	
GRMZM5G844030_T01	GRMZM5G844030	Mt:511893-514104	orf101-c	Q6R989	Putative uncharacterized protein orf101-c
GRMZM2G414660_T01	PSBZ	5:210341356-210343220	psbZ	A0A096TNQ7	Photosystem II reaction center protein Z
GRMZM2G051135_T01	GRMZM2G051135	9:89114023-89115991	MBF1.1	C0P5I3	multiprotein bridging factor 1C
GRMZM2G147014_T01	GRMZM2G147014	5:193902114-193903647	LOC100281087	B4G1H1	Uncharacterized protein
GRMZM2G420883_T01	GRMZM2G420883	6:121259760-121260572		B6SJC9	Uncharacterized protein
GRMZM2G312736_T01	GRMZM2G312736	9:11258329-11260990		K7W5H8	Uncharacterized protein
GRMZM2G335242_T01	GRMZM2G335242	9:958552-959393	Zm.43625	K7VQ98	Class I heat shock protein 3
GRMZM2G002465_T01	GRMZM2G002465	7:99117054-99117825		A0A096PQV6	
GRMZM2G003489_T02	GRMZM2G003489	1:275535938-275540729	Zm.41316	A0A096PRI9	
GRMZM2G070172_T01	GRMZM2G070172	1:199664721-199666709	LOC100383492	C0PGE4	Alpha-amylase
GRMZM2G028745_T01	GRMZM2G028745	9:69065822-69067377		K7W9F1	Uncharacterized protein
GRMZM2G123212_T01	GRMZM2G123212	2:214233002-214246971	LOC100285280	A0A096S0H2	Ubiquitin-protein ligase CIP8

GRMZM2G413897_T01	GRMZM2G413897	3:20595876-20596906	LOC100285576	B6U6V5	16.9 kDa class I heat shock protein 2
GRMZM2G475482_T01	GRMZM2G475482	2:78506174-78510637	nad4L	A0A096UCH1	NADH dehydrogenase subunit 4L
GRMZM2G047274_T01	GRMZM2G047274	3:188387407-188390357	LOC100274565	A0A096QK58	Uncharacterized protein
GRMZM2G440125_T01	GRMZM2G440125	8:169838571-169839463	Zm.129176	K7V7T0	Putative RING zinc finger domain superfamily protein
TCONS_00070521	-	3:20711464-20713837			
GRMZM2G156536_T01	GRMZM2G156536	9:73950691-73953545	cox3	K7VHL6	Cytochrome c oxidase subunit 3
CUFF.19920.1	GRMZM5G871631	3:88933531-88935083			
GRMZM2G093951_T01	GRMZM2G093951	1:228726211-228727736	LOC100383182	A0A096RGD0	Uncharacterized protein
GRMZM2G155911_T01	GRMZM2G155911	7:151226733-151228790	LOC100282080	A0A096SM43	Anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase
GRMZM2G144997_T01	GRMZM2G144997	1:52759071-52760172	Zm.87000	A0A096SEL9	
GRMZM2G118172_T01	GRMZM2G118172	1:256856446-256857275	LOC100281024	A0A096RXD6	VQ motif family protein
GRMZM2G306679_T01	GRMZM2G306679	1:38851740-38852691	LOC100191552	B4F976	17.4 kDa class I heat shock protein 3
GRMZM2G076972_T01	GRMZM2G076972	9:19814065-19816047	LOC100279109	B6SMA2	Uncharacterized protein
GRMZM2G329325_T01	GRMZM2G329325	8:163979113-163980578	LOC100216684	B4FJ85	RHOMBOID-like protein 13
GRMZM2G097135_T01	GRMZM2G097135	4:21340389-21344213	Orphan301	K7TSD8	Putative IQ calmodulin-binding and BAG domain containing family protein, Orphans TF
GRMZM2G097900_T01	GRMZM2G097900	8:12990940-12993622	si606063b10	K7UU06	Calmodulin protein 2, touch-induced
GRMZM2G139786_T01	GRMZM2G139786	3:127533188-127534038		A0A096SB10	
GRMZM5G841343_T02	GRMZM5G841343	6:146227309-146229515	Zm.72685	A0A096UB52	Uncharacterized protein
TCONS_00160245	-	9:116918173-116918571			
GRMZM2G331701_T01	GRMZM2G331701	2:46596632-46597624	Zm.124713	C0P8J4	Uncharacterized protein
GRMZM2G311898_T01	GRMZM2G311898	8:69273805-69274643	LOC100281023	B6SRE9	Grx_I1-glutaredoxin subgroup III
GRMZM5G864784_T01	GRMZM5G864784	4:136066810-136071047	Zm.162683	K7U5Y1	Uncharacterized protein
GRMZM2G364208_T01	GRMZM2G364208	6:166138946-166140014		A0A096TF42	Uncharacterized protein
GRMZM2G324248_T01	GRMZM2G324248	9:94152457-94153254	LOC100274790	B6SJ91	Uncharacterized protein
GRMZM2G079638_T01	GRMZM2G079638	8:34394596-34395869	LOC100303795	B4FTF5	Anther-specific protein SF18
GRMZM2G340807_T01	GRMZM2G340807	6:142752578-142753820	LOC100857006	B6TSM3	Polcalcin Jun o 2
GRMZM2G322817_T01	GRMZM2G322817	2:14233284-14235255	Zm.7612	B6SKM0	Putative uncharacterized protein
GRMZM2G094510_T01	GRMZM2G094510	9:19666683-19667362	LOC100278059	B6U3H7	Uncharacterized protein
GRMZM2G105987_T01	GRMZM2G105987	5:25048331-25050001	Zm.126244	B6STF5	NHL25
TCONS_00147067	-	8:37789512-37790733			
GRMZM2G479260_T01	GRMZM2G479260	9:140609821-140618002	TIDP2749	B4FT59	Class I heat shock protein 3
TCONS_00134908	-	8:24341948-24346387			
GRMZM2G012455_T01	GRMZM2G012455	9:132472464-132473507	LOC100383105	C0PD31	Uncharacterized protein

GRMZM2G017685_T01	GRMZM2G017685	9:111499766-111500584	LOC100278230	K7VC13	Uncharacterized protein
TCONS_00087370	-	4:22125315-22127452			
GRMZM2G051943_T01	GRMZM2G051943	2:34135514-34163980	LOC100303798	B4F5S6	Endochitinase A
GRMZM5G897562_T01	GRMZM5G897562	9:73813633-73815548	orf111-a	Q6R9G4	Putative uncharacterized protein orf111-a
AC209810.3_FGT002	AC209810.3_FG002	3:165488280-165489387	cl903_-1	A0A096PLC4	Uncharacterized protein
GRMZM2G015605_T01	GRMZM2G015605	10:87281298-87285057		C0HIJ6	NaCl stress protein1
GRMZM2G044322_T01	GRMZM2G044322	2:43586314-43588479	LOC100274454	B4G145	Uncharacterized protein
GRMZM2G314328_T01	GRMZM2G314328	1:234782350-234793861	ccmFN	A0A096T6F7	Cytochrome c biogenesis FN
GRMZM2G167794_T01	GRMZM2G167794	3:118083628-118085345	AUX35	B4FD48	Auxin-responsive protein
GRMZM2G083810_T01	GRMZM2G083810	3:8883717-8888747	hsp18f	B4F9K4	17.5 kDa class II heat shock protein
GRMZM6G441368_T01	GRMZM6G441368	scaffold_6:0-905	LOC100281265	A0A096UJ72	F-box domain containing protein
GRMZM2G050234_T01	GRMZM2G050234	2:15139061-15141708		A0A096QM14	Uncharacterized protein
GRMZM2G317426_T01	GRMZM2G317426	6:131104189-131111067	Zm.30680	A0A096T708	Uncharacterized protein
GRMZM2G164909_T01	GRMZM2G164909	1:197781322-197783002	Zm.123378	A0A096ST16	Heat shock factor protein 7
GRMZM2G128617_T01	GRMZM2G128617	1:275707160-275708384		A0A096S460	
GRMZM2G034157_T01	GRMZM2G034157	8:21619664-21623594		C4J494	17.8 kDa class II heat shock protein
GRMZM2G339327_T01	GRMZM2G339327	4:207365370-207366135		B6SR64	Uncharacterized protein
GRMZM2G301485_T01	GRMZM2G301485	10:137124243-137126235	Zm.3810	K7U5Y9	Uncharacterized protein
GRMZM2G098167_T01	GRMZM2G098167	5:212297571-212298668	LOC100191598	B4F9E8	Uncharacterized protein
GRMZM2G377613_T01	GRMZM2G377613	6:164344858-164346675	LOC100286364	B6UIG9	Tumor protein-like protein
TCONS_00160700	GRMZM5G800457	Mt:89463-98789			
GRMZM2G128754_T01	GRMZM2G128754	9:87108538-87109653		K7WA69	Uncharacterized protein
GRMZM2G099376_T01	GRMZM2G099376	4:171808112-171810486	ATPP2-B1	B6SI79	ATPP2-B1
GRMZM2G125092_T01	GRMZM2G125092	3:36063906-36064506	Zm.151461	A0A096S1S7	
GRMZM2G431309_T01	GRMZM2G431309	2:208500827-208504903	GRAS75	C0P6K9	GRAS transcription factor
AC206951.3_FGT017	AC206951.3_FG017	1:17525571-17526492	EREB182	C0PJT2	AP2-EREBP transcription factor
GRMZM5G803308_T01	GRMZM5G803308	9:97396757-97399472	LOC100304070	B6TWW8	MYB transcription factor TaMYB1
GRMZM2G049349_T01	GRMZM2G049349	1:272284843-272287578	Zm.18185	A0A096QLJ5	Peptidase, M50 family
GRMZM2G055652_T01	GRMZM2G055652	8:100777638-100781664	Zm.103513	B6SNY4	Uncharacterized protein
GRMZM2G333635_T01	GRMZM2G333635	8:13046491-13047248	LOC100282367	K7VA55	Class I heat shock protein 1
GRMZM2G157806_T01	GRMZM2G157806	1:243542254-243543339	Zm.35420	B6UIB8	TPD1
GRMZM2G308503_T01	GRMZM2G308503	7:122955818-122957540	Zm.32750	B6SIQ9	Putative uncharacterized protein
GRMZM2G082362_T01	GRMZM2G082362	8:161737468-161739614	LOC100382311	C0P6E0	Uncharacterized protein

GRMZM2G149647_T01	GRMZM2G149647	1:33464146-33466694	HSP26	Q41815	Heat shock protein 26
GRMZM2G061626_T01	GRMZM2G061626	1:293231710-293232742	Zm.129189	A0A096QUX7	ZFP16-2
GRMZM2G323888_T01	GRMZM2G323888	6:128648129-128649852	Zm.10417	A0A096T862	Uncharacterized protein
CUFF.6752.3	GRMZM2G042133	1:265088865-265219536			
GRMZM2G098875_T02	GRMZM2G098875	9:144554989-144558045	LOC100381655	C0HHT5	Glutamate decarboxylase
GRMZM2G098999_T01	GRMZM2G098999	8:65295816-65300239	Zm.28206	K7VD56	Uncharacterized protein
TCONS_00135340	GRMZM2G123842	8:52357444-52373948			
TCONS_00136194	-	8:84017908-84020147			

Las proteínas ribosomales, detectadas como diferenciales en los tres perfiles transcriptómicos de MON810, son proteínas estructurales del ribosoma, implicadas directamente en la traducción de proteínas. Se ha descrito que estas proteínas tendrían un papel muy versátil en el desarrollo de las plantas (Romani *et al.* 2012). Los transposones son secuencias de DNA que tienen la capacidad de moverse desde diferentes partes del genoma y pueden producir copias de sí mismos. Los transposones son los elementos mayoritarios en los genomas eucariotas y particularmente en plantas y pueden llegar a representar hasta el 80% del genoma del maíz (McClintock, 1950; Fedoroff, 2012). Estos elementos tienen interacciones con el genoma y pueden contribuir a la regulación de la expresión de genes en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Makarevitch *et al.* 2015) y su expresión es muy variable (Li *et al.* 2015). Por tanto, la obtención de transposones diferenciales en diferentes variedades de maíz cultivado en campo es un resultado esperable. Cabe notar que el lugar de inserción del transgén en MON810 está flanqueado, en 5', por una secuencia LTR correspondiente a un retrotransposón del tipo Zeon-1 (Hernández *et al.*, 2003; La Paz *et al.*, 2010) que no es el mismo que se encontró desregulado en las tres variedades de maíz MON810. Por otro lado, la secuencia 3', corresponde a una ubiquitin ligasa (Hernández *et al.*, 2003; Rosati *et al.*, 2008), con lo que se evidencia una reorganización génica en la inserción.

Las diferencias particulares entre las variedades MON810 y sus respectivos controles *near-isogenic* pueden explicarse por los programas de mejora de las variedades híbridas de maíz disponibles comercialmente específicos de las empresas de semillas. Estos programas de mejora utilizan variedades convencionales de interés para cruzarlas con las variedades que contienen el transgén; como se ha comentado (ver apartado “El maíz MON81036” en la p.36) las empresas no revelan la relación genética exacta entre las variedades MG y sus *near-isogenic*. Esto implica la existencia de diferencias genéticas entre las variedades transgénicas y sus respectivas *near-isogenic* adicionales al transgén, que corresponden a partes del genoma de otras variedades convencionales utilizadas en la obtención de las variedades MG comerciales, no necesariamente ligadas al transgén, sino que pueden situarse en cualquier cromosoma. En consecuencia, la relación genética de los pares de variedades obtenidos por cada obtentor es diferente. Los cambios transcriptómicos detectados en las variedades MON810 deberían conservarse entre las diferentes variedades, independientemente del fondo genético o las condiciones de cultivos, si fueran una consecuencia directa de la inserción del transgén. En el presente estudio, 3 de las 4 IDE no se encontraron desregulados en el mismo sentido en los tres pares de variedades MG respecto a sus *near-isogenic*, ni tampoco se comportaron igual en los dos años de cultivo analizados (Tabla 7). En consecuencia, estos cambios no pueden atribuirse directamente a la inserción génica.

Tabla 7. Valores de expresión diferencial (tasa de cambio entre MON810 y *near-isogenic*) de los 4 transcritos diferenciales comunes en las 3 variedades MON810 analizadas.

67mg_12	48mg_12	48mg_13	Locus	Transcrito Id	Nombre del gen
-2,58	-3,86	3,76	1:234624109-234627012	GRMZM2G069427_T01	<i>rps7 (ribosomal protein S7)</i>
-2,44	-1,87	1,44	9:88199900-88204568	GRMZM2G358236_T02	<i>rps12 (ribosomal protein S12)</i>
-1,67	-3,10	2,17	9:116918173-116918571	TCONS_00160245	<i>transposable element</i>
-1,57	-2,93	-4,22	8:24341948-24346387	TCONS_00134908	<i>transposable element</i>

Asimismo, se consideró importante situar los niveles de expresión de las IDE en el marco de la variabilidad natural de la especie maíz, para determinar la relevancia biológica de las diferencias observadas. Los niveles de expresión de estos 4 transcritos en las 7 muestras analizadas, correspondientes a variedades

convencionales, mostraron rangos de expresión muy variables y con valores mucho más extremos en algunas variedades convencionales que en las variedades MG (Figura 21). Así, los niveles de expresión de estos transcritos se sitúan, en las variedades MON810 analizadas, en los niveles naturales del maíz, lo que descarta su relevancia desde el punto de vista de seguridad. Esto es especialmente relevante en el caso de la única isoforma comúnmente desregulada, TCONS_00134908, lo que indica, que el transgén no parece tener efectos pleiotrópico sobre el transcriptoma de maíz.

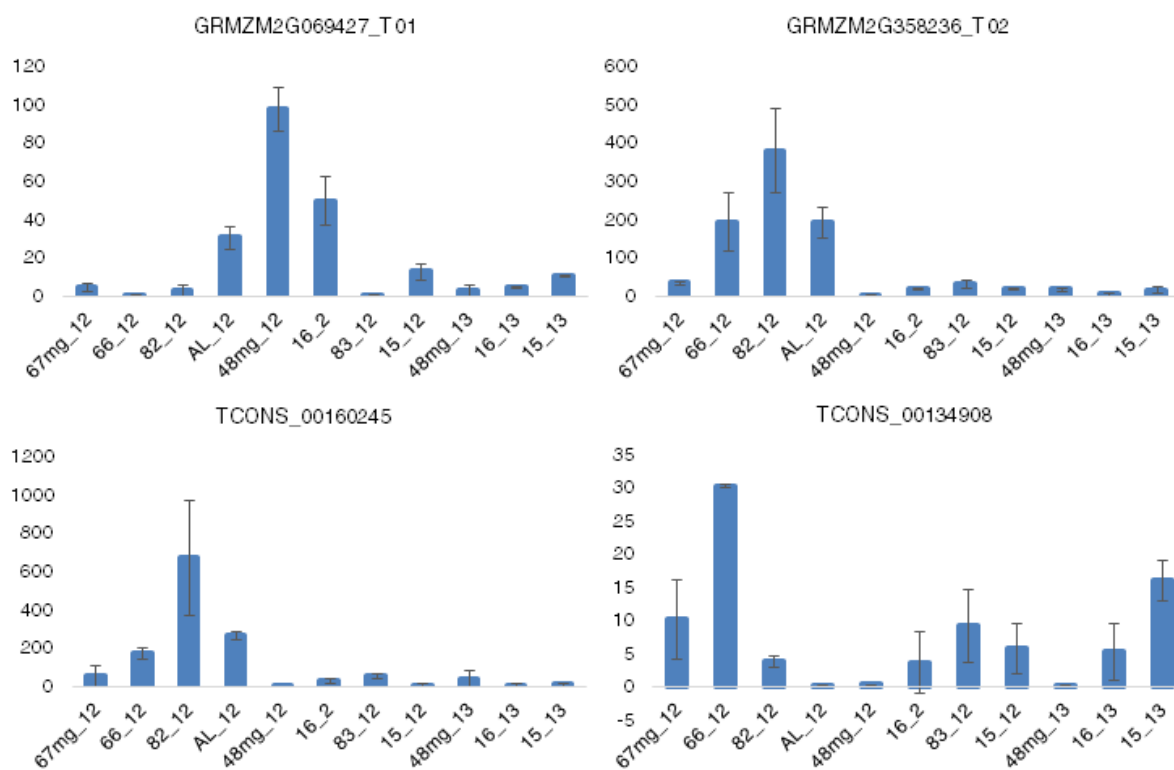


Figura 21. Niveles de expresión de los IDE comunes en las tres muestras de maíz MON810, respecto a sus *near-isogenic*, ensayadas.

Análisis funcional de los genes diferenciales en embrión de maíz MON810

Los transcritos diferenciales en los embriones de las variedades de maíz MON810 se analizaron a nivel funcional para identificar posibles rutas celulares modificadas como consecuencia de la inserción del transgén. Para ello primero se realizó un mapa de interacción proteína-proteína con el programa String v 10 (*Functional Protein Association Network*; www.string-db.org) en base a la lista de isoformas diferenciales de cada variedad MG (Figura 22 - Figura 24).

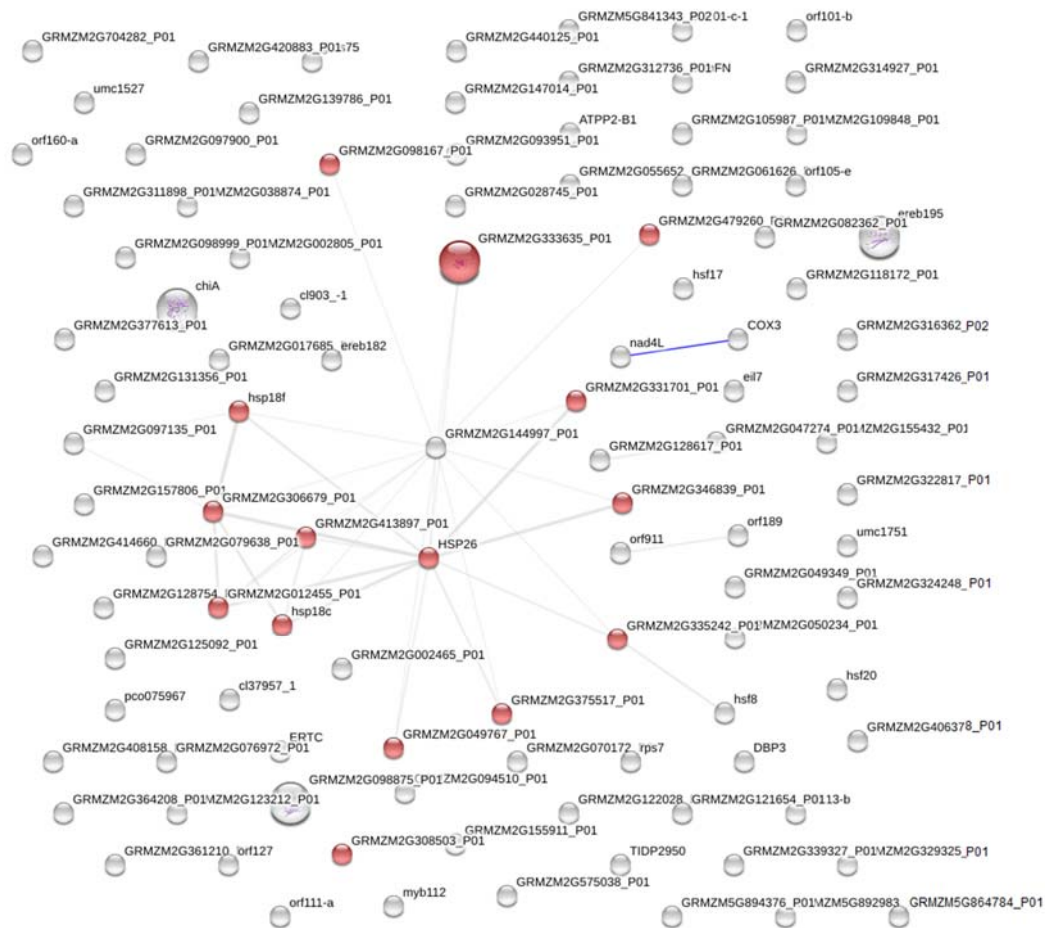


Figura 22. Mapa de interacción de los transcritos diferenciales en los embriones de maíz 67mg_12 versus 66_12. [Nodos pequeños: no se conoce la estructura 3D de la proteína; nodos grandes: estructura 3D conocida o predicha. La interacción molecular se muestra en azul y representa unión física de las proteínas. Los nodos rojos representan las HSP].

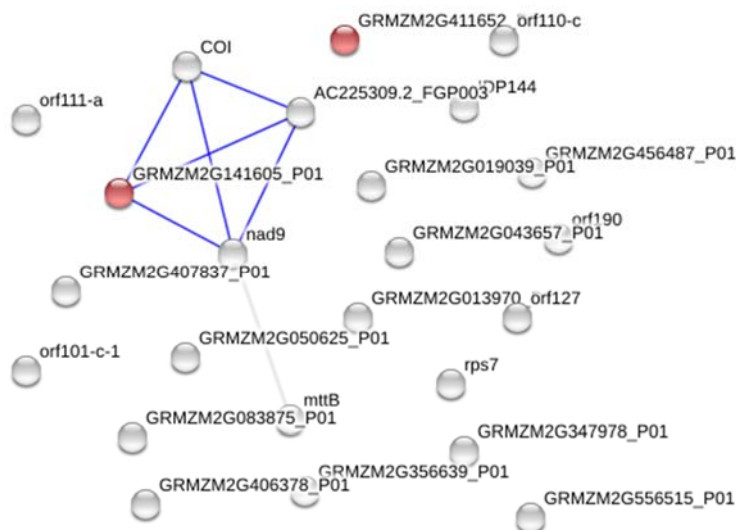


Figura 23. Mapa de interacción de los transcritos diferenciales en los embriones de maíz 48mg_12 versus 16_12. [Nodos pequeños: no se conoce la estructura 3D de la proteína; nodos grandes: estructura 3D conocida o predicha. La interacción molecular se muestra en azul y representa unión física de las proteínas. Los nodos rojos representan las oxidoreductasas NADH:ubiquinona].

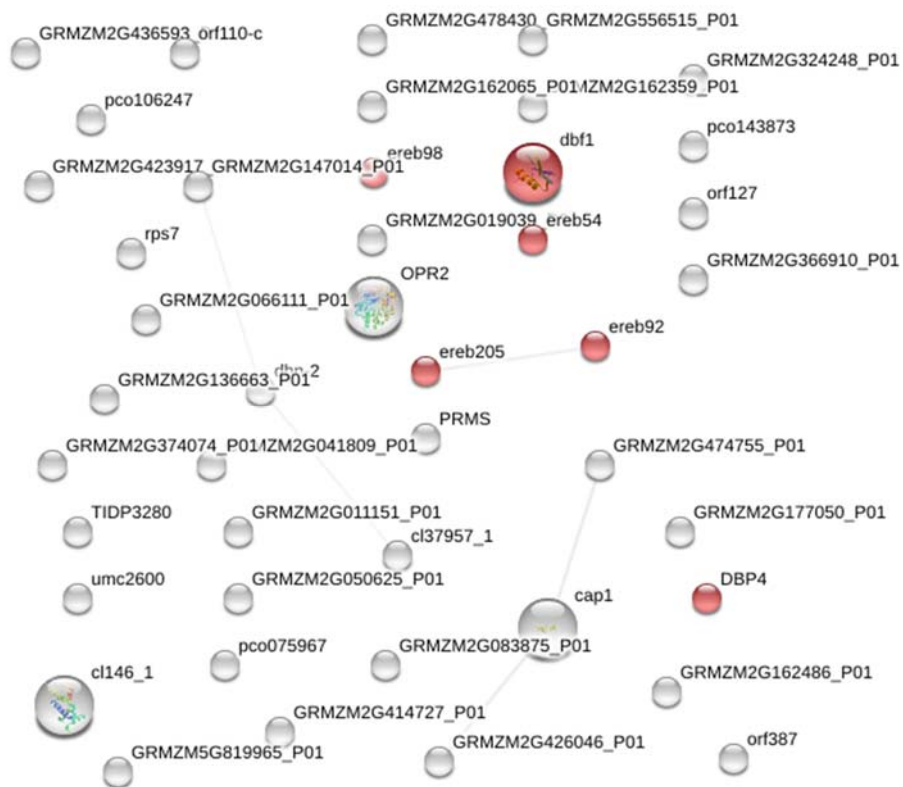


Figura 24. Mapa de interacción de los transcritos diferenciales en los embriones de maíz 48mg_13 versus 16_13. [Nodos pequeños: no se conoce la estructura 3D de la proteína; nodos grandes: estructura 3D conocida o predicha. Los nodos rojos representan las proteínas con dominios AP2/ERF].

Como se puede ver en las Figura 22 a Figura 24, la mayoría de proteínas codificadas por las isoformas diferenciales formaron unidades aisladas y no estuvieron interconectadas entre ellas lo que indicaba que no formaban parte de una ruta metabólica concreta. Esto se comprobó mediante un análisis de categorías funcionales sobrerrepresentadas usando criterios de significancia de p valor ajustado por FDR ($q < 0,05$). No se detectó un enriquecimiento ni de los procesos biológicos, componentes celulares ni rutas celulares de la clasificación de GO (*Gene Ontology*, Ashburner *et al.* 2000) ni de KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Kanehisa y Goto, 2000)). Posteriormente, y para detectar algún posible patrón común entre las IDE se realizó una clasificación funcional de las proteínas codificadas por las mismas. En ninguna de las variedades se pudieron detectar rutas alteradas significativamente, aunque sí se pudieron detectar enriquecimientos de dominios proteicos específicos mediante InterPro v 57 ($q < 0,05$).

En los transcriptomas de 67mg_12 se dio una represión predominante de proteínas del tipo HSP (*Heat Shock Protein*) (Tabla 8). Las HSP se producen durante el desarrollo de la semilla y en diferentes condiciones de estrés; la síntesis de las HSP durante la maduración de la semilla podría indicar su papel protector celular (Wu *et al.*, 2015). En la variedad 48mg_12 se detectaron niveles reprimidos de proteínas del tipo NADH deshidrogenasas respecto a la 16_12. Estas proteínas están implicadas en transporte de electrones y por tanto en el balance oxidorreductor. El complejo NADH ubiquinona, por ejemplo, cataliza la transferencia de electrones de especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de la respiración mitocondrial (uniprot.org). Finalmente, la expresión de factores de transcripción relacionados con la respuesta a etileno (AP2/ERF) se vio reprimida en 48mg_13 vs 16_13. El etileno es una hormona que

regula la expresión de genes relacionados con estreses bióticos y abióticos, cuya inducción por etileno depende del factor de transcripción en cis *Ethylene-Responsive Element* (ERE) (Du *et al.*, 2014).

Tabla 8. Rutas celulares (KEGG) y dominios funcionales (InterPro) sobrerrepresentados en los transcriptoma de 67mg_12, 48mg_12 y 48mg_13.

	Id. INTERPRO	Descripción de la ruta	Nº genes	q valor
67mg_12 vs 66_12 (Monsanto 2012)	IPR031107	<i>Small heat shock protein HSP20</i>	15	0,0000
	IPR002068	<i>Alpha crystallin/Hsp20 domain</i>	14	0,0000
	IPR008978	<i>HSP20-like chaperone</i>	14	0,0000
48mg_12 vs 16_12	IPR001694	<i>NADH:ubiquinone oxidoreductase</i>	2	0,0062
48mg_13 vs 16_13 (Pioneer 2013)	IPR001471	<i>AP2/ERF domain</i>	5	0,0001
	IPR016177	<i>DNA-binding domain</i>	5	0,0001
	IPR000167	<i>Dehydrin</i>	2	0,0001
	IPR030513	<i>Dehydrin, conserved site</i>	2	0,0001

En resumen, en los tres pares de variedades se dio un enriquecimiento de transcritos correspondientes a proteínas relacionadas con estrés y respuestas ambientales. Sin embargo, en ningún caso los transcritos diferenciales, ni las proteínas que codifican, estuvieron conservados en las tres variedades indicando que en este estudio no se pudieron detectar diferencias transcripcionales significativas provocadas por la inserción del transgén. Estos resultados están en línea a los trabajos previamente publicados sobre los perfiles transcriptómicos del maíz MON810 (Coll *et al.*, 2008, 2009, 2010; Barros *et al.*, 2010; La Paz *et al.*, 2014), aunque en estos casos la aproximación analítica (hibridación en *microarrays*, secuenciación masiva utilizando 454-Roche) permitió el análisis de un número inferior de transcritos. Además, en algunos casos el tejido analizado fue hoja de planta joven, lo que extiende el resultado aquí obtenido a otras variedades, condiciones culturales y tejidos.

1.2 Proteómica comparativa en semilla de maíz MON810

En este capítulo se presenta una comparación de los perfiles proteómicos de grano maduro y seco de maíz MON810 respecto a granos convencionales no MG, realizada mediante proteómica bidimensional (2D) comparativa. Igual que en la transcriptómica de maíz, se escogió el grano de maíz maduro y seco debido a su importancia en la elaboración de piensos y alimentos. La identificación de las proteínas de los geles 2D se realiza mediante espectrometría de masas LC-MS/MS. Esta técnica permite investigar diferencias cualitativas y cuantitativas en las proteínas mayoritarias de diferentes genotipos de especies vegetales, tejidos o en respuesta a determinadas condiciones ambientales (Amiour *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2014; Louis *et al.*, 2014). En este trabajo se ha evaluado la proteómica bidimensional comparativa para detectar posibles efectos no intencionados derivados de la inserción del transgén *cry1A(b)* en el maíz MON810. Adicionalmente se testó la proteómica 2D en dos aproximaciones diferentes. Primero se investigó la capacidad de la técnica para discriminar maíz no seguro para el consumo. Para ello se realizó el análisis proteómico en muestras de maíz no aptas para la alimentación humana, ya que presentaban una contaminación de micotoxinas considerada de riesgo para la salud. Segundo, se evaluó la proteómica para detectar posibles cambios en perfiles proteómicos de variedades cisgénicas, y por tanto genéticamente exactas a excepción del cisgén. Para ello se obtuvieron los perfiles proteómicos 2D de tubérculos de patata de una patata cisgénica (A01 A) resistente a *Phytophthora infestans*, comparada con su respectiva línea isogénica. Por tanto, esta técnica podría ser una herramienta adicional muy informativa en la evaluación de riesgos de los OMG (Barros *et al.*, 2010; Coll *et al.* 2011; Fonseca *et al.* 2012; Vidal *et al.* 2015).

Diseño experimental

Se obtuvieron los perfiles proteómicos de muestras de grano de maíz de un total de 16 variedades que incluyeron las dos parejas de variedades MG y *near-isogenic* desarrolladas por Monsanto Dekalb y Pioneer Hi-Bred. También se incluyeron diversas variedades comerciales convencionales con el fin de analizar la variabilidad natural de esta especie. Finalmente, y para estudiar la posible influencia de las condiciones ambientales sobre los efectos no intencionados de la modificación genética, se testaron las mismas variedades cultivadas en dos años consecutivos (2012 y 2013), en los que se registraron características meteorológicas muy diferentes; con la excepción de las variedades convencionales 83_12 y 17_12 que solo estuvieron disponibles para cultivar en el año 2012. La relación de todas las variedades ensayadas se presenta en la Tabla 9. Todas estas variedades también fueron analizadas mediante RNA-Seq en el

primer capítulo de resultados de esta tesis doctoral, y como ya se ha señalado, fueron la base para la elaboración de piensos en los estudios de toxicidad a 90 días y 1 año en ratas.

Tabla 9. Tabla de las variedades de maíz ensayadas en el análisis proteómico comparativo.

Variedad	Tipo	Año cultivo	Código	Empresa
DKC6667	MG	2012	67mg_12	Monsanto Dekalb
		2013	67mg_13	
DKC6666	<i>near-isogenic</i>	2012	66_12	Monsanto Dekalb
		2013	66_13	
PR33D48	MG	2012	48mg_12	Pioneer Hi-Bred
		2013	48mg_13	
PR32T16	<i>near-isogenic</i>	2012	16_12	Pioneer Hi-Bred
		2013	16_13	
SYNEPAL	convencional	2012	AL_12	Koipesol Semillas
		2013	AL_13	
DKC6815	convencional	2012	15_12	Monsanto Dekalb
		2013	15_13	
PR33W82	convencional	2012	82_12	Pioneer Hi-Bred
		2013	82_13	
PR32T83	convencional	2012	83_12	Pioneer Hi-Bred
DKC6717	convencional	2012	17_12	Monsanto Dekalb

Un elevado número de *spots* bien resueltos en los geles 2D asegura unos perfiles proteicos muy informativos. Para ello es fundamental conseguir extractos proteicos de calidad y cantidad suficiente. Las semillas de maíz presentan elevados contenidos en almidón y aceites que dificultan el proceso de extracción de proteínas. Por esto se optimizó el protocolo de extracción basado en la precipitación con TCA y acetona, consiguiendo extraer más de 5 µg/µL de proteína y que, junto a la tinción con sales de plata, permitió resolver hasta 1.411 *spots* por gel 2D. Los perfiles proteómicos bidimensionales se obtuvieron resolviendo el extracto proteico mediante IEF (separación según el punto isoeléctrico, pI) y SDS-PAGE (resolución según el peso molecular, PM) en geles de 18x20 cm.

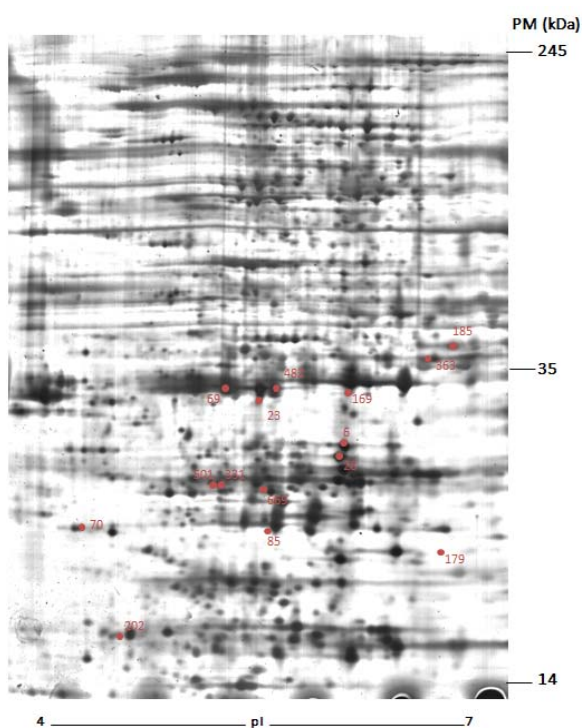


Figura 25. Gel 2D representativo del proteoma de semilla seca de maíz. Este gel corresponde a un replicado de la variedad 15_12, en el que se detectaron 1.411 *spots*. Se indican, en números rojos, los *spots* que mostraron volúmenes diferentes en las variedades MON810 respecto a las *near-isogenic* control ($FC \geq 2$ y $FDR q < 0,05$) y fueron identificados por LC-MS/MS.

Para cada variedad y año de cultivo se realizaron dos extracciones proteicas independientes y se hicieron dos geles IEF-SDS-PAGE para cada extracción (en total se obtuvieron cuatro replicados técnicos por variedad). Los geles se tñieron en sales de plata para detectar las proteínas, y los *spots* se analizaron utilizando el programa Ludesi (Malmo, Sweden, www.ludesi.com). La Figura 25 muestra un ejemplo de un perfil proteico 2D representativo de semilla de maíz. Se obtuvieron, de promedio en todas las variedades, 1.383 *spots* por gel (Tabla 10), enfocados en un rango de pI de 4 a 7 y de PM de 11 a 245 kDa. Para explorar la variabilidad técnica se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre el número de *spots* detectados en los replicados técnicos de los geles. En todos los casos la correlación entre los replicados fue mayor que el 80% (no se muestran los datos) indicando una adecuada reproducibilidad de la técnica en el laboratorio de ensayo. Los perfiles de las diferentes muestras resultaron muy comparables entre ellos, con coeficientes de correlación altos y siempre positivos ($R > 0,77$) (Figura 26 A). Los *spots* detectados en los geles bidimensionales representan las especies proteicas más abundantes en las semillas de maíz, que pueden obtenerse mediante el protocolo de extracción y tinción seleccionado. La cuantificación de la abundancia de las proteínas se basa en la medida del volumen de cada *spot*, que depende de la intensidad de la tinción en el mismo, que a su vez es proporcional al nivel de acumulación de la proteína correspondiente.

Tabla 10. Número de *spots* cuantificados en los geles IEF-SDS-PAGE en cada muestra de maíz analizada. El número de *spots* se ha calculado como una media de los cuatro geles replicados. [DE: desviación estándar].

Variedad	Número de spots (Promedio)
67mg_12	1408 ± 6
67mg_13	1386 ± 27
66_12	1387 ± 50
66_13	1370 ± 27
48mg_12	1389 ± 45
48mg_13	1399 ± 18
16_12	1331 ± 51
16_13	1394 ± 31
AL_12	1396 ± 18
AL_13	1354 ± 45
15_12	1411 ± 3
15_13	1395 ± 19
82_12	1409 ± 2
82_13	1324 ± 75
83_12	1405 ± 11
17_12	1373 ± 13

Un total de 1.253 *spots* se seleccionaron para el análisis comparativo. Éstos fueron consistentemente bien resueltos en todos los replicados técnicos y biológicos (detectados como mínimo en una variedad), y distribuidos uniformemente sobre el gel (representando todo el rango de pI y PM). El programa Ludesi de análisis de geles bidimensionales normaliza los volúmenes de los *spots* entre los diferentes geles para que sean comparables entre ellos. El volumen de cada *spot* en cada variedad y año de cultivo se calculó como la media de los valores obtenidos en los 4 replicados correspondientes.

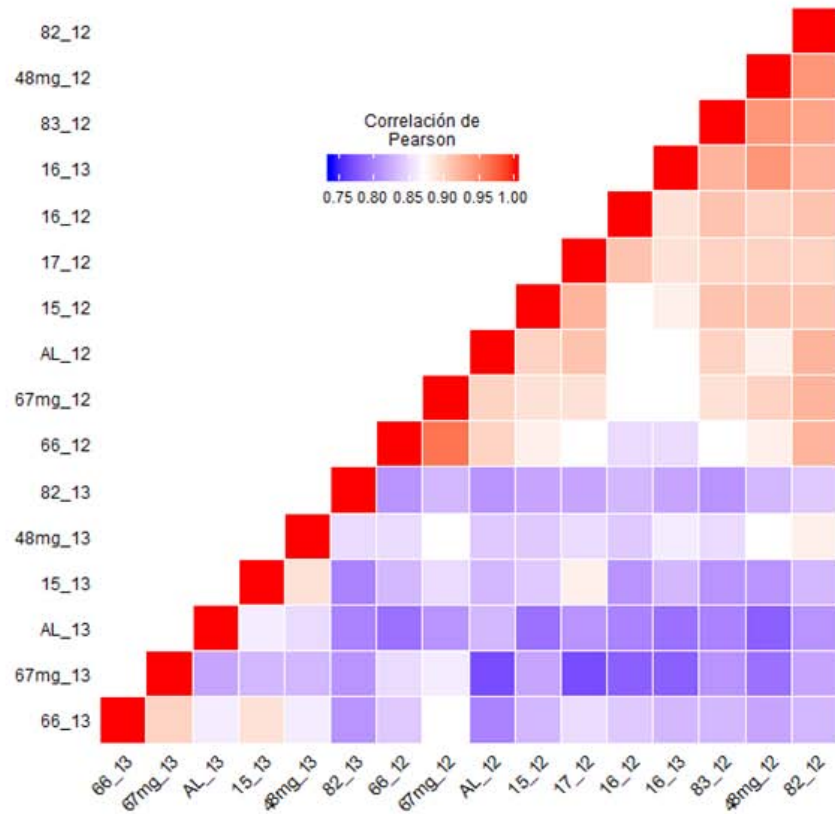
Variabilidad general de los perfiles proteómicos en grano de maíz

Inicialmente se exploró la variabilidad global de los perfiles proteómicos de las diferentes variedades de maíz en los dos años de cultivo analizados. Para ello se calculó una matriz de correlación, a través del coeficiente de Pearson (R), para todas las variedades estudiadas. La Figura 26 A muestra las correlaciones entre cada par de variedades, ordenadas según su similitud. Las elevadas correlaciones observadas entre todas las muestras analizadas ($>0,77$) indicaron una marcada similitud entre todos los perfiles proteómicos obtenidos. Las mayores diferencias se observaron entre variedades cultivadas en años diferentes, lo que muestra que las condiciones ambientales tienen una mayor influencia sobre el proteoma del grano de maíz que los otros parámetros ensayados (el carácter transgénico y el fondo genético). Además, las variedades cultivadas en 2012 presentaron una similitud entre ellas ligeramente superior ($R>0,85$) que las mismas variedades cultivadas en 2013 ($R>0,75$). Ello podría atribuirse a las condiciones climatológicas más homogéneas durante el año 2012 y las condiciones más extremas durante el 2013. A mitades de julio del 2013, en plena polinización del maíz, una tormenta de granizo con fuertes vientos, afectó a las plantaciones muy localmente, produciendo un impacto diferente en los campos geográficamente muy cercanos.

La Figura 26 B también muestra la relación entre los proteomas de todas las variedades analizadas, visualizado a través de un dendrograma y un clúster jerárquico calculado por el método Ward y por la distancia euclídea. El dendrograma representa muy claramente una categorización de las muestras en función del año de cultivo, con una única excepción: la variedad 16_13, se agrupa con las variedades del 2012. Dicha variedad fue una de las más afectadas por el ya mencionado temporal.

Se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) de los valores de los volúmenes de los *spots* transformados a su logaritmo natural, para determinar qué porcentaje de la varianza entre los proteomas podría explicarse por las distintas condiciones ambientales (años de siembra), genotipos (programa de mejora) o por la modificación genética. Las cuatro primeras componentes del análisis PCA fueron significativas, y conjuntamente explicaron el 50% de la varianza total. El PC1, que explicó el 20% de la varianza, clasificó las muestras en función del año de cultivo, excepto la variedad 16_13 (Figura 27 A, B, C). Este resultado confirmó lo que ya se había mostrado en la Figura 26 B.

A



B

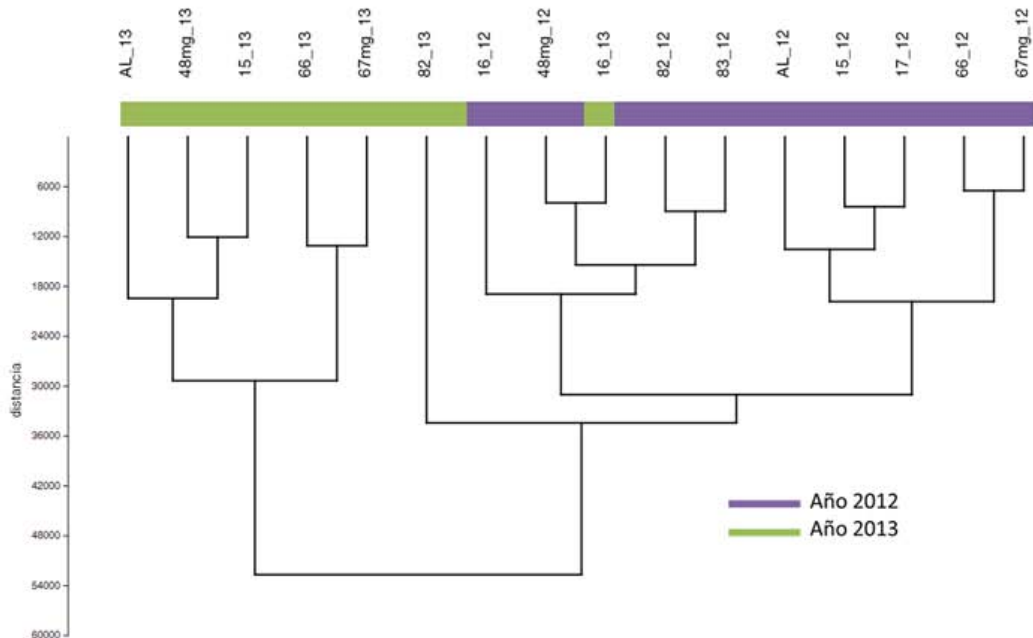


Figura 26. Relación entre los proteomas 2D de las semillas de distintas variedades de maíz, cultivadas en dos años consecutivos. A) Matriz de correlación de los volúmenes de los spots en todas las variedades de maíz, comparadas por pares. El color azul indica correlaciones menores ($R > 0,75$), y el rojo las mayores ($R = 1$). B) Dendrograma y clúster jerárquico de las variedades y años de cultivo ensayadas, agrupadas según el volumen global de los spots. Se han categorizado las variedades según el año de cultivo en el clúster jerárquico: las cultivadas en el 2012 se representan en violeta, y las del 2013 en verde.

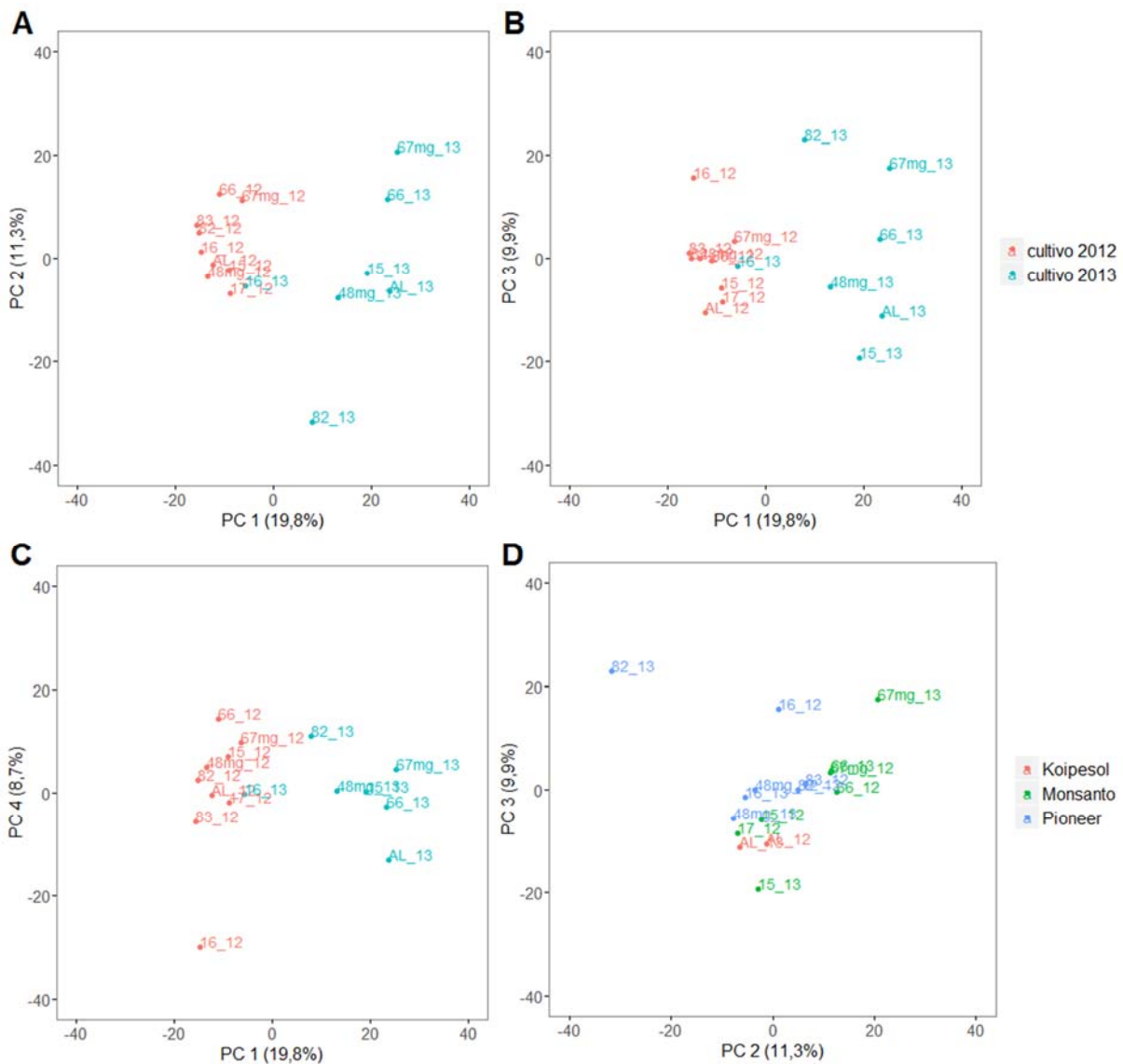


Figura 27. Análisis de componentes principales (PCA) de los proteomas de semilla de maíz de 16 muestras correspondientes a 8 variedades, cultivadas en 2 años diferentes. A) PC1 respecto a PC2, B) PC1 respecto a PC3, C) PC1 respecto a PC4 y D) PC2 respecto a PC3. En A), B) y C) las variedades sembradas en 2012 se muestran en rojo y las sembradas en 2013, en azul. En D) las variedades producidas por diferentes empresas obtentoras se muestran en diferente color: rojo (Koipesol Semillas), azul (Monsanto Dekalb) y verde (Pioneer Hi-Bred).

Posteriormente, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para todas las variedades, incluyendo los 1.253 *spots* como variables. Este análisis, que complementó la visualización del PCA, permitió investigar la importancia de los distintos factores: año de cultivo (Año), empresa obtentora o fondo genético (Empresa) y presencia del transgén (MG) para explicar la variabilidad de los perfiles proteicos de las semillas de maíz (Tabla 11). En concordancia con los resultados mostrados en el PCA, el año de cultivo resultó ser el factor más significativo ($p < 0,0005$); y la empresa productora, correspondiente al fondo genético también tendría una cierta influencia sobre el proteoma ($p < 0,02$). La presencia de la modificación genética (factor MG) no es un factor significativo que explique la variabilidad de los perfiles proteicos, según el análisis ANOVA.

Tabla 11. Tabla ANOVA de los perfiles proteómicos de 16 muestras de grano de maíz correspondientes a 8 variedades cultivadas en 2 años consecutivos. MG: MON810 o convencional; Año: cultivadas en 2012 o en 2013; Empresa: variedades producidas por Koipesol Semillas, Monsanto Dekalb o Pioneer Hi-Bred. [GI: grados de libertad, valor F: estadístico de Fisher; Pr (>F), valor p de significancia. Códigos de significancia: 0****; 0,001****; 0,01***; 0,05**; 0,1*]

Factor	GI	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	valor F	Pr(>F)	Significancia
MG	1,0	1802852,8	1802852,8	2,0	0,2	
Empresa	2,0	7058146,0	3529073,0	3,8	0,0	*
Año	1,0	10541800,5	10541800,5	11,4	0,0	***

Tanto las matrices de correlación, como el clúster jerárquico y el análisis PCA de estos proteomas permitieron observar que, de forma inequívoca, las variedades MG se posicionaron muy próximas a sus respectivas *near-isogenic*, cuando se cultivaron en las mismas condiciones ambientales (Figura 26 y Figura 27). Esto se mantuvo en las variedades DKC6667 y DKC6666, producidas por Monsanto y cultivadas tanto en 2012 como en 2013; y las PR32D48 y PR33T16, producidas por Pioneer Hi-Bred y cultivadas en 2012. El par PR33T16 y PR32D48 se cultivó en 2013 en dos campos cercanos, que no obstante sufrieron con muy distinta intensidad una tormenta de granizo durante el período de polinización. Estas condiciones ambientales podrían haber provocado cambios fenotípicos concretos en estas variedades que presumiblemente explicarían las diferencias proteómicas observadas. En conjunto, los resultados sobre la variabilidad global de los proteomas de maíz indicaron que las condiciones ambientales, y el fondo genético (genotipo) particular de cada variedad, tienen un impacto mayor en el proteoma del grano de maíz maduro que la propia inserción génica del evento MON810.

Todas las variedades de maíz se cultivaron en la misma zona, en l'Empordà. En esta zona de cultivo el suelo es muy homogéneo, del tipo xenoflúvico oxiáquico, limosos y calcáreo (Zeljenková *et al.* 2014; Zeljenková *et al.* 2016). Además, el maíz fue cultivado siguiendo las mismas prácticas agrícolas controladas y estándares de la zona: misma fertilización de N, P, K; mismo tratamiento de herbicida (solo en caso de necesidad), no se aplicó insecticida, y misma densidad de siembra. Teniendo en cuenta el hecho de que las condiciones agrícolas fueron constantes, se podría concluir que las condiciones climatológicas y no las de cultivo, fueron las principales responsables de causar cambios en los perfiles proteómicos en las semillas secas del maíz.

Proteínas diferenciales en las semillas de maíz MON810

Los resultados anteriores sugirieron que no existen diferencias importantes a nivel cuantitativo entre las variedades de maíz MON810 y sus respectivas variedades comparadoras no MG. No obstante, esta aproximación proteómica permitió identificar las diferencias concretas entre los pares de variedades y evaluar su posible impacto sobre la seguridad alimentaria del material MG. En este estudio se trabajó con cuatro comparativas directas MG versus *near-isogenic*: las variedades producidas por Monsanto y Pioneer cultivadas en 2012 y 2013.

Así pues, se compararon los volúmenes de cada uno de los *spots* de los perfiles proteicos MG y *near-isogenic*, mediante un test t de Student. Se estableció un valor de significancia de tasa de cambio logarítmica $|\log_2(FC)| > 1$ y q valor $< 0,05$. Con estas condiciones, se detectaron 3 y 9 *spots* diferencialmente acumulados entre los granos MON810 y *near-isogenic* de Pioneer obtenidos en 2012 y 2013, respectivamente; y 4 *spots* en los granos obtenidos de Monsanto cultivados en 2013. Este último par de

variedades no presentó ningún *spot* diferencial cuando se sembró en 2012 (Figura 28). Las diferencias encontradas representaron como máximo el 0,72% del total de *spots* analizados. Como ya se ha explicado, los cambios proteómicos ocurridos como consecuencia directa del transgén deberían conservarse entre los distintos pares de variedades analizados, independientemente del fondo genético o las condiciones de cultivo.

La tasa de cambio logarítmica varió entre 1 y 3 en la mayoría de *spots* diferencialmente acumulados (Tabla 12). Se observaron tres *spots* muy sobreacumulados en las variedades MON810 (*spot* id: 23, 85, 179) y uno muy reprimido (*spot* id 70); sin embargo, ninguno de estos *spots* fue común en el resto de variedades comparadas. En las 4 comparaciones realizadas en este trabajo, sólo se detectó un *spot* acumulado en el mismo sentido en 2 de las 4 parejas analizadas: el *spot* número 501 fue sobreacumulado en la variedad MON810 de Pioneer cultivada en el 2012 (48mg_12) y en la de Monsanto cultivada en el 2013 (67mg_13) (Figura 28). Así pues, no se detectó ningún *spot* comúnmente regulado en las 4 comparativas que pudiera ser candidato a ser regulado de forma directa por el transgén. No obstante, se consideró relevante proceder a la identificación de los 15 *spots* diferenciales mediante LC-MS/MS (Tabla 12).

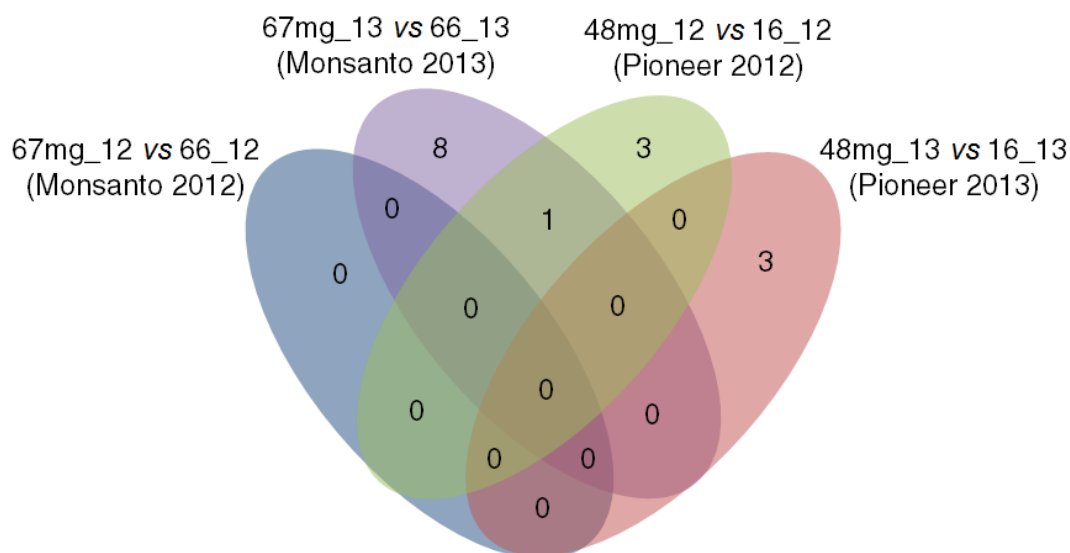


Figura 28. Diagramas de Venn del número de *spots* diferencialmente acumulados en grano maduro y seco de maíz MON810 de diferentes variedades y años de cultivo, respecto a sus controles *near-isogenic*.

Los péptidos obtenidos por LC-MS/MS se analizaron mediante el software *Thermo Proteome Discover* v 1.4.1.14 (Thermo Scientific), contra la base de datos de plantas de UniProt. Se filtraron los resultados con identificación en maíz (*Zea mays*) y con una puntuación (*score*) mayor. Las descripciones, funciones y ontología de las proteínas se extrajeron de la base de datos de UniProt (uniprot.org), KEGG (genome.jp/kegg) y EnsemblPlants (plants.ensembl.org/index.html). En caso de obtener una proteína no caracterizada se realizó un BLAST contra maíz para encontrar proteínas homólogas en otras especies (caso de los *spots* 6, 28 y 202). Las proteínas identificadas no fueron suficientes para realizar un análisis de enriquecimiento de los procesos biológicos, componentes celulares ni rutas celulares de la clasificación de GO (*Gene Ontology*, Ashburner *et al.* 2000) ni de KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Kanehisa y Goto 2000)).

Tabla 12. Identificación por LC-MS/MS de los *spots* diferenciales en las comparaciones directas de grano de maíz MON810 y convencional *near-isogenic*, cultivados en las mismas condiciones ambientales. Los *spots* diferenciales de cada comparativa se ordenan según el FC. Se indica el código de cada *spot* diferencial (*Spot #*), la tasa de cambio logarítmica (FC (*fold-change*): MON810/*near-isogenic*) del volumen de los *spots* comparados; el sentido de la tasa de cambio ↓: represión en MON810; ↑: acumulación en MON810), el código de acceso de la proteína identificada (*Accession #*); y el nombre, función, peso molecular (PM en kDa) y punto isoeléctrico (pI) de la misma.

Comparativa	Spot	log2(FC)	Sentido	Accession#	Nombre de la proteína	Función	PM (kDa)	pI
67mg_13 vs 66_13 (Monsanto 2013)	70	-2,82	↓	B4FL17	<i>TCTP</i>	<i>microtubule stabilization</i>	18,72	4,67
	669	1,24	↑	B6SNS4	<i>LEA D-34</i>	<i>unknown</i>	21,17	5,44
	6	1,26	↑	K7W272	<i>Globulin-1, S allele</i>	<i>nutrient reservoir</i>	71,09	6,73
	331	1,31	↑	B6SNS4	<i>LEA D-34</i>	<i>unknown</i>	21,17	5,44
	482	1,48	↑	B6UH67	<i>LEA D-34</i>	<i>unknown</i>	27,16	5,57
	28	1,55	↑	K7W272	<i>Globulin-1, S allele</i>	<i>nutrient reservoir</i>	71,09	6,73
	69	1,60	↑	B6UH67	<i>LEA D-34</i>	<i>unknown</i>	27,16	5,57
	501	1,62	↑	B6SNS4	<i>LEA D-34</i>	<i>unknown</i>	21,17	5,44
	23	3,43	↑	B6UH67	<i>LEA D-34</i>	<i>unknown</i>	27,16	5,57
48mg_12 vs 16_12 (Pioneer 2013)	185	-1,63	↓	Q7M1Z8	<i>Globulin-2</i>	<i>nutrient reservoir</i>	49,89	6,61
	202	1,61	↑	C0PGM3	<i>Globulin-1, S allele</i>	<i>nutrient reservoir</i>	64,86	6,86
	85	9,75	↑	B6T8D8	<i>Glyoxalase I</i>	<i>lactoylglutathione lyase</i>	21,07	5,63
	169	1,06	↑	C0PK05	<i>Glyoxalase I</i>	<i>lactoylglutathione lyase</i>	32,32	6,19
48mg_13 vs 16_13 (Pioneer 2013)	501	1,08	↑	B6SNS4	<i>LEA D-34</i>	<i>unknown</i>	21,17	5,44
	363	1,55	↑	B4FLJ4	<i>rRNA N-glycosidase</i>	<i>rRNA N-glycosylase</i>	33,25	6,43
	179	3,98	↑	B6TXB5	<i>22.0 kDa class IV HSP</i>	<i>stress response</i>	22,87	6,43

Los *spots* seleccionados para la identificación mostraron acumulación significativamente diferencial en al menos una de las cuatro parejas de MON810 y su correspondiente *near-isogenic*. Los 15 *spots* diferenciales identificados correspondieron a 7 proteínas. El hecho de que diferentes *spots* correspondan a la misma proteína es habitual en este tipo de análisis ya que las proteínas suelen sufrir modificaciones postraduccionales (fosforilaciones, metilaciones, etc.), dando lugar a isoformas de una misma proteína con diferente peso molecular y carga eléctrica. Tampoco se debe destacar el procesamiento o la degradación parcial de algunas proteínas, algo muy común en proteínas de reserva y del tipo LEA en semillas de gramíneas. Las 7 proteínas identificadas incluyen LEAs (*Late Embryogenesis Abundant*), proteínas de reserva, proteínas de estrés, HSP (*Heat Shock Proteins*) y enzimas. Todas estas proteínas son características del endospermo o del embrión de maíz; y son muy abundantes en grano maduro y seco.

La variedad MON810 de Pioneer cultivada en 2012 y en 2013 presentó 3 y 4 *spots* diferenciales, respectivamente, respecto a las variedades *near-isogenic* cultivadas en los mismos años. Las proteínas identificadas que mostraron acumulación diferencial en el año 2012, correspondieron a proteínas con función de reserva de nutrientes (globulinas) y a una glioxalasa. En el año 2013 se obtuvieron proteínas HSP, una proteína inactivadora de ribosomas, una LEA y otra glioxalasa.

El par de variedades MON810 y *near-isogenic* comercializado por Monsanto y cultivado en el año 2012 no presentó ninguna diferencia significativa en el análisis proteómico 2D, tal y como pudo intuirse por la proximidad de estas dos variedades en el PCA (Figura 27). Las mismas variedades crecidas en el año 2013 mostraron 9 *spots* diferenciales, que corresponden solamente a 4 códigos proteicos (*Accession#*) diferentes y codifican para proteínas del tipo LEA, TCTP (*Translationally-controlled tumor protein*) y globulinas.

Las globulinas, junto a las glutelinas y prolaminas, constituyen el grupo principal de proteínas de reserva en las semillas, ya que suponen el aporte de nitrógeno necesario para la germinación. Este tipo de proteínas pueden llegar a representar hasta un 12% del peso seco de las semillas secas en cereales; y se hallan predominantemente en el endospermo (Lee *et al.*, 2015). Las globulinas tienen función de reserva de nutrientes, participan en la tolerancia a estrés en la semilla, concretamente durante la progresiva desecación de la semilla en etapas tardías del desarrollo (Méchin *et al.* 2004; Huang *et al.*, 2012). La globulina 1, componente principal del grupo de las globulinas, se sobreacumuló en las variedades 48mg_12 y 67mg_13, pero no en 48mg_13 ni 67mg_12. La globulina 1 está codificada por el gen polimórfico *Glb1* para el que se han descrito varios alelos (*Glb1-S*, *Glb1-L*, *Glb1-0*) (Belanger y Kriz, 1991). La isoforma de la globulina 1 identificada corresponde al alelo S (*spots* 6, 28 y 202) que está más acumulado en las variedades producidas por Koipesol y Monsanto que en las de Pioneer (teniendo en cuenta las MG, *near-isogenic* y convencionales) (Figura 29). Esto podría sugerir que durante el proceso de mejora de las variedades híbridas se habrían seleccionado las líneas a favor de este alelo. La globulina 2 tuvo una expresión muy reprimida en la variedad 48mg_12 y no fue diferencial en las restantes comparaciones. No se observó, pues, un patrón de regulación de las globulinas directamente vinculado a la inserción de MON810. Las globulinas suelen sufrir procesamientos proteolíticos importantes que son visibles en el proteoma bidimensional, y es muy probable que las diferencias encontradas en estas proteínas se debieran en realidad a la identificación por LC-MS/MS de distintos fragmentos proteolíticos de las mismas.

Las glioxalinas identificadas se sobreacumulaban en la variedad PR33D48 respecto a su línea comparadora convencional *near-isogenic* PR32T16, cultivadas en 2012 y 2013. Las glioxalinas juegan un papel fundamental en la degradación del metilglioxal celular, que es un producto tóxico derivado del metabolismo secundario. En las plantas, este sistema está sobreacumulado en diferentes condiciones de estrés como defensa o respuesta a infecciones por patógenos. A pesar de su importancia, estas proteínas han sido poco estudiadas (Chen *et al.* 2004). En condiciones de cultivo de campos de agricultor, como los del presente estudio, no puede esperarse una completa homogeneidad de los factores ambientales que podrían causar la inducción de este tipo de proteínas relacionadas con estrés.

Las proteínas LEA se sobreacumulaban en las dos variedades MON810 crecidas en el 2013, respecto a sus *near-isogenic*; pero no en el 2012. En general, las LEA se acumulan naturalmente en los tejidos tolerantes a la desecación, como las semillas o los granos de polen, aunque también se expresan en tejidos vegetativos en condiciones de estreses abióticos. Estas proteínas pueden llegar a representar hasta un 4% del total de las proteínas de semilla de maíz, siendo universalmente abundantes en plantas superiores tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas (Roberts *et al.*, 1993). Aunque se asume que estas proteínas tienen un papel importante para la tolerancia al estrés hídrico, su función molecular aún es desconocida. Además estas proteínas pueden fosforilarse, lo que implica que se pueden encontrar en diferentes cargas eléctricas en el proteoma 2D (Irar *et al.*, 2006). Como son proteínas muy abundantes y que pueden sufrir procesamientos postraduccionales, explicaría por qué la mitad de los *spots* secuenciados en este trabajo, que presentaban distintos PM y pl en los geles, han resultado ser distintas formas de LEA. Las LEA identificadas correspondientes a los *spots* 331, 501, 669 tienen menor peso

molecular teórico (21,17 kDa) que los *spots* 23, 69, 482 (27,16 kDa) (Tabla 12) lo cual podría indicar que son diferentes estados de procesamiento de la misma proteína.

El resto de proteínas identificadas únicamente mostraron expresión diferencial en una de las cuatro comparaciones MON810 respecto a *near-isogenic* realizadas. Las rRNA N-glicosilasas son proteínas inactivadoras de ribosomas, RIP (*Ribosome-inactivating protein*), inhiben los ribosomas y por tanto el proceso de síntesis proteica. Las RIP de plantas son un componente natural de los mecanismos de defensa frente a infecciones víricas o bacterianas (Bass *et al.* 2004), situaciones que en condiciones de cultivo en campo no son controlables entre muestras. Las *small heat shock proteins* (sHSPs) se producen durante el desarrollo de la semilla y en diferentes condiciones de estrés. Estas proteínas forman estructuras multiméricas y tienen un amplio abanico de funciones celulares. La síntesis de las HSP durante la maduración de la semilla podría indicar su papel protector celular (Wu *et al.*, 2015). La proteína TCTP es una proteína de unión a calcio que juega funciones importantes como protección a estrés o apoptosis, crecimiento celular y progresión del ciclo celular. Aunque esta proteína está muy estudiada en animales, en plantas su función específica es desconocida. Recientemente, se ha demostrado que la TCTP en *Arabidopsis* interactúa con componentes celulares inhibiendo los mecanismos de progresión de muerte celular. Los niveles de esta proteína pueden verse alterados en diferentes condiciones de estrés como frío, salinidad, sequía, o infección por patógenos (Hoepflinger *et al.*, 2013).

Para evaluar la relevancia biológica de las proteínas estadísticamente significativas entre variedades MON810 y controles convencionales se comparó el volumen de cada uno de los *spots* diferenciales en las variedades MON810 y todas las variedades comerciales de maíz convencional analizadas, que incluyeron las variedades *near-isogenic* y otras 5 con genotipos distantes obtenidas por Monsanto, Pioneer y Koipesol Semillas, sembradas en las dos temporadas estudiadas (Figura 29).

Es importante, desde un punto de vista de seguridad alimentaria, controlar los niveles de alérgenos o antinutrientes en los alimentos o piensos. Se ha descrito, por ejemplo, que las globulinas y las glioxalinas son alérgenos potenciales en maíz (Fonseca *et al.* 2012) y arroz (Usui *et al.* 2001). En el presente análisis, ninguna de las proteínas diferenciales entre el maíz MON810 versus *near-isogenic* resultó tener una acumulación diferencial en relación al resto de variedades convencionales, lo que indicó que todas las proteínas analizadas en los granos de maíz MON810 se encontraron en el rango de la variabilidad natural de esta especie. Considerando, además, que ninguno de los *spots* mostró un patrón diferencial en las tres comparaciones entre variedades MG y los controles, estos resultados indicaron que ninguno de los cerca de 1.400 *spots* que representan las proteínas más abundantes en grano de maíz, sufrió diferencias debidas a la modificación genética en el maíz MON810.

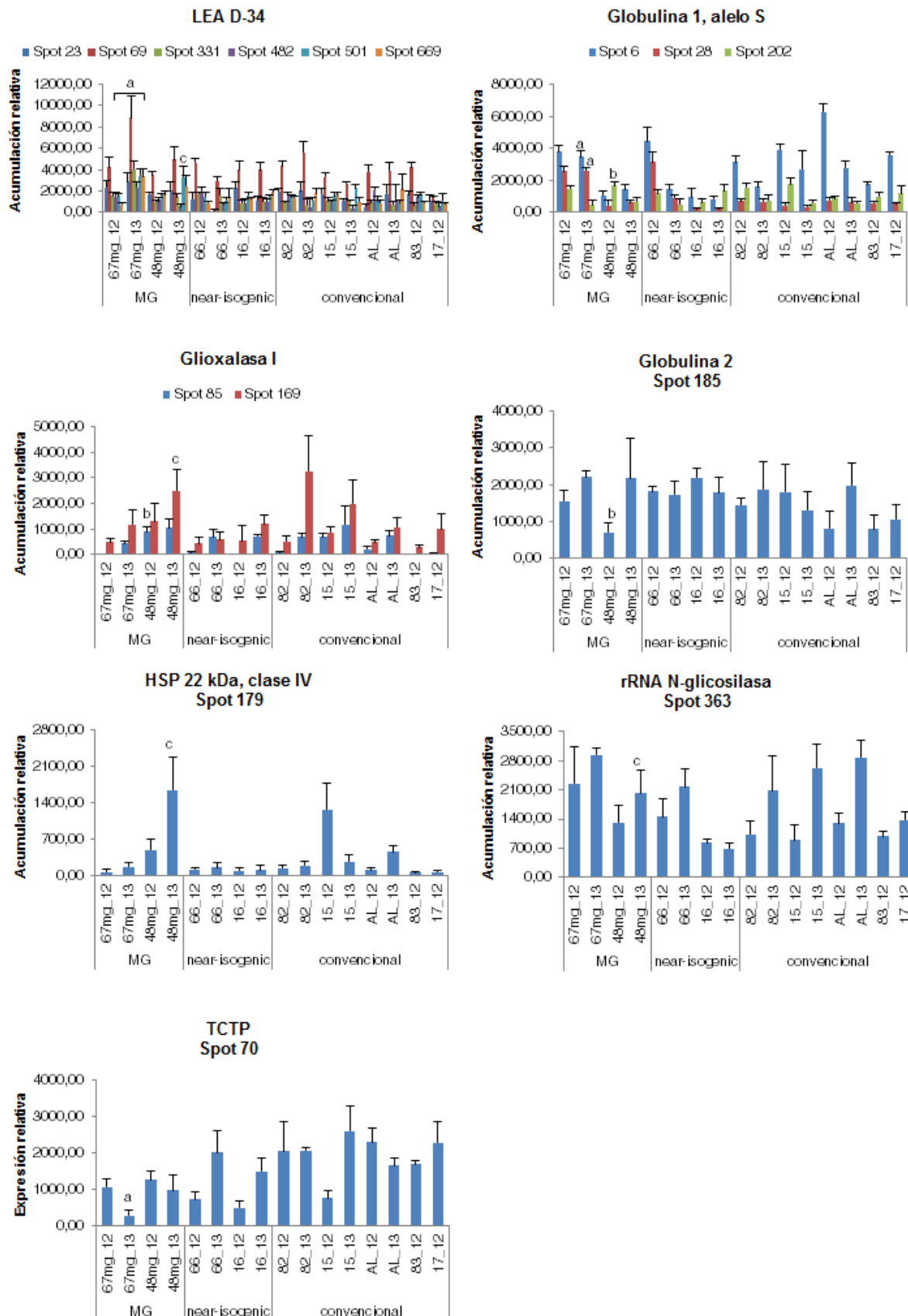


Figura 29. Niveles de expresión relativa de las proteínas diferencialmente acumuladas en las variedades MON810 respecto a las variedades convencionales *near-isogenic*, cultivados en las mismas condiciones ambientales. Para cada proteína identificada, se muestra el volumen del *spot* en las variedades MG MON810, las *near-isogenic* y las convencionales analizadas. [a: diferencial en 67mg_13 vs 66_12; b: diferencial en 48mg_12 vs 16_12; c: diferencial en 48mg_13 vs 16_13].

1.3 Proteómica comparativa en muestras de maíz contaminado con micotoxinas

Los proteómica comparativa 2D en grano de maíz MON810 y convencionales no evidenció ninguna diferencia proteica directamente atribuible al carácter MG. En un intento de evaluar la capacidad de la proteómica 2D para detectar muestras perjudiciales desde el punto de vista de seguridad alimentaria se estudiaron unos lotes de granos de maíz de dos de las variedades convencionales incluidas en el estudio anterior, que accidentalmente sufrieron una contaminación fúngica durante el almacenaje. Estas muestras correspondían a las variedades DKC6815 y DKC6717 cultivadas en el año 2012: 15cont_12 y 17cont_12, respectivamente. Los lotes contaminados presentaban abundantes granos de aspecto deteriorado: deformación de la semilla, aspecto mohoso, color negruzco y debilidad del grano.

Tabla 13. Tabla de las variedades de maíz ensayadas en el análisis proteómico comparativo con muestras de maíz contaminadas.

Variedad	Tipo	Código	Empresa
DKC6667	MG	67mg_12	Monsanto Dekalb
DKC6666	<i>near-isogenic</i>	66_12	Monsanto Dekalb
PR33D48	MG	48mg_12	Pioneer Hi-Bred
PR32T16	<i>near-isogenic</i>	16_12	Pioneer Hi-Bred
SYNEPAL	convencional	AL_12	Koipesol Semillas
DKC6815	convencional	15_12	Monsanto Dekalb
PR33W82	convencional	82_12	Pioneer Hi-Bred
PR32T83	convencional	83_12	Pioneer Hi-Bred
DKC6717	convencional	17_12	Monsanto Dekalb
DKC6815	contaminada	15cont_12	Monsanto Dekalb
DKC6717	contaminada	17cont_12	Monsanto Dekalb

Las especies de hongos que colonizan el maíz con mayor frecuencia son *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. Ciertas cepas, y en determinadas condiciones, pueden producir micotoxinas, compuestos resultantes del metabolismo secundario de los hongos que tienen un efecto cancerígeno en animales y humanos. Las principales micotoxinas que pueden contaminar el maíz son fumonisinas (producidas por ciertas cepas de *Fusarium* spp), deoxinivalenol (DON, producido por *Aspergillus* sp) y aflatoxinas, mucho menos frecuentes, pero de potencial carcinógeno más elevado (producidas también por algunas especies de *Fusarium* spp). Se cuantificó el nivel de aflatoxinas, fumonisinas y DON en las variedades contaminadas 15cont_12 y 17cont_12 junto con las demás variedades no contaminadas mediante el método ELISA (Figura 30). Las dos variedades contaminadas presentaron niveles de fumonisinas claramente superiores a los niveles máximos permitidos para productos alimenticios según la normativa de la UE (Reglamento Nº 1881/2006, Comisión Europea): 4 ppm. La muestra de DKC6815 contaminada presentó, además, aflatoxinas por

encima del umbral establecido (10 ppb). Los niveles de DON estuvieron por debajo del límite permitido (1,75 ppm) en todas las variedades. Las muestras no contaminadas presentaron niveles de estas micotoxinas inferiores a estos umbrales.

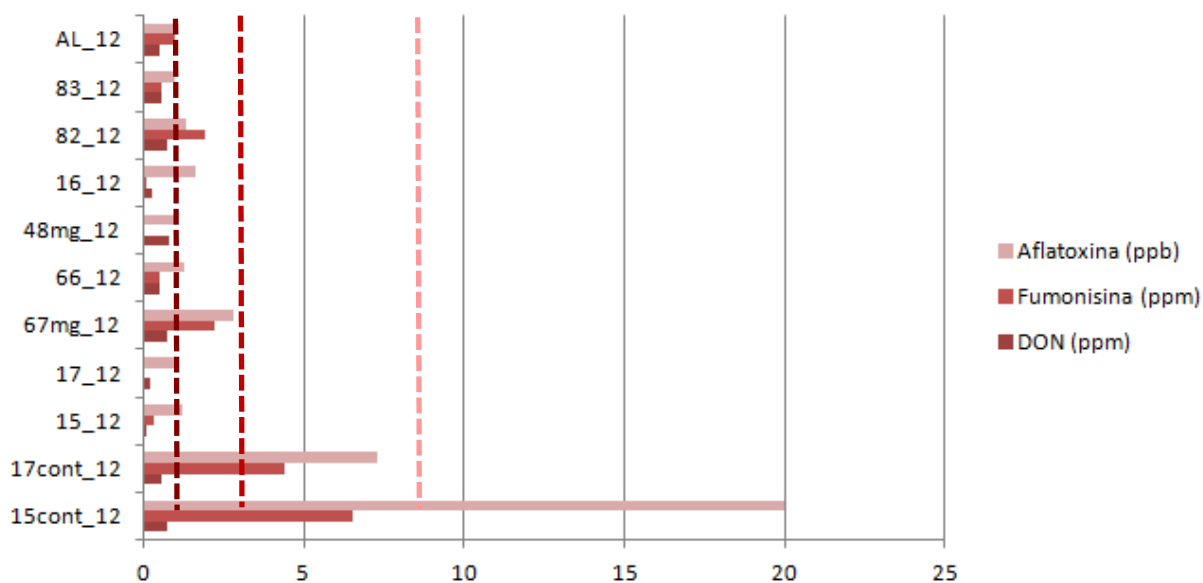


Figura 30. Niveles de aflatoxinas, fumonisinas y DON en 11 muestras de maíz incluyendo 2 muestras contaminadas cultivadas en el año 2012. Las líneas punteadas muestran los correspondientes valores máximos permitidos en productos alimenticios establecidos por la CE para alimentación humana.

Se analizaron los perfiles proteicos de las dos muestras no aptas para el consumo de alimentos, 15cont_12 y 17cont_12, utilizando el mismo protocolo de extracción de proteínas y electroforesis bidimensional IEF-SDS-PAGE que las muestras anteriores. Se resolvieron unos 1.400 *spots* por gel, que se analizaron en paralelo a las 9 variedades cultivadas en el año 2012 estudiadas anteriormente. Se incluyeron, pues, las dos mismas variedades convencionales, no infectadas por hongos (15_12 y 17_12); dos variedades MON810 de diferentes productores (67mg_12 y 48mg_12); sus respectivas *near-isogenic*; y tres variedades comerciales convencionales adicionales (Tabla 13). De esta forma, pudieron compararse un total de 11 muestras de maíz cultivadas en paralelo, en las mismas condiciones ambientales. El análisis estadístico se llevó a cabo siguiendo el mismo esquema que en el capítulo anterior. Primero se exploró la relación general entre los 11 proteomas de maíz mediante correlación entre los volúmenes de cada *spot* en las diferentes muestras, confección de un dendrograma y un clúster jerárquico; y a continuación se realizó un análisis PCA.

Los valores de correlación entre los proteomas de las muestras no aptas para el consumo, respecto a las demás variedades analizadas fueron ligeramente más bajos que en la comparación anterior ($R < 0,75$). En la representación por el dendrograma (Figura 31), se observó que las dos muestras contaminadas por micotoxinas (15cont_12 y 17cont_12) formaron un clúster independiente del resto de muestras aptas para el consumo.

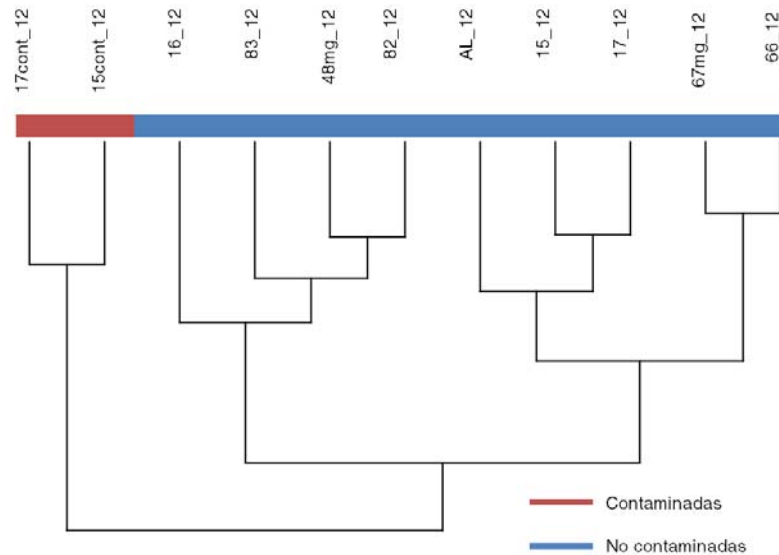


Figura 31. Dendrograma de los perfiles proteómicos de las semillas de maíz cultivadas en el año 2012 incluyendo las variedades infectadas por hongos. Las variedades se categorizaron según la infección fúngica: las no contaminadas se representan azul, y las contaminadas en rojo.

En el análisis PCA, las variedades se distribuyeron según la similitud de sus proteomas. Las 3 primeras componentes explicaron aproximadamente el 50% de la variabilidad entre los perfiles proteómicos de las variedades de maíz contaminadas y las sanas. La primera componente (PC1) explicó el 23% de la variabilidad, la PC2 explicó 14% y la PC3 el 11% (Figura 32). Se completó el análisis con un *k-means clustering* en dos clústeres, utilizando un valor $p < 0,05$ e intervalos de confianza (CI) al 95%. Los perfiles de las variedades no contaminadas formaron un clúster en el que no estaban incluidas las variedades infectadas (Figura 32), lo que corroboró el resultado de la Figura 31. Las muestras no aptas para el consumo presentaron, pues, claras diferencias en el perfil proteómico respecto a las variedades aptas. En el PCA se apreció que las variedades sanas 15_12 y 17_12 se situaron cercanas a las respectivas contaminadas con micotoxinas. Esto es explicable porque tienen exactamente el mismo fondo genético y fueron cultivadas en el mismo campo y bajo las mismas condiciones. Estos resultados mostraron que el análisis proteómico 2D fue capaz de discriminar entre los perfiles proteómicos de granos afectados por la infección fúngica y los no afectados.

Finalmente, se comparó el volumen de cada uno de los *spots* entre los proteomas del grupo de las dos muestras contaminadas respecto a las nueve muestras aptas para el consumo mediante un test t de Student ($FC \geq 2$; $q < 0,05$), a fin de identificar los *spots* individuales con variaciones de volumen estadísticamente relevantes.

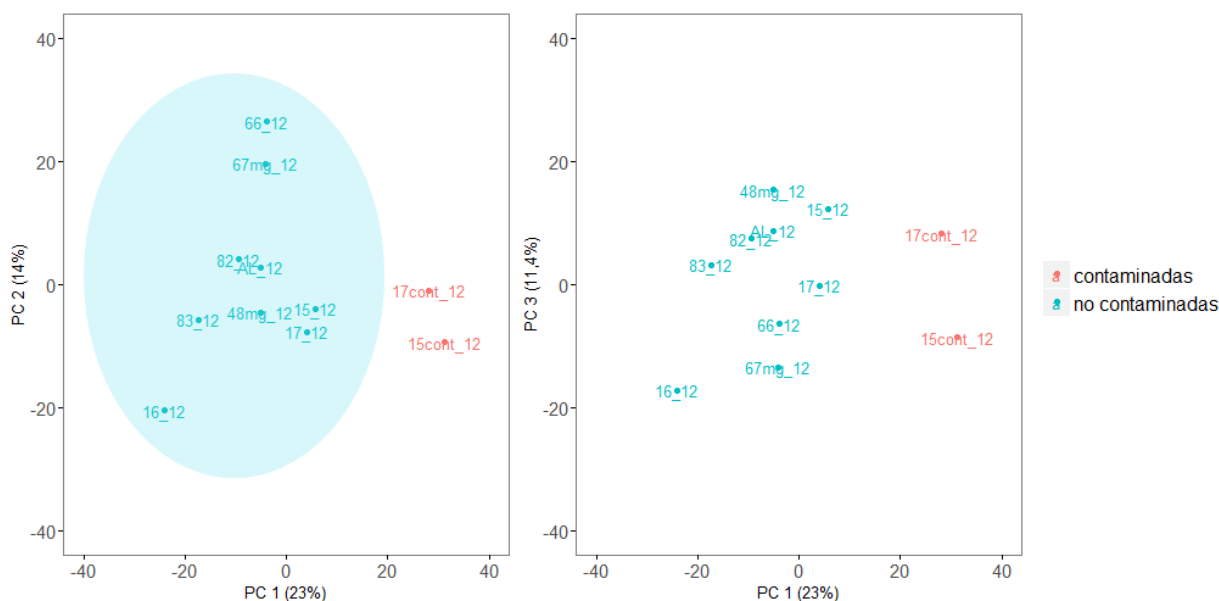


Figura 32. Análisis PCA de los proteomas de semilla de maíz de 2 variedades infectadas con micotoxinas (15cont_12 y 17cont_12, en rojo) y 9 variedades sanas (en azul) cultivadas en el 2012. Se muestran las tres primeras componentes.

Un total de 100 *spots* (8% del total de *spots* analizados) fueron diferenciales en los dos grupos de muestras contaminadas (en el Anexo IV se resumen los valores correspondientes a los 100 *spots* diferenciales). Se secuenciaron 9 de estos *spots*, seleccionados por presentar valores extremos en el conjunto de muestras sanas respecto a las contaminadas. Siete de los nueve *spots* presentaron menor acumulación en los granos contaminados, con $\log_2(\text{FC})$ entre -3 y -1,08; mientras que dos de ellos presentaron mayor acumulación, con $\log_2(\text{FC})$ entre 1 y 4,19. Los mayores cambios de volumen correspondieron al *spot* 215, sobre-acumulado más de 18 veces en grano no contaminado, y al *spot* 501, unas 8 veces sobreacumulado en muestras contaminadas. La Tabla 14. resume las características de estos 9 *spots*, así como de las proteínas correspondientes, según la información de UniProt.

Tabla 14. Identificación por LC-MS/MS de los *spots* diferenciales en las comparaciones directas de grano de maíz contaminado y no contaminado. Los *spots* diferenciales de cada comparativa se ordenan según el FC. Se indica el código de cada *spot* diferencial (*Spot #*), la tasa de cambio (FC (*fold-change*): contaminada/no contaminada) del volumen de los *spots* comparados; el sentido de la tasa de cambio ↓: represión en contaminadas; ↑: acumulación en contaminadas), el código de acceso de la proteína identificada (*Accession #*); y el nombre, función, peso molecular (PM en kDa) y punto isoeléctrico (pI) de la misma.

Spot #	$\log_2(\text{FC})$	Sentido FC	Accession #	Nombre de la proteína	Función	PM (kDa)	pI
501	-3,00	↓	B6SNS4	LEA D-34	unknown	21,17	5,44
91	-1,89	↓	B6SJS2	Protein Z	unknown	42,16	5,82
399	-1,66	↓	B6UH67	LEA D-34	unknown	27,16	5,57
23	-1,33	↓	B6UH67	LEA D-34	unknown	27,16	5,57
34	-1,31	↓	K7UGF5	GAPC3	sugar metabolism	31,88	7,47
185	-1,31	↓	Q7M1Z8	Globulin-2	nutrient reservoir	49,89	6,61
482	-1,08	↓	B6UH67	LEA D-34	unknown	27,16	5,57
70	1,06	↑	B4FL17	TCTP	microtubule stabilization	18,72	4,67
215	4,19	↑	B4FNZ9	General stress protein 39	oxidoreductase	32,92	6,04

Los volúmenes de los 9 *spots* identificados, en cada una de las 11 muestras analizadas, se muestran en la Figura 33. Las proteínas identificadas pertenecieron a proteínas de reserva de nutrientes y relacionadas con estrés y presentaron en general niveles de expresión muy variables. Solamente 4 de los *spots* secuenciados presentaron valores de acumulación extremos en las dos muestras contaminadas respecto a las nueve sanas. Los *spots* 501, 91 y 34 presentaron valores de inhibición en las variedades contaminadas, mientras que el *spot* 215 presentó una mayor acumulación. Conjuntamente, los nueve *spots* identificados representaron el 10% del total de *spots* diferenciales; y aunque los demás no fueron identificados, más del 60% de ellos presentaron valores diferenciales en el grupo de muestras contaminadas.

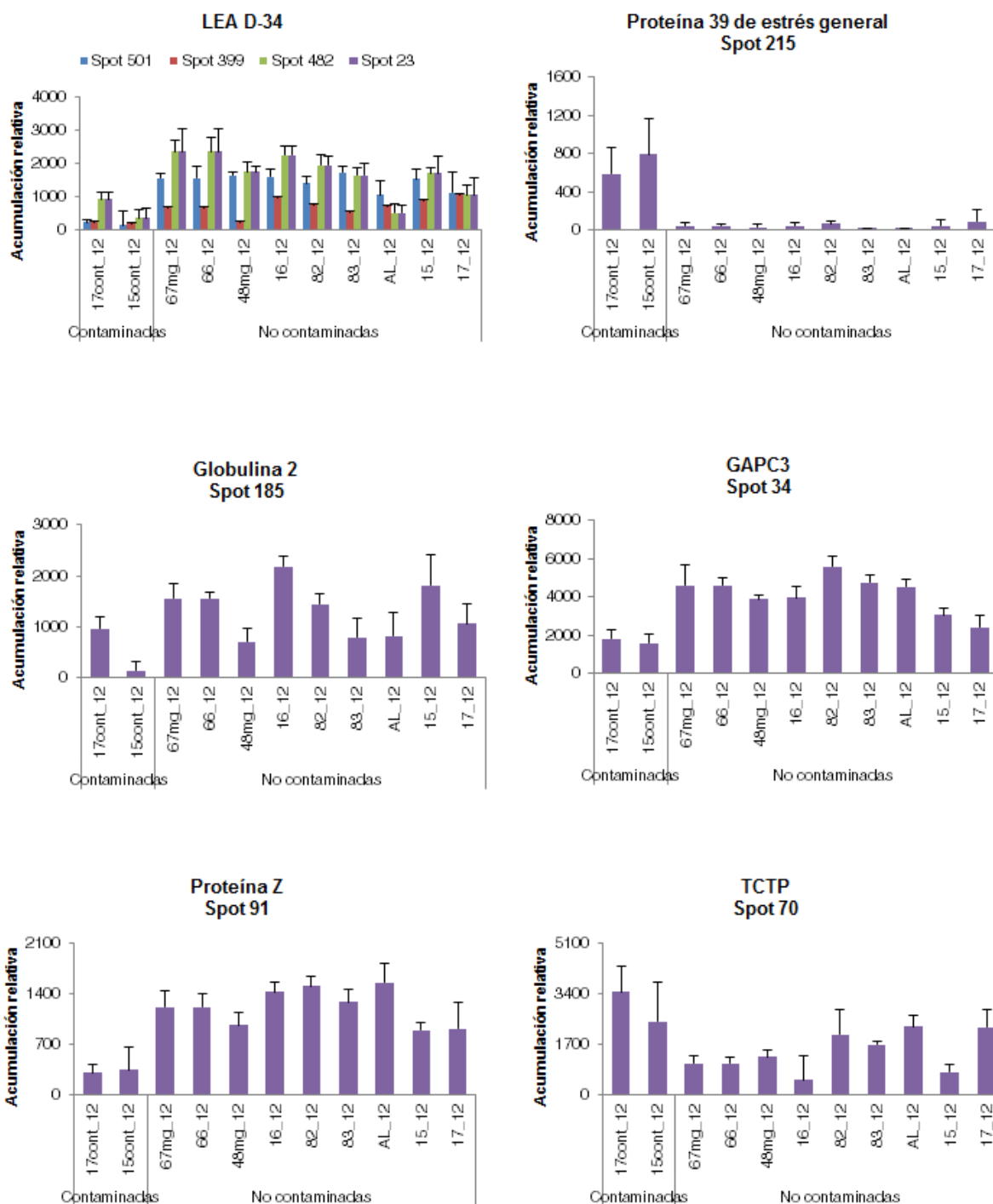


Figura 33. Niveles de expresión relativa de las proteínas diferencialmente acumuladas en las 2 muestras contaminadas y las 9 no contaminadas de maíz.

Cuatro de las proteínas identificadas correspondieron a proteínas del tipo LEA, pero solamente el *spot* 501 presentó niveles de expresión extremos específicamente en las contaminadas. El resto de LEA identificadas tuvo valores mucho más variables. Considerando que estas proteínas presentan una expresión altamente variable, su regulación no puede atribuirse a la contaminación fúngica.

El *spot* 91 correspondió a la proteína Z, perteneciente a la superfamilia de las serpinas, proteínas inhibitoras de proteasas. Los inhibidores de proteasas están relacionados con la resistencia frente a patógenos, incluidos los hongos (Dunaevsky *et al.*, 2005; Habib y Fazili, 2007). Las muestras contaminadas presentaron niveles de este inhibidor de proteasas 3,7 veces inferiores a las muestras no infectadas. Esta proteína estaría, por tanto, directamente relacionada con el proceso de infección de los granos de maíz.

También se observó una menor acumulación del *spot* 34 en muestras no aptas para el consumo que corresponde a la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPC3). Este enzima, que participa en la glucólisis, es esencial en el metabolismo de azúcares y para regular los niveles de ATP celular. En línea con nuestra observación, se ha descrito que este enzima puede estar reprimida en cereales, y provocar un metabolismo de azúcares alterado como consecuencia de la infección (Agrawal y Rakwal, 2006).

Finalmente, el *spot* 215 fue el que experimentó un aumento más pronunciado en las muestras infectadas (hasta 18 veces más que en muestras sanas) y se identificó como proteína 39 de estrés general, perteneciente a la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (*short-chain dehydrogenase/reductase, SDR*). Aunque su función es todavía poco conocida en plantas, se ha visto que los niveles de esta proteína pueden verse alterados en diferentes condiciones de estrés, pero hasta el momento no se ha relacionado con respuesta a infecciones (genevisible.com).

En resumen, la mayoría de *spots* diferenciales identificados en las variedades contaminadas por hongos patógenos de maíz fueron proteínas descritas relacionadas con la respuesta a estrés biótico asociado a la infección fúngica. Esto corrobora la capacidad de la proteómica 2D para detectar cambios proteicos relacionados con un importante cambio fisiológico en la planta como un fuerte estrés biótico tal y como ya se había visto en trabajos previos (Pechanova y Pechan 2015; Agapito-Tenzen *et al.* 2013). Además, esta aproximación permitió identificar 2 proteínas que específicamente se acumularon en las muestras contaminadas, pudiendo proponerse como posibles candidatos de marcadores de estrés biótico. Estos resultados estuvieron en línea con otros trabajos publicados para investigar cambios en los perfiles proteómicos causados por diferentes infecciones por hongos (Yadava *et al.*, 2015), y otros patógenos como virus (Wu *et al.*, 2013; Serra-Soriano *et al.*, 2015) en varios cultivos vegetales.

1.4 Proteómica comparativa de la patata cisgénica A01 A

El segundo aspecto que se evaluó en la proteómica 2D fue si la técnica podría identificar posibles efectos no intencionados de plantas MG cisgénica, que se produce a partir de secuencias originarias de la misma especie y sobre un tejido como el tubérculo de patata.

Se conoce que la preparación de extractos proteicos suficientemente puros a partir de diferentes tejidos de distintas especies vegetales puede presentar mayor o menor dificultad, lo que puede afectar directamente la capacidad resolutive de la proteómica bidimensional (Agrawal y Rakwal 2006; Bindschedler y Cramer 2011; Wu *et al.* 2015). Inicialmente, y como en el análisis proteómico 2D de maíz, se optimizó el protocolo de extracción de proteína total soluble. La extracción de proteínas de tubérculo de patata se optimizó a partir del protocolo de SDS caliente descrito por P. Delaplace (Delaplace *et al.* 2006). Este protocolo tuvo un rendimiento menor que otros, pero permitió extraer una diversidad mayor de proteínas y obtener un mayor número de *spots* resueltos por gel. Además, la realización de un paso adicional de precipitación mediante el *2-D Clean-Up kit* (GE Healthcare) permitió obtener unos extractos proteicos más puros resultando en geles 2D de mayor resolución.

Se utilizaron tubérculos de patata de distintas variedades, incluyendo una variedad MG resistente al patógeno *P. infestans*, desarrollada por RIKILT (Wageningen, Holanda). Esta variedad cisgénica (A01 A) lleva insertado el gen de resistencia *Rpi-b1b1* procedente de la patata ancestral *Solanum bulbocastanum* (Van Der Vossen *et al.* 2003). Se analizaron un total de 15 variedades de patata: la línea MG A01 A; la línea isogénica Des A, la línea comercial Desiree – de la que derivan Des A y A01 A –; 6 líneas convencionales comerciales y por tanto aptas para consumo humano; y otras 6 líneas adicionales usadas en investigación, también consideradas seguras para consumo alimentario, pero genéticamente distantes al resto (Tabla 15). A diferencia del estudio del maíz, en este caso sí se pudo trabajar con la variedad isogénica (Des A), ya que esta estuvo disponible. El esquema experimental fue el mismo que para el estudio del maíz: dos replicados biológicos y dos replicados técnicos para cada una de las líneas a patata.

Las correlaciones entre los replicados técnicos fueron muy altas (superiores a 90%), indicando una buena robustez de la técnica. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en los proteomas de maíz, los geles 2D de tubérculos de diferentes genotipos revelaron grandes diferencias entre ellos. Esto se apreció por una parte por las diferencias a nivel cuantitativo, o la enorme variabilidad en el número de *spots* detectados en los proteomas de tubérculos de patata de diferentes variedades, que cubre un rango desde 514 en la variedad Fontane hasta 1.520 en la variedad R054 (Tabla 15). Por otra parte, las diferencias en la distribución de los *spots* en todo el rango de pI y pM del gel son claramente visibles. La Figura 34 muestra

dos ejemplos de perfiles proteicos de patata muy distantes entre sí; donde se pueden apreciar las diferencias en los patrones de distribución y acumulación de los *spots*. Los proteomas de grano de maíz obtenidos estaban constituidos por alrededor de 1.400 *spots*, y mostraron sistemáticamente correlaciones superiores a $R=0,77$, lo que permitió comparar los proteomas fácilmente. Sin embargo, en el estudio de la proteómica de patata se trabajó solamente con 209 *spots* para el análisis comparativo que fueron bien resueltos en todos los replicados (ver *spots* marcados en rojo en la Figura 34). El número de analitos para la comparación en el caso de la proteómica de patata representó un 15% de los disponibles en maíz. El grupo de Lehesranta y colaboradores (Lehesranta *et al.* 2005) también observó una enorme variabilidad cualitativa y cuantitativa en los proteomas bidimensionales de tubérculos de patata. Por este motivo la comparación entre los proteomas 2D de tubérculo de patata implicó la selección de un número relativamente bajo de *spots*.

Tabla 15. Variedades de patata analizadas por proteómica bidimensional y número de *spots* identificados en los geles 2D. El número de *spots* se ha calculado como una media de los cuatro geles.

Variedad	Tipo	Número de spots (Media \pm DE)
A01 A	MG	751 \pm 12
Des A	<i>Near-isogenic</i>	736 \pm 14
Desiree	Comercial	671 \pm 63
Bintje	Comercial	616 \pm 29
Biogold	Comercial	672 \pm 11
Fontane	Comercial	514 \pm 38
Innovator	Comercial	585 \pm 19
Maris Piper	Comercial	627 \pm 16
Sante	Comercial	632 \pm 37
HZ941	Experimental	1490 \pm 19
IV154	Experimental	1500 \pm 6
R029	Experimental	1494 \pm 10
R036	Experimental	1493 \pm 10
R054	Experimental	1520 \pm 7
R386	Experimental	1514 \pm 5

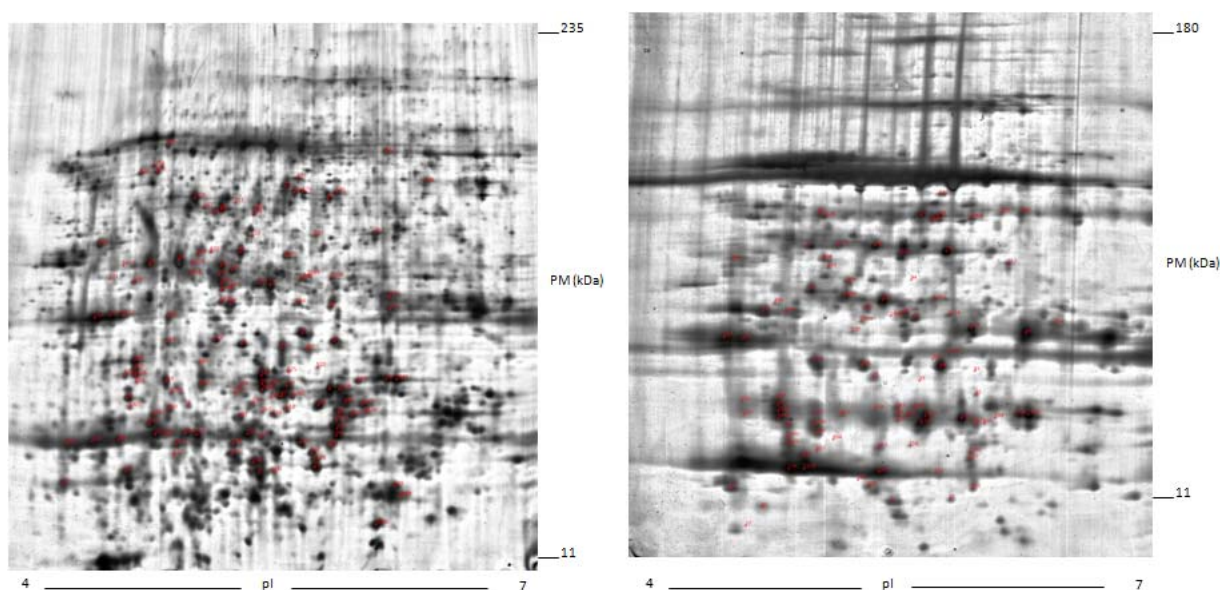


Figura 34. Geles bidimensionales de tubérculo de patata de las variedades Desiree (izquierda) y Fontane (derecha). Se indican en rojo, los *spots* usados para el análisis comparativo.

En la exploración de la variabilidad de los perfiles proteómicos de los tubérculos, mostrada en forma de matriz de correlación (Figura 35 A) y de dendrograma con clúster jerárquico (Figura 35 B), se observó una gran similitud entre las variedades Desiree, Des A y A01 A, que formaron un clúster independiente. Este resultado era esperable, ya que estas variedades son muy próximas genéticamente: Des A es isogénica de la variedad cisgénica A01 A, y a su vez deriva de Desiree. Las 6 variedades comerciales se agruparon en dos clústeres independientes, con una correlación entre -0,5 a -0,3 respecto al clúster de la variedad cisgénica; y de -0,3 a 0 respecto al grupo de variedades experimentales. Por otra parte, las 6 variedades experimentales formaron un grupo, con una correlación entre 0 y 0,5 respecto a Desiree, Des A y A01 A. Las variedades experimentales fueron obtenidas mediante cruzamientos entre variedades comerciales y variedades salvajes, con el objetivo de incrementar la resistencia a *Phytophthora spp.* Se pudo intuir que éstas variedades estuvieron muy relacionadas genéticamente entre sí, aunque no se conociera el origen ni la relación génica entre ellas ya que fueron cedidas por el laboratorio de RIKILT de manera confidencial.

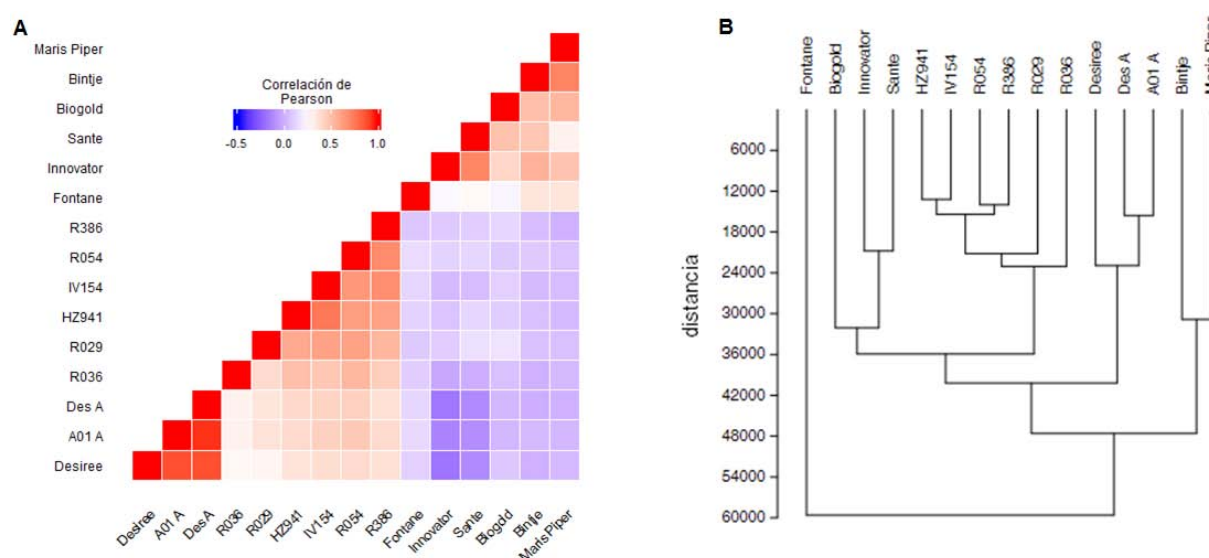


Figura 35. Relación entre los proteomas de tubérculos de patata. A) Matriz de correlación de los spots en todas las variedades de patata, comparadas por parejas. El color azul indica correlaciones negativas y el rojo positivas. B) Dendrograma y clúster jerárquico de las 15 variedades de patata según el volumen global de los spots.

El análisis por PCA permitió representar las variedades de patata según la similitud de los perfiles proteómicos. La Figura 36 muestra la misma tendencia observada en el análisis jerárquico: las tres primeras componentes, que conjuntamente explicaron el 75% de la varianza total, separaron las variedades de patata en tres grupos: (i) comerciales, (ii) experimentales o (iii) Desiree, Des A y A01 A. Resulta interesante destacar que la variedad MG A01 A prácticamente colocalizó con la convencional isogénica Des A.

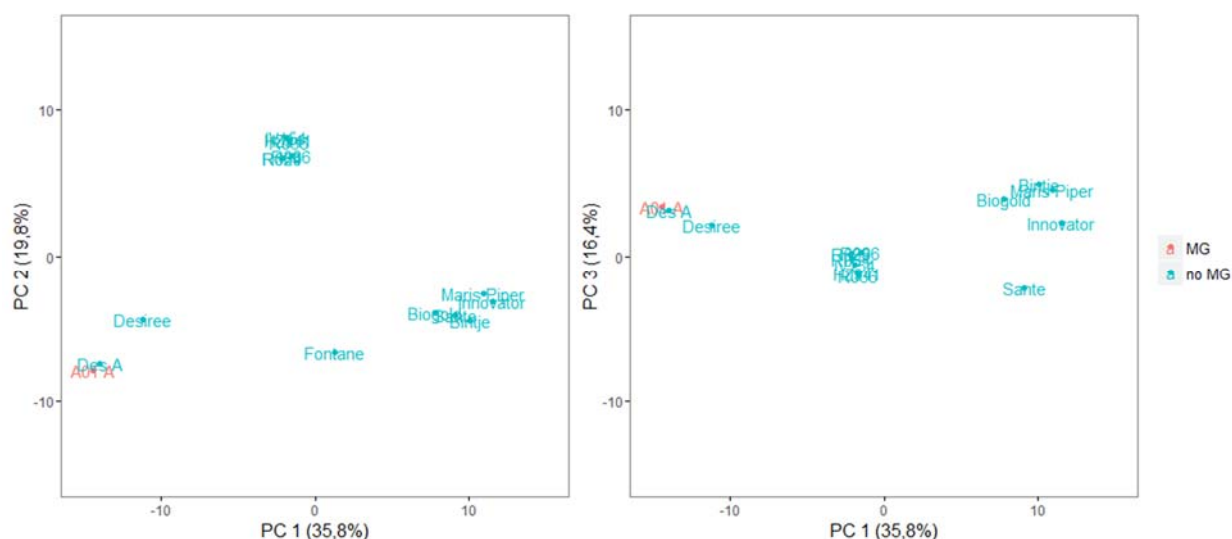


Figura 36. PCA de los proteomas de tubérculo de patata de 15 muestras correspondientes a una variedad MG, su correspondiente convencional isogénica, la variedad parental de la que deriva Des A; más 6 variedades comerciales y 6 variedades experimentales, todas consideradas aptas para el consumo. A) Representación del PC1 respecto a PC2. B) PC1 respecto a PC3. La variedad MG A01 A se muestra en rojo y las variedades convencionales en azul.

Tabla 16. Identificación por LC-MS/MS de los spots con volúmenes diferenciales en la variedad de patata MG A01 A y la línea convencional isogénica Des A. Los spots diferenciales de cada comparativa se ordenan según el FC. Se indica el código de cada spot diferencial (Spot #), la tasa de cambio (FC (fold-change): MG/no MG) del volumen de los spots comparados; el sentido de la tasa de cambio ↓: represión en MG; ↑: acumulación en MG), el código de acceso de la proteína identificada (Accession #); y el nombre, función, peso molecular (PM en kDa) y punto isoeléctrico (pI) de la misma.

Spot #	log2(FC)	Sentido FC	Accession #	Nombre de la proteína	Función	PM (kDa)	pI
187	-1.44	↓	M1CQP6	Fructose-bisphosphate aldolase	Glycolytic enzyme	38,42	8,28
914	-1.31	↓					
1338	-1.27	↓	P58518	Aspartic protease inhibitor 3	Protease inhibitor	18,57	8,24
522	-1.02	↓	M1AWZ7	Glutathione peroxidase	Chromatin	18,77	7,08
889	1.04	↑	P58515	Serine protease inhibitor	assembly or Protease inhibitor	20,10	5,27
837	1.52	↑	O24388	Cysteine protease inhibitor 3	Protease inhibitor	16,37	8,65

Finalmente, se analizaron en detalle las diferencias de acumulación de spots entre la variedad cisgénica A01 A y la línea comparadora isogénica Des A. Para ello se compararon los volúmenes de cada uno de los spots de los perfiles de la variedad MG A01 A contra los isogénica Des A mediante un test t de Student (FC=2; q<0,05). Se detectaron 6 spots diferenciales, que representaron el 2,9% del total de spots analizados. Todos ellos mostraron acumulación diferencial menor a 3 veces entre la patata cisgénica A01 y el comparador Des A. Se identificaron estos spots diferenciales mediante LC-MS/MS (Tabla 16).

Los péptidos derivados de la LC-MS/MS se trataron mediante el software *Thermo Proteome Discover v 1.4.1.14* (Thermo Scientific), contra la base de datos de plantas de UniProt. Se filtraron los resultados con identificación en patata (*S. tuberosum*) y con mayor puntuación. Las descripciones, funciones y ontologías de las proteínas se extrajeron de la base de datos de UniProt (uniprot.org), KEGG (genome.jp/kegg) y EnsemblPlants (plants.ensembl.org/index.html). Cuatro de los seis spots identificados presentaron niveles de acumulación menores en la variedad MG que en la isogénica; mientras que los dos restantes mostraron niveles superiores en la variedad MG. Los spots con menor acumulación en A01 A (spots 187, 1338 y 522) se identificaron como la enzima glucolítica fructosa-bisfosfato aldolasa, un inhibidor de proteasas, y la

enzima glutatión peroxidasa. Los dos *spots* sobreacumulados en la variedad MG (*spots* 837 y 889) correspondieron a dos inhibidores de proteasas.

Para evaluar el efecto de la modificación genética sobre estas diferencias se comparó el volumen de estos *spots* en las 13 variedades analizadas (Figura 37). El volumen de los *spots* diferenciales en la variedad MG A01 A se situó en valores comprendidos en el rango de las 14 variedades no MG analizadas; por lo que se considera que todos los *spots* identificados como diferenciales mostraron, en la variedad MG, niveles de acumulación dentro del rango de la variabilidad natural de la especie. Los inhibidores de proteasas son antinutrientes, compuestos orgánicos relevantes desde un punto de vista de seguridad alimentaria, ya que interfieren en la absorción de otros nutrientes. Es por ello que, en el caso de esta patata A01 no comercial, sería conveniente la realización de análisis de riesgos adicionales para controlar la presencia de compuestos perjudiciales.

En conclusión, la aproximación de análisis proteómico 2D ha permitido detectar la mayor acumulación de ciertos inhibidores de proteasas, que supondrían un peligro a nivel de seguridad alimentaria, en los tubérculos cisgénicos. Ello confirma el valor de esta técnica como herramienta en un análisis de equivalencia substancial de OMG ya que permite una medición simultánea de varios analitos y la comparación de varios centenares de componentes sin necesidad de un conocimiento previo de los compuestos.

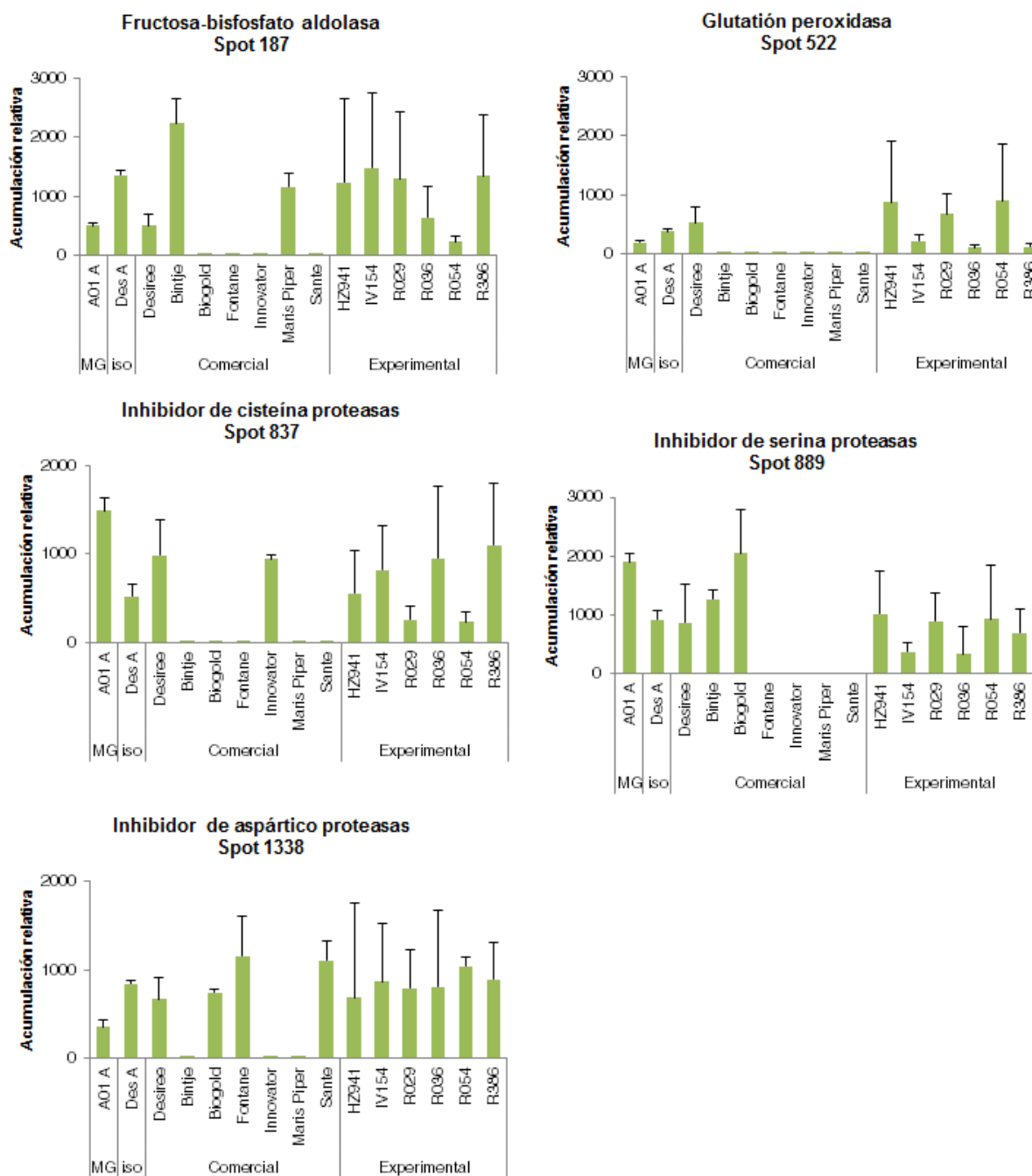


Figura 37. Niveles de expresión relativa de las proteínas diferencialmente acumuladas en la variedad MG A01 A de patata respecto a la isogénica (iso) y las otras 13 convencionales (comerciales y experimentales).

2.1 Transcriptómica comparativa en hígado de rata alimentada con maíz MON810

Como ya se ha señalado en la introducción de esta tesis doctoral, el estudio de los efectos sobre la salud provocados por el consumo de alimentos o piensos MG incluye estudios de toxicidad a 90 días en roedores. En el proyecto GRACE, se realizaron dos estudios alimentarios a 90 días y un 1 año en ratas basados en los test reglamentados 408 y 452 de la OECD (OECD 1998; OECD 2009b) y las adaptaciones de la EFSA (EFSA 2011b). Los estudios a 90 días permiten determinar efectos toxicológicos debidos a una exposición aguda de la dieta MG, mientras que la finalidad de los estudios de 1 año es determinar el potencial carcinogénico de la misma debido a una exposición crónica.

Esta tesis doctoral aporta información adicional a los análisis de toxicidad reglamentados, ya que se estudian los cambios celulares a través de dos aproximaciones de caracterización molecular masiva, la transcriptómica y la proteómica sobre el hígado, para determinar posibles efectos nocivos derivados de la dieta con un contenido del 33% de MG. El hígado es el principal órgano de detoxificación en los mamíferos, así como uno de los principales órganos con función digestiva. En este capítulo concreto se aborda la expresión génica mediante dos aproximaciones diferentes. Primero se realizó un análisis transcriptómico mediante *microarray* de rata para tener una visión holística de los cambios generales en el transcriptoma hepático. Simultáneamente se realizó un análisis de expresión de genes diana seleccionados como marcadores de daño celular hepático, estrés oxidativo y toxicidad hepática por xenobióticos.

Diseño experimental

Se analizaron los grupos de ratas alimentados con contenidos mínimo y máximo de maíz MON810 – según las recomendaciones de la OECD y EFSA – de los estudios de alimentación realizados en el proyecto GRACE. De esta manera, el grupo control se alimentó con pienso que contenía un 33% de maíz no MG (*near-isogenic*) y el grupo tratamiento con un pienso a base de 33% de maíz MON810. Debido a las diferencias fisiológicas y metabólicas que existen entre machos y hembras, éstos se analizaron de manera independiente en las dos condiciones: ensayo de toxicidad aguda a 90 días y ensayo de toxicidad crónica a 1 año. Para la condición de 90 días se llevaron a cabo dos estudios independientes y consecutivos (Estudios A y B) con diferentes variedades de maíz cultivadas en el año 2012. Para el Estudio A se utilizaron variedades de maíz MG y *near-isogenic* producidas por Monsanto, mientras que para el Estudio B se utilizó un par de variedades de Pioneer Hi-bred. Cada estudio constó de cuatro grupos de ensayo acorde al sexo y tipo de dieta recibida, cada uno con 16 individuos. En el estudio de toxicidad crónica de

1 año (Estudio C) se testaron las variedades MG y *near-isogenic* de Monsanto, cultivadas en el año 2013, y el número de individuos por grupo fue de 20. Las ratas se enjaularon por parejas del mismo sexo y tratamiento, formando la unidad experimental. El diseño experimental seguido se muestra en la Tabla 17.

Tabla 17. Diseño experimental del análisis transcriptómico en hígado de rata en los ensayos de toxicidad aguda (90 días) y crónica (1 año).

Ensayo de toxicidad	Estudio	Sexo		Dieta (33% maíz)
		Hembras (n = 16)	Machos (n =16)	
90 días	Estudio A (Monsanto)	♀♀ 66_90d	♂♂ 66_90d	control
		♀♀ 67mg_90d	♂♂ 67mg_90d	MG
	Estudio B (Pioneer)	♀♀ 16_90d	♂♂ 16_90d	control
		♀♀ 48mg_90d	♂♂ 48mg_90d	MG
1 año	Estudio C (Monsanto)	♀♀ 66_1a	♂♂ 66_1a	control
		♀♀ 67mg_1a	♂♂ 67mg_1a	MG

i. Expresión génica mediante *microarray*

Para el análisis transcriptómico se usaron los *microarray* comerciales *GeneChip Rat Genome 230 2.0* de Affymetrix. Estos chips contienen aproximadamente 31.000 sondas, que cubren el transcriptoma de rata con 28.000 genes de rata. Para cada grupo experimental (sexo, dosis y dieta recibida) se hibridaron los chips por triplicado. Así, en el ensayo de 90 días, formado por ocho grupos (cuatro de machos y cuatro de hembras), se hibridaron un total de 24 chips. En el ensayo de 1 año, formado por cuatro grupos (dos machos y dos hembras), se realizaron 12 chips. Los resultados de los *microarray* se analizaron mediante los programas de Affymetrix *Expression Console Software v 1.4.1*, *Transcriptome Analysis Console v 3.0* y con el paquete de R *affyAnalysisQC v 1.0.0*.

Variabilidad de los perfiles transcriptómicos de hígados de ratas

El paso previo a cualquier análisis génico diferencial es comprobar la calidad de los resultados obtenidos en la plataforma de *microarray* de Affymetrix. Para determinar la calidad de las muestras de mRNA y de las hibridaciones se usaron los parámetros definidos por defecto por el programa de Affymetrix *Expression Console Software*. Los archivos *.cel* (datos brutos), generados por el escaneado de los chips, se normalizaron y resumieron por el método RMA (*Robust Multi-Array Average*) que transforma los valores de intensidad en el log₂ (Irizarry *et al.* 2003). El test de calidad incluye obtener los parámetros – brutos y normalizados – de la hibridación de todos los genes controles, distribución de los valores de intensidad de las muestras y valores de intensidad de las sondas. En el Anexo V se muestran los resultados del test de calidad.

Los datos normalizados se representaron en una matriz de correlación, un dendrograma y un análisis de componentes principales (PCA) para comparar todos los replicados y grupos de cada ensayo. Estos métodos informan sobre la similitud entre los replicados de un grupo y de los distintos grupos y, además, permiten la identificación de cualquier grupo y/o réplica experimental que presente una desviación atípica. Concretamente, en el ensayo de 90 días, el replicado M 48mg_90d B (correspondiente al segundo replicado de los machos del estudio B alimentados con pienso MG) presentó valores de las intensidades

residuales, porcentaje de sondas presentes y factores de magnitud aplicados fuera de los límites óptimos y se eliminó de los análisis subsiguientes (no se muestran los datos).

Se exploró la relación de cada replicado de un mismo ensayo y sexo construyendo una matriz en función del método de correlación de Pearson y posterior jerarquización de las muestras por el método Ward. En el ensayo de 90 días, incluyendo los dos sexos, se vieron valores de correlación del 92%; y en el ensayo de 1 año fueron mayores al 97% (ver Anexo V). Las correlaciones entre hembras y machos de los estudios A y B de toxicidad aguda y crónica mostraron también correlaciones muy altas (>94% y >99% respectivamente) entre todos los replicados indicando que las hibridaciones fueron muy similares y que los perfiles de expresión génica de todos los grupos estuvieron muy conservados (no se muestran los datos).

El dendrograma realizado sobre las correlaciones del ensayo de 90 días, mostró que los grupos de animales se separaron según el estudio (A o B) y en cualquier caso los grupos alimentados con pienso MG se situaron junto al respectivo grupo control; aunque se vio que las hembras y machos del estudio B (♀♀ 48mg_90d), formaron un clúster independiente a los otros tres grupos (Figura 38). En el ensayo de 1 año, los replicados de los dos estudios se agruparon en los mismos clústeres (Figura 39).

Finalmente, se realizó un PCA para visualizar la relación general de todos los grupos de ratas con sus triplicados, y para explorar la influencia del factor dieta en los perfiles transcriptómicos de los hígados de las mismas. En el PCA de la Figura 40, el cual incluye todos los grupos de los tres estudios (machos y hembras de los estudios A, B y C), podemos apreciar que los transcriptomas de hígados de rata de los ensayos de toxicidad aguda se separaron significativamente de los del ensayo de toxicidad crónica, en la primera componente (PC1, 50% de la variabilidad total). Estos estudios tuvieron diferente duración y por consiguiente, los animales tenían edades diferentes en el momento del sacrificio. Por tanto, los cambios observados en el PCA pudieron deberse a las alteraciones de la fisiología hepática de animales de edades diferentes. La componente PC2, que explicó una proporción menor de variabilidad (17%) separó el estudio A respecto al B del ensayo de toxicidad aguda. Además, se apreció que los grupos del estudio B presentaron una mayor variabilidad entre ellos que los estudios A y C. Estos resultados indicaron, además, que los animales alimentados con pienso MG, no presentaron diferencias en los perfiles de expresión génica hepática suficientes para formar un grupo específico en el PCA en el contexto de toda la variabilidad incluida en los tres estudios realizados.

Tal y como especifican los protocolos de la OECD y la EFSA se analizaron los perfiles transcriptómicos de hembras y machos de manera independiente ya que la fisiología hepática es distinta en ambos sexos y los efectos toxicológicos pueden variar en función del sexo (Monica Gandhi *et al.* 2004; Singh *et al.* 2005; Waxman y Holloway 2009). Sin embargo, se pudo apreciar en los resultados de los *microarray* que los transcriptomas de ambos sexos estuvieron muy conservados (Anexo V).

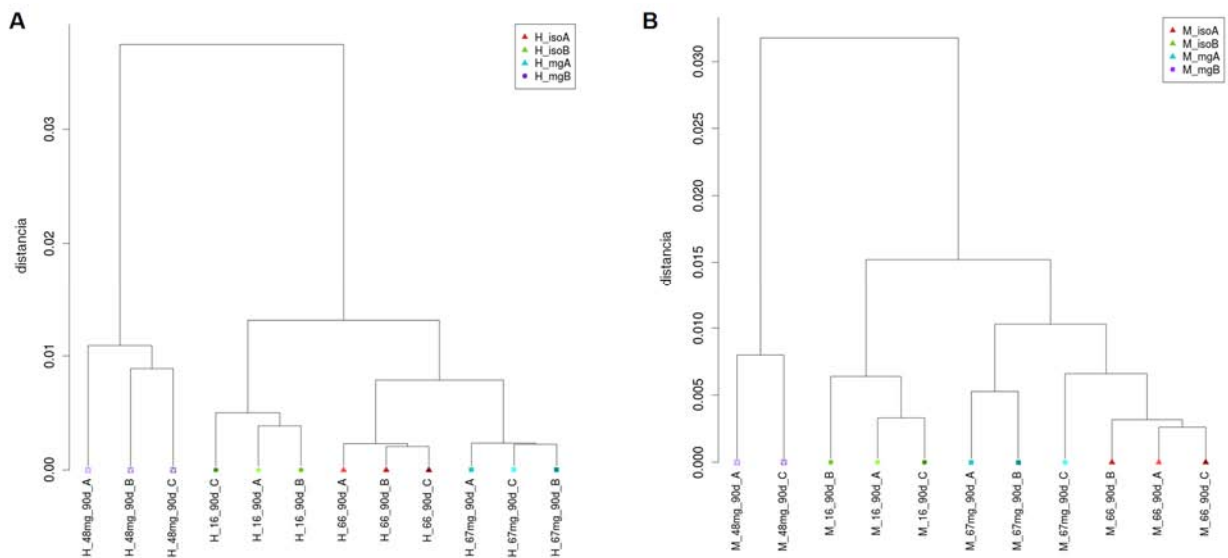


Figura 38. Dendrograma de los valores de intensidad normalizados de todos los replicados de los chips de A) hembras (♀) y B) machos (♂) del ensayo de 90 días. Los triplicados de cada grupo se representan con las letras A, B y C.

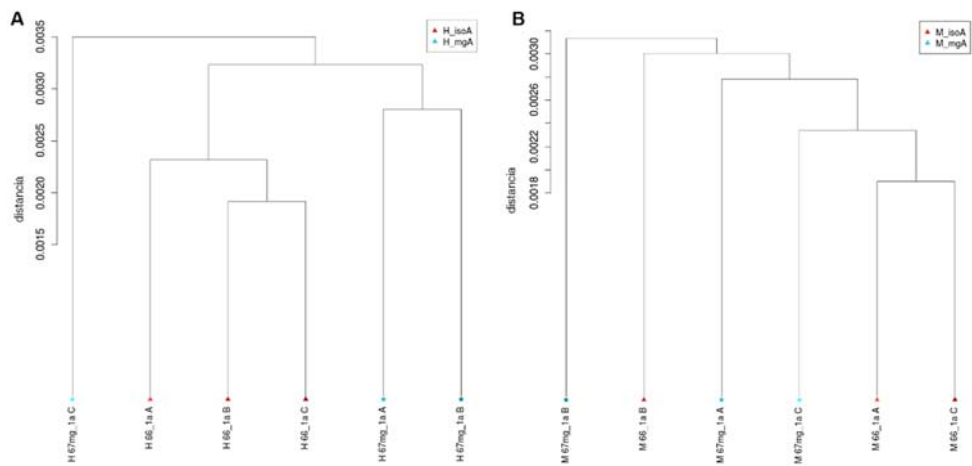


Figura 39. Dendrograma de los valores de intensidad normalizados de todos los replicados de los chips de A) hembras (♀) y B) machos (♂) del ensayo de 1 año. Los triplicados de cada grupo se representan por A, B y C.

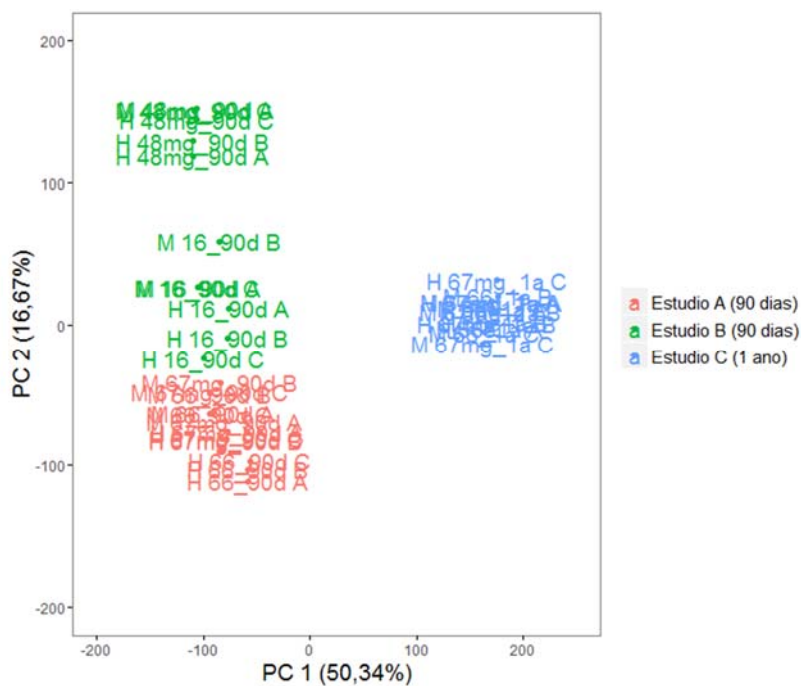


Figura 40. PCA de los valores de intensidad normalizados de los chips de todos los replicados y grupos experimentales de los ensayos de 90 días y 1 año. Los triplicados de cada grupo se representan por A, B y C. [H: hembras; M: machos]

Se representaron las dos componentes principales de los estudios A y B del ensayo de 90 días (Figura 41), que explicaron casi el 60% de la variabilidad total observada. En los dos sexos, la componente 1 (PC1, eje X) que corresponde a un 45,83% de la variabilidad en hembras y un 38,67% en machos, separó los animales según el estudio. La segunda componente (PC2, eje Y) separó las ratas según la dieta MG o control; con variabilidades del 14,02% en hembras y 12,64% en machos. Estos datos mostraron que el factor estudio (estudio A o B) contribuyó de manera importante a las diferencias de los perfiles de expresión observadas entre machos y hembras en los estudios de toxicidad aguda (39% - 46% de la variabilidad total). El factor dieta sería la segunda fuente de variabilidad en los perfiles transcriptómicos (13% - 14%). Las diferencias entre los dos estudios podrían deberse a pequeñas diferencias en la composición de las dietas; o simplemente reflejar la variabilidad esperable entre dos ensayos distintos, realizados en teoría en las mismas condiciones y con un ligero decalaje en el tiempo.

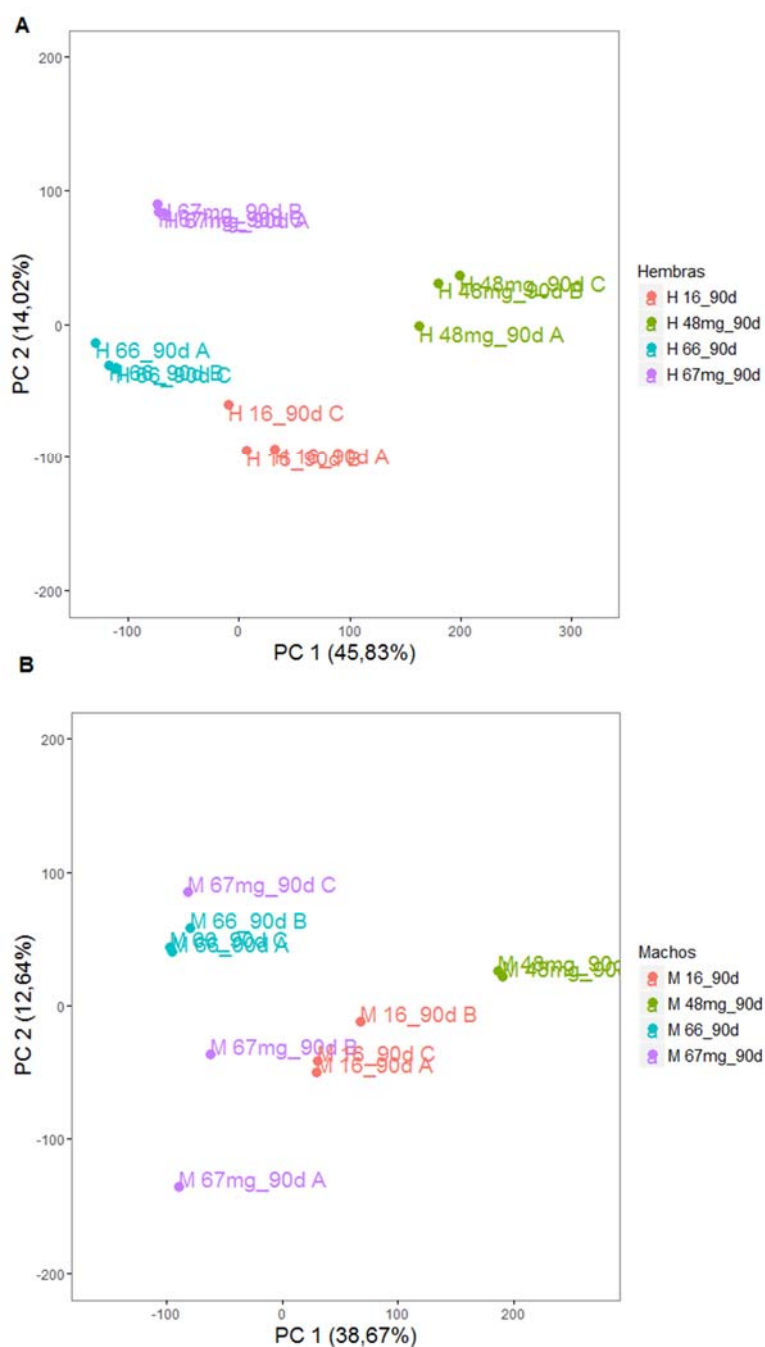


Figura 41. PCA de A) hembras (H) y B) machos (M) del estudio de toxicidad de 90 días. Los triplicados de cada grupo se representan por A, B y C.

a) Análisis por *microarray* en el ensayo de toxicidad aguda de 90 días

El análisis de expresión diferencial de los transcriptomas de hígado de rata se realizó con el programa *Transcriptome Analysis Software v 3.0* de Affymetrix. Primeramente, se exploraron las diferencias de expresión génica entre todas las parejas posibles de los grupos analizados, incluyendo los dos estudios de 90 días y los dos sexos. Para esto se realizó un análisis transcriptómico diferencial entre cada grupo mediante un análisis de la varianza (ANOVA), para calcular el test estadístico F de Bayes y su correspondiente valor p (Smyth 2004). Considerando criterios de significancia de $p < 0,05$ y tasa de cambio (*fold-change* o FC) ≥ 2 , el número de genes diferencialmente expresados (GDE) varió entre 171 y 5.247 (Figura 42).

Los grupos que presentaron menores diferencias fueron los de ratas alimentadas con maíz MG comparadas con las ratas alimentadas con el respectivo maíz control y del mismo sexo: 171 GDE en hembras del estudio A; 185 y 649 en machos de los estudios A y B respectivamente. Estas diferencias no representaron más del 2,1% de genes totales analizados. El grupo de hembras alimentadas con maíz MG del estudio B (♀♀ 48mg_90d) fue el grupo que presentó mayores diferencias (1.561 GDE, más del 5% del total) cuando se comparó con su correspondiente grupo control (♀♀ 16_90d.) Esto concuerda con el dendrograma de la Figura 38 A, donde se vio que este grupo formó un clúster separado del resto de grupos. En el grupo de machos, los números de GDE entre dietas en los estudios A y B fueron más conservados. Por el contrario, los grupos de estudios diferentes presentaron más del 14,7% de diferencias, resultado similar a los obtenidos en la comparación de perfiles de expresión generales (Figura 41). Los grupos de distinto sexo presentaron diferencias de hasta el 17% del total.

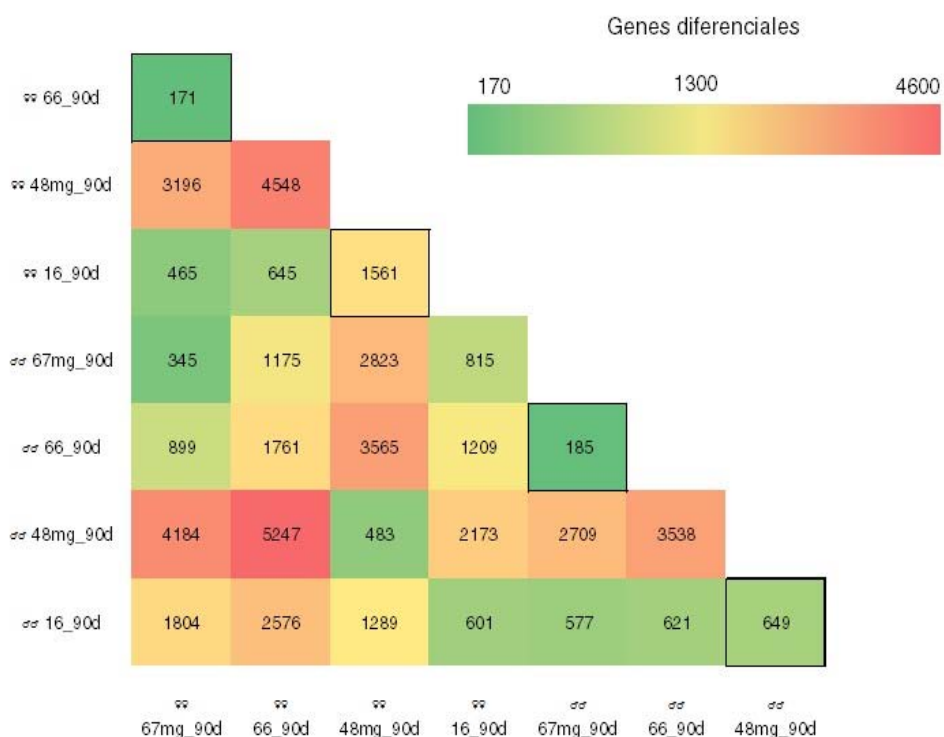


Figura 42. Número de sondas diferenciales entre cada uno de los grupos de ratas del ensayo de 90 días. Las casillas enmarcadas representan las diferencias entre los grupos alimentados con maíz MG y control del mismo estudio y mismo sexo.

Tabla 18. GDE en hígado de rata de los grupos de machos y hembras de los estudios A y B. [↑: sobreexpresados en los grupos alimentados con dieta MG y ↓: reprimidos en los grupos alimentados con dieta MG].

	Genes diferenciales (q<0,05; FC≥2)	
	Estudio A	Estudio B
Hembras	164 (↑94; ↓ 70)	1.401 (↑454; ↓ 947)
Machos	21 (↑13; ↓ 8)	354 (↑105; ↓ 249)

Seguidamente se analizaron en detalle los GDE entre grupos dieta control versus dieta MG del mismo sexo. Para ello se aplicó la corrección del p valor para comparaciones múltiples usando el FDR (*False Discovery Rate*, q valor) en los grupos alimentados con pienso MG y sus respectivos grupos controles (casillas enmarcadas en la Figura 42). Para determinar la significancia estadística se seleccionaron los transcritos en base al valor $q < 0,05$ y $FC \geq 2$. Con estos criterios, el número de sondas alteradas en los hígados de animales del ensayo de toxicidad aguda varió entre 21 y 1.401 (Tabla 18). Estos valores representaron entre el 0,07% y el 4,5% del total de sondas analizadas en el *microarray*. Las hembras que recibieron la dieta MG del estudio A presentaron 164 GDE (70 reprimidos y 94 sobreexpresados) y en las del estudio B se detectaron 1.401 (947 reprimidos y 454 sobreexpresados). Por el contrario, se obtuvieron 21 GDE (8 reprimidos y 13 sobreexpresados) en machos del estudio A y 354 en machos del estudio B (249 reprimidos y 105 sobreexpresados). Los genes diferenciales de cada grupo se recogen en el Anexo VI. Se encontraron un total de 80 GDE en los grupos de hembras de los dos estudios, y 11 en machos (Figura 43). Estos números de genes diferenciales son habituales en estudios de expresión génica de hígado de rata mediante *microarray* que indican toxicidad y carcinogénesis (Zou *et al.*, 2010; Ditewig *et al.*, 2014; de Abrew *et al.*, 2015). Por este motivo, se consideró muy importante explorar la relevancia biológica de estos cambios.

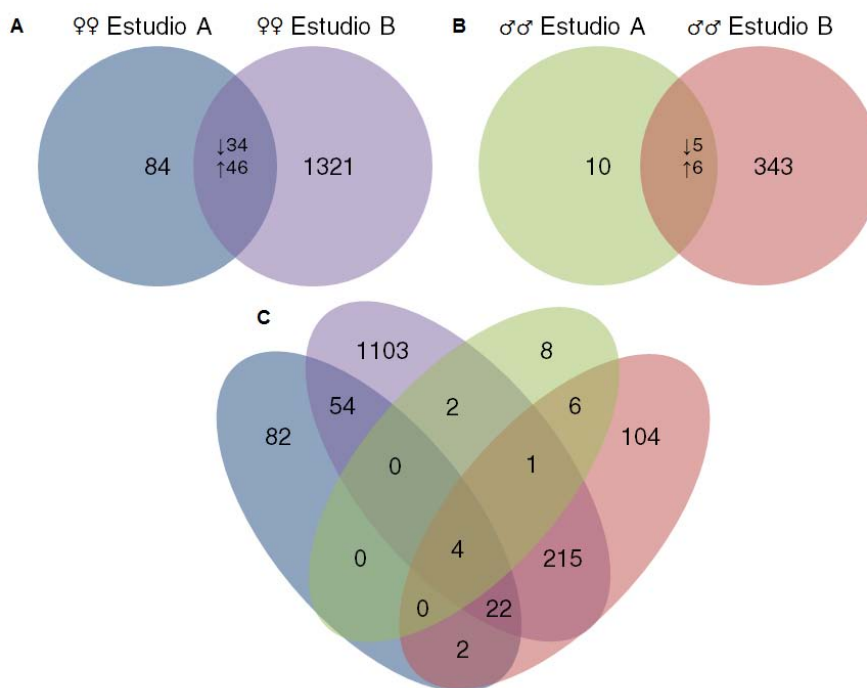


Figura 43. Diagrama de Venn de los GDE en los hígados de rata de hembras (A); machos (B) y ambos (C) del ensayo de toxicidad a 90 días. [↑: sobreexpresados en los grupos alimentados con dieta MG y ↓: reprimidos en los grupos alimentados con dieta MG].

Categorías funcionales de los GDE en los hígados de ratas del ensayo de toxicidad aguda de 90 días.

Los genes diferencialmente expresados se analizaron a nivel funcional para determinar si la dieta a base de maíz MG estaba afectando rutas celulares y concretamente, si podía estar afectando alguna ruta relacionada con daño celular hepático. Primero se realizó una clasificación funcional de los GDE en base a los procesos biológicos. Esto se realizó en el *Geneontology Panther Classification System* (www.pantherdb.org) usando las anotaciones aportadas por Affymetrix. Las categorías más representadas fueron procesos metabólicos, aunque también se apreció representación significativa de procesos apoptóticos y del sistema inmune en los dos grupos de hembras y en el de machos del estudio B Figura 44 y 45. Adicionalmente se realizó un análisis de las rutas celulares sobrerrepresentadas significativamente ($q < 0,05$) mediante el programa KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (www.genome.jp/kegg, Kanehisa y Goto, 2000).

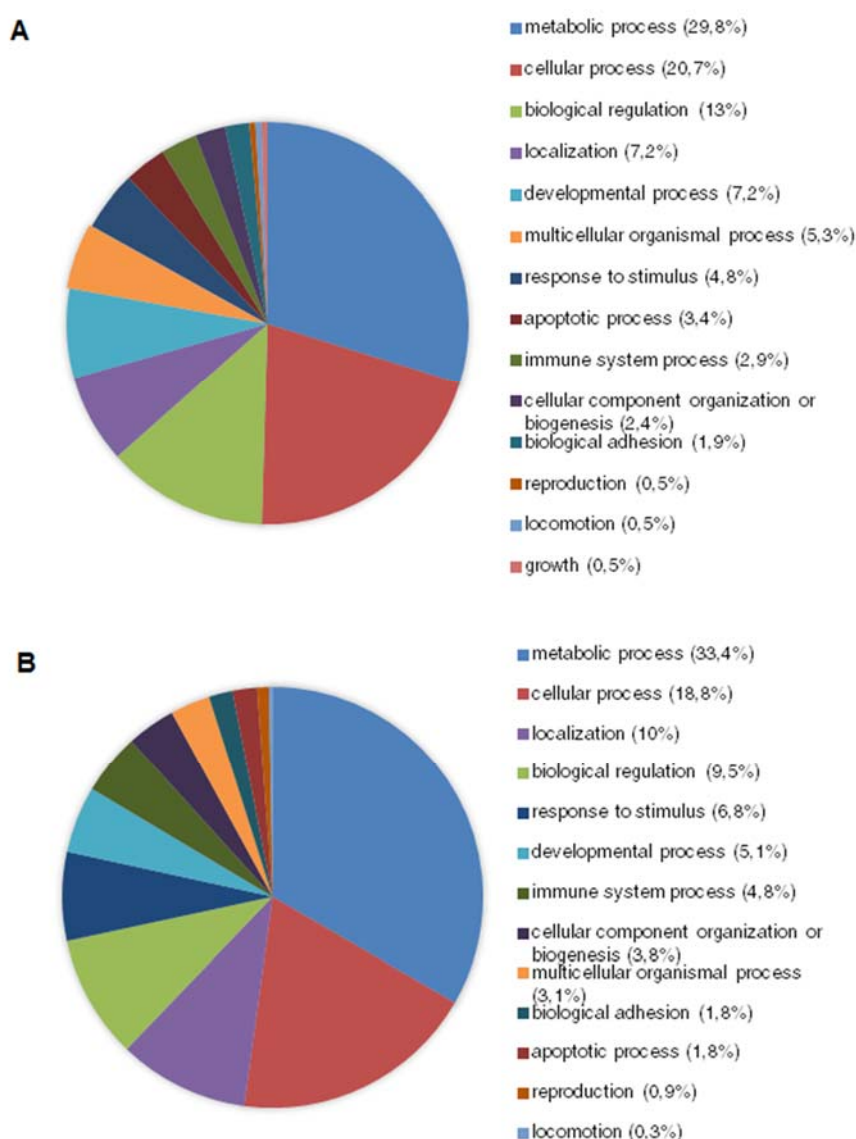


Figura 44. Categorías funcionales de los transcritos diferenciales en las hembras 5 alimentadas con dieta MG en el ensayo de toxicidad de 90 días. Se representa un 6 gráfico de sectores de las (A) hembras del estudio A y (B) del estudio B.

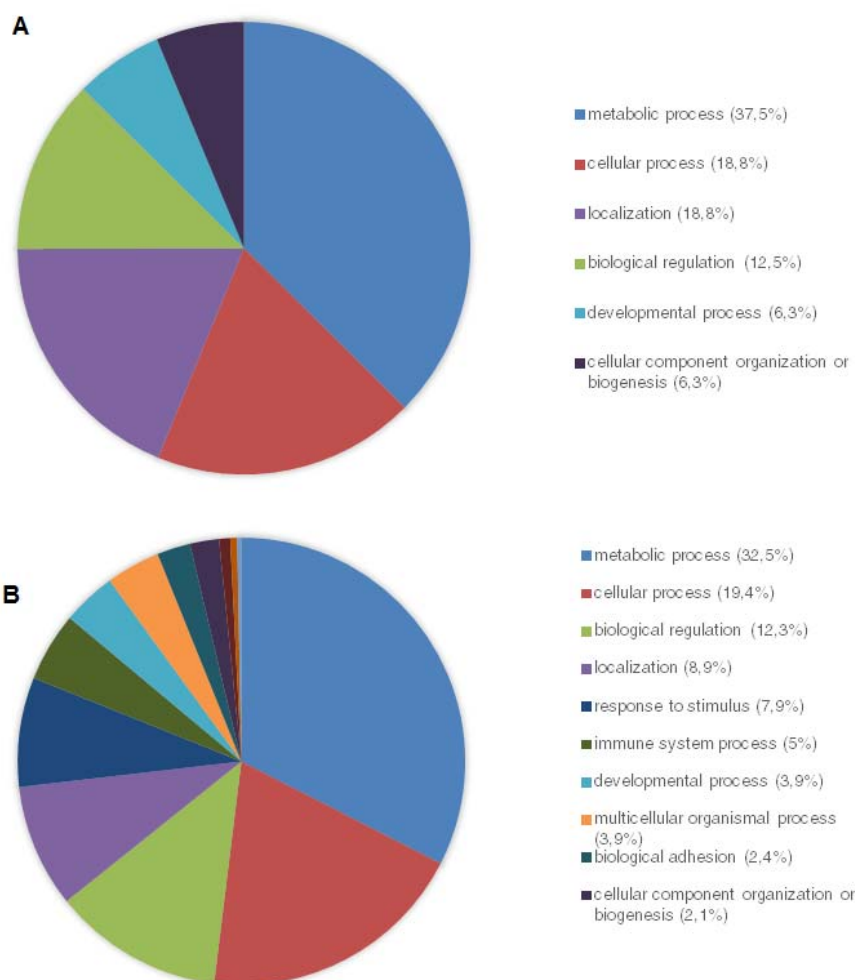


Figura 45. Categorías funcionales de los transcritos diferenciales en los machos alimentados con dieta MG en el ensayo de toxicidad de 90 días. Se representa un gráfico de sectores de los (A) machos del estudio A y (B) del estudio B.

En las hembras del estudio A se identificaron 8 rutas funcionales sobrerrepresentadas que incluyeron ritmo circadiano, metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450 y secreción biliar (Tabla 19). Las hembras del estudio B presentaron el mayor número de GDE (1.401) lo cual se reflejó en el número de rutas KEGG sobrerrepresentadas. Muchas de las rutas significativas ($q < 0,05$) estuvieron relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y proteínas, y también con algunas enfermedades. En la Tabla 20 se representan los 30 procesos más significativos. Por otra parte, los machos del estudio A no presentaron ningún proceso biológico ni ruta celular sobrerrepresentados, ya que sólo presentaron 21 GDE. Las rutas significativas de los transcriptomas de hígado de ratas de los machos del estudio B (Tabla 21) incluyeron 7 rutas relacionadas con el metabolismo de lípidos, el ritmo circadiano y el metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450. Las rutas comunes en los dos grupos de hembras fueron: ritmo circadiano, metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450, secreción biliar; metabolismo de prolina y arginina (biosíntesis de aminoácidos) y carcinogénesis química. La ruta de carcinogénesis química implicó los mismos genes que el metabolismo de xenobióticos. No se pudieron determinar rutas comunes en los machos ya que en el grupo del estudio A no se obtuvieron rutas diferenciales. En los tres grupos, incluidas los dos grupos de hembras y machos del estudio B, se obtuvieron cuatro GDE (Figura 43) y, sin embargo, las rutas celulares comunes fueron ritmo circadiano, metabolismo de xenobióticos y secreción biliar.

Tabla 19. Análisis de las rutas metabólicas sobrerrepresentadas en las hembras del Estudio A alimentadas con dieta MG.

Id. Ruta	Descripción de la ruta	Nº genes	q valor
4710	<i>Circadian rhythm</i>	6	0,00000
980	<i>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</i>	5	0,00103
4976	<i>Bile secretion</i>	5	0,00207
1100	<i>Metabolic pathways</i>	17	0,00353
330	<i>Arginine and proline metabolism</i>	4	0,00880
982	<i>Drug metabolism - cytochrome P450</i>	4	0,00880
1230	<i>Biosynthesis of amino acids</i>	4	0,01750
5204	<i>Chemical carcinogenesis</i>	4	0,01750
4975	<i>Fat digestion and absorption</i>	3	0,02940

Tabla 20. Análisis de las rutas metabólicas sobrerrepresentadas en las hembras del Estudio B alimentadas con dieta MG. Se muestran las 30 rutas más significativas (según el q valor).

Id. Ruta	Descripción de la ruta	Nº genes	q valor
1100	<i>Metabolic pathways</i>	165	0,000000
4610	<i>Complement and coagulation cascades</i>	23	0,000000
3050	<i>Proteasome</i>	15	0,000000
5012	<i>Parkinson s disease</i>	26	0,000000
190	<i>Oxidative phosphorylation</i>	25	0,000000
4141	<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	27	0,000000
5016	<i>Huntington s disease</i>	28	0,000000
4932	<i>Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)</i>	25	0,000001
1200	<i>Carbon metabolism</i>	20	0,000001
5010	<i>Alzheimer s disease</i>	26	0,000001
830	<i>Retinol metabolism</i>	15	0,000007
260	<i>Glycine, serine and threonine metabolism</i>	11	0,000011
330	<i>Arginine and proline metabolism</i>	13	0,000019
1230	<i>Biosynthesis of amino acids</i>	15	0,000019
1120	<i>Microbial metabolism in diverse environments</i>	21	0,000099
4146	<i>Peroxisome</i>	14	0,000145
100	<i>Steroid biosynthesis</i>	7	0,000247
4142	<i>Lysosome</i>	17	0,000362
5150	<i>Staphylococcus aureus infection</i>	10	0,000379
980	<i>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</i>	11	0,000394
130	<i>Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis</i>	5	0,000466
564	<i>Glycerophospholipid metabolism</i>	14	0,000489
4975	<i>Fat digestion and absorption</i>	9	0,000594
4976	<i>Bile secretion</i>	12	0,000596
5204	<i>Chemical carcinogenesis</i>	12	0,001000
250	<i>Alanine, aspartate and glutamate metabolism</i>	8	0,001230
5133	<i>Pertussis</i>	11	0,001390
5169	<i>Epstein-Barr virus infection</i>	22	0,001390
270	<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	8	0,001670
280	<i>Valine, leucine and isoleucine degradation</i>	9	0,001720

Tabla 21. Análisis de las rutas metabólicas sobrerrepresentadas en los machos del Estudio B alimentados con dieta MG.

Id. Ruta	Descripción de la ruta	Nº genes	q valor
1100	<i>Metabolic pathways</i>	37	0,000033
564	<i>Glycerophospholipid metabolism</i>	8	0,001660
4610	<i>Complement and coagulation cascades</i>	7	0,001660
4976	<i>Bile secretion</i>	6	0,014000
4710	<i>Circadian rhythm</i>	4	0,019000
561	<i>Glycerolipid metabolism</i>	5	0,022800
980	<i>Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450</i>	5	0,022800
4141	<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	8	0,030800
5169	<i>Epstein-Barr virus infection</i>	9	0,030800

Con el fin de visualizar la interacción de todas estas rutas metabólicas sobrerepresentadas se construyó un mapa de interacción proteína-proteína con el programa String v 10 (*Functional Protein Association Network*; www.string-db.org) usando la lista de genes diferenciales de cada sexo. Tanto en machos como en hembras alimentados con dieta MG se observó un clúster de proteínas que correspondieron al núcleo molecular del reloj circadiano (en sombreado rojo, Figura 46 y Figura 47); inclusive en los machos alimentados con dieta MG del estudio B, que no presentaron categorías funcionales sobrerepresentadas, aparecieron proteínas del reloj circadiano.

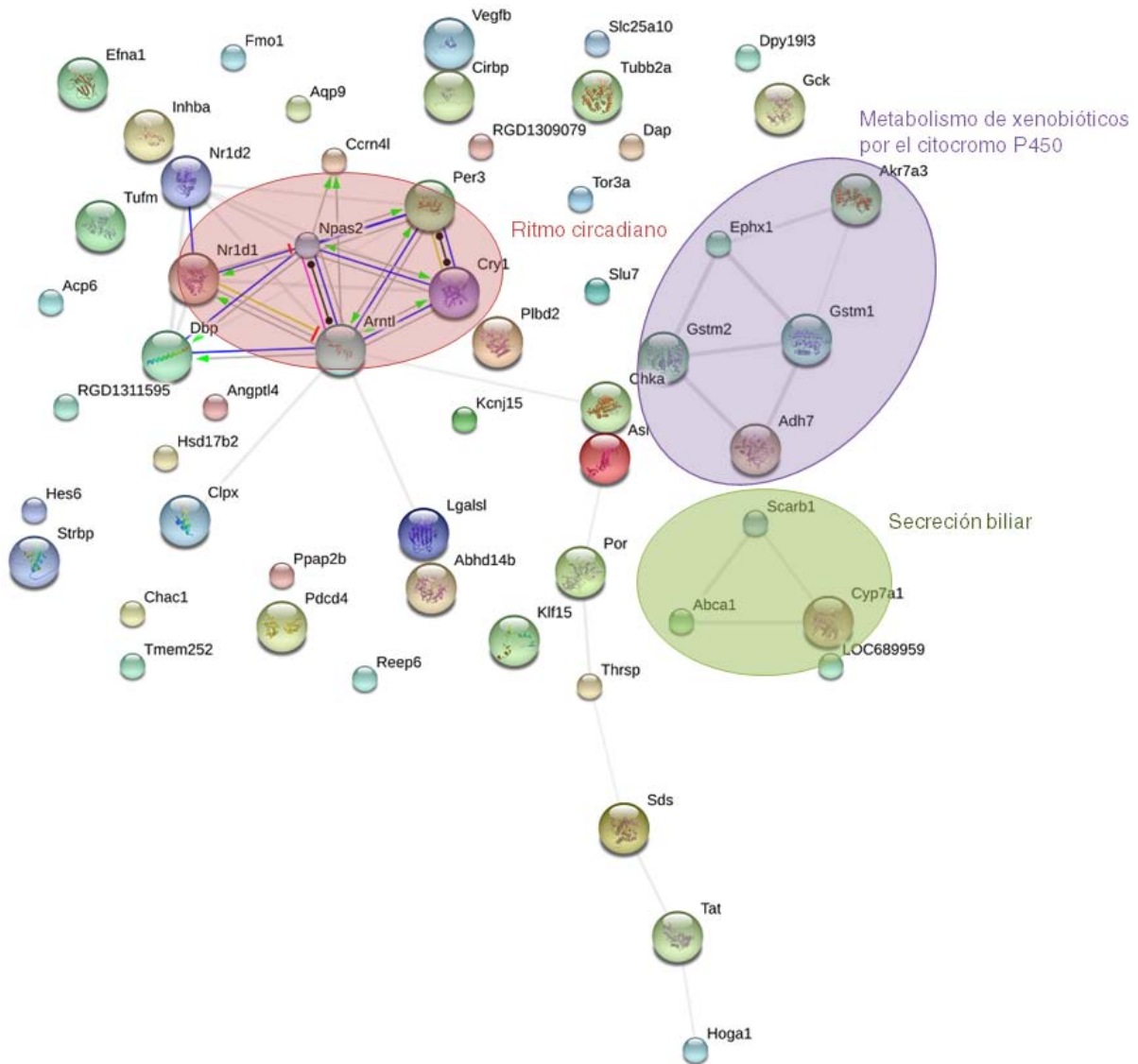


Figura 46. Mapa de interacción de las proteínas diferenciales en los dos grupos de hembras que recibieron dieta MG en el ensayo de 90 días.

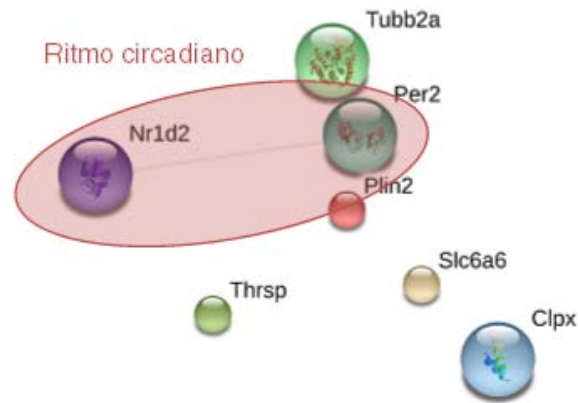


Figura 47. Mapa de interacción de las proteínas diferenciales en los dos grupos de machos que recibieron dieta MG en el ensayo de 90 días.

En resumen, el ritmo circadiano parece ser un proceso diferencial conservado en los cuatro grupos de ratas alimentadas durante 90 días con un 33% maíz MG. El ritmo circadiano es un proceso biológico interno, que permite mantener un ritmo de 24 horas aproximadamente de los procesos celulares para sincronizarlos con el ambiente exterior. Esta organización temporal es básica para mantener la homeostasis, así como la adaptación fisiológica a las señales medioambientales como la luz o la comida. En los mamíferos, esta organización es generada y mantenida de manera endógena por el reloj biológico, el núcleo supraquiasmático, formado por un clúster de unas 20.000 neuronas localizadas en el hipotálamo (Tahara y Shibata 2016). A nivel molecular, tanto en el cerebro como en los tejidos periféricos, los productos del reloj son generados por un el bucle de retroalimentación de transcripción y traducción formado por genes que producen proteínas que oscilan para inducir o reprimir la transcripción de otros genes. De manera resumida, los productos proteicos de los genes del núcleo molecular del reloj Clock (*circadian locomotor output cycles kaput*) y Arntl1 (*Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1*) heterodimerizan, se traslocan al núcleo y se unen a los promotores E-box de los genes diana *per1* y *per2* (*period*); y *cry1* y *cry2* (*cryptochrome*) para iniciar su transcripción. Las proteínas Per y Cry se dirigen al núcleo, interaccionan con Clock/Arntl1 e inhiben su propia transcripción. El complejo Per/Cry finalmente se degrada vía la fosforilación por quinasas de caseína, liberando el Clock/Arntl1 de la inhibición. Este proceso dura aproximadamente 24h (Harmer *et al.* 2001). Se han detectado, en hígado de ratón, varios miles de proteínas con sitios de unión CLOCK, la mayoría de las cuales exhiben variaciones día-noche, sugiriendo una regulación metabólica extensiva de las funciones de Clock y otros componentes del reloj (Yoshitane *et al.* 2014). Además, existen otros bucles de retroalimentación: la transcripción de Arntl1 y Cry1 está reprimida por Rev-Erb α y Rev-Erb β que son activados por Ror α , β y γ . Los genes de las familias *rev-erb* y *ror* son regulados positivamente por Clock y Bmal1 (Tahara y Shibata 2016).

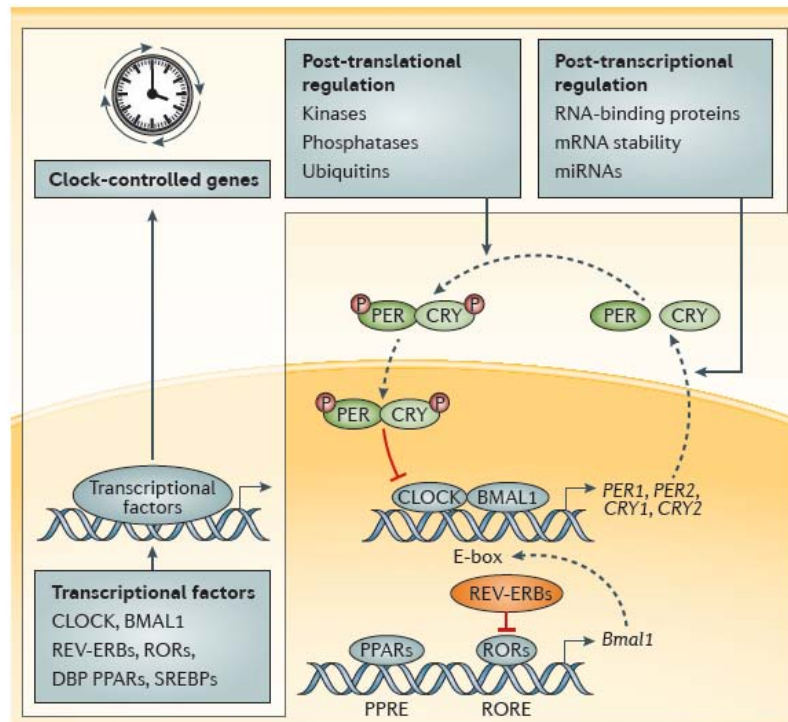


Figura 48. Núcleo molecular del reloj circadiano. Los bucles de retroalimentación de transcripción y traducción de los genes y proteínas como CLOCK, BMAL1, PER y CRY forman el núcleo de la maquinaria molecular del reloj circadiano. Una regulación postraduccional y post transcripción ayuda a mantener oscilaciones circadianas robustas. Para controlar la oscilación de funciones fisiológicas, la expresión de muchos factores de transcripción muestra una fluctuación día-noche. Estas dianas son los genes controlados por el reloj: BMAL1 (o ARNTL1), CLOCK, CRY, DBP, PER, PPARs, PPRE, RORs, SREBPs y miRNAs. [Fuente: (Tahara y Shibata, 2016)].

El gen *arntl* salió diferencialmente sobreexpresado en las hembras alimentadas con maíz MG; y en machos, aunque no fuera diferencial, presentó el mismo comportamiento. Por otro lado, el gen *clock*, cuyo producto dimeriza con *Arntl*, también presentó el mismo patrón, aunque este gen no se detectó como diferencial en ningún grupo (Tabla 22). El gen *cry1* también presentó niveles de expresión significativamente altos en los grupos MG; sin embargo, los genes *per* (*per2* y *per3*) fueron inhibidos en los dos grupos de hembras y machos MG. El resto de genes relacionados con procesos circadianos presentaron niveles de expresión reprimidos o inducidos en los animales alimentados con pienso MG (Tabla 22).

El comportamiento de los niveles de expresión de estos genes en los grupos MG y control coincidió con la hora de sacrificio de los animales. Las ratas habían sido sacrificadas siguiendo un patrón mañana – tarde (Tabla 23) para los grupos alimentados con maíz transgénico y el control respectivamente. Por tanto, estas diferencias metodológicas se reflejaron en los diferentes patrones de acumulación de los genes relacionados con procesos circadianos. Todas las ratas fueron alimentadas por última vez la noche anterior al día del sacrificio (Zeljenková *et al.* 2014). Por tanto, los grupos que se sacrificaron por la tarde (grupos control) habrían estado más de 12 horas en ayuno. La ingesta y el ayuno son señales que regulan el reloj y el metabolismo energético de tejidos como el hígado y músculo (Reznick *et al.* 2013; Tahara y Shibata 2016) y esto se ve perfectamente reflejado en el comportamiento de los genes del reloj (Tabla 22). Además, el rango horario del sacrificio fue más amplio en las hembras que en los machos. Esto podría explicar las diferencias obtenidas entre los grupos y por qué en hembras las diferencias detectadas fueron mayores.

Tabla 22. Valores de expresión de los genes diferenciales del reloj circadiano. En rojo se representan los genes inducidos en los grupos MG y en azul los genes reprimidos.

Gen	♀♀		♂♂		♀♀		♂♂	
	67mg_90d	48mg_90d	67mg_90d	48mg_90d	66_9_0d	16_9_0d	66_9_0d	16_9_0d
<i>arntl</i> (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like)	7.39	6.26	6.82	6.27	5.79	5.18	4.93	5.12
<i>clock</i> (clock circadian regulator)	9.24	8.68	9.36	8.88	4.16	3.75	3.69	3.89
<i>per2</i> (period circadian clock 2)	7.52	8.05	6.63	7.67	7.58	7.78	8.92	9.04
<i>per3</i> (period circadian clock 3)	4.15	4.81	4.07	4.90	5.26	6.76	6.48	7.45
<i>cry1</i> (cryptochrome circadian clock 1)	9.27	8.11	8.96	8.08	7.13	6.62	7.81	7.07
<i>bhlhe41</i> (basic helix-loop-helix family, member e41)	4.23	4.34	4.36	4.10	5.82	5.33	5.31	5.26
<i>dbp</i> (D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein)	5.06	4.55	4.48	4.46	8.99	8.47	8.74	8.65
<i>nr1d1</i> (nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1)	5.42	5.16	5.96	5.66	8.95	8.38	7.82	8.16
<i>nr1d2</i> (nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2)	7.15	5.51	7.23	5.64	3.98	4.10	5.31	4.91
<i>ccn4l</i> (CCR4 carbon catabolite repression 4-like (<i>S. cerevisiae</i>))	8.51	6.96	7.56	7.99	9.52	8.91	8.90	8.58
<i>nr1d2</i> (nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2)	8.53	7.57	8.77	7.94	3.98	4.10	5.31	4.91
<i>npas2</i> (neuronal PAS domain protein 2)	8.23	9.03	8.88	8.92	6.85	6.80	5.98	6.09
<i>hnrnpu</i> (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U)	7.40	9.07	7.59	9.03	10.91	10.77	10.14	10.47
<i>rasd1</i> (RAS, dexamethasone-induced 1)	7.66	9.22	6.95	8.82	6.71	7.31	5.77	7.38
<i>ogt</i> (O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase)	9.46	9.34	9.51	9.16	5.11	5.27	4.94	5.24
<i>inhba</i> (inhibin beta-A)	10.96	10.28	11.02	10.07	7.13	6.92	6.72	7.04

Tabla 23. Horario de sacrificio de las ratas del ensayo de 90 días.

	MG		Control	
	♀♀	♂♂	♀♀	♂♂
Estudio A	mañana	mañana	tarde	tarde
Estudio B	mañana	mañana	tarde	tarde

Las regulaciones circadianas juegan un papel importante en el metabolismo del hígado, ya que el anabolismo y catabolismo de nutrientes (glucosa, ácidos biliares, lípidos o colesterol) o xenobióticos están sujetos a un control temporal (Tahara y Shibata 2016). Por este motivo otros procesos celulares como la secreción biliar y el metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450 saldrían desregulados en los cuatro grupos alimentados con dieta MG. Los procesos de secreción biliar están inhibidos en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG, así como los procesos relacionados con metabolismo de xenobióticos por el citocromo P450. Los ácidos biliares median la absorción de nutrientes, vitaminas y grasas de la dieta. Se sintetizan exclusivamente en el hígado a partir del colesterol mediante el enzima *Cyp7A1* (*cholesterol 7 α -hydroxylase*). El proceso de síntesis de ácidos biliares está regulado por la disponibilidad de nutrientes, receptores nucleares para controlar la homeostasis del colesterol y lípidos (Chiang 1998). El citocromo

P450 (Cyp) constituye una familia enzimática capaz de catalizar una biotransformación oxidativa de muchos fármacos y xenobióticos lipídicos (Zanger y Schwab 2013). En los animales alimentados con pienso MG se dio una inhibición de los genes relacionados con el metabolismo de xenobióticos, aunque el núcleo de genes Cyp no salieron diferenciales (Anexo VI). Los resultados obtenidos indicaron que los grupos de animales, machos y hembras, presentaron distintos patrones de expresión de los genes hepáticos del reloj circadiano y que coincidió con el patrón de la toma de la muestra. Como ya se ha comentado, los ritmos circadianos son oscilaciones internas de procesos fisiológicos que siguen una fluctuación día-noche y por consiguiente, muchas rutas metabólicas siguen un proceso rítmico. Por ejemplo, el metabolismo de xenobióticos está influenciado por las fluctuaciones circadianas de los flujos sanguíneos y de las actividades enzimáticas (Tahara y Shibata 2016). Además, otras funciones vitales del hígado están reguladas de manera circadiana como el metabolismo de glucosa, lípidos y ácidos biliares; por tanto, una descompensación de estos genes podría indicar que existen patologías severas (cirrosis, hepatitis, cáncer) (Ferrell y Chiang 2015). Por tanto, los grupos control de este ensayo de toxicidad no fueron comparables a los grupos tratamientos. Este hecho, podría explicar por qué en el grupo de hembras del estudio B (48mg_90d versus 16_90d) se obtuvieron cerca de 1.400 GDE y relacionados con enfermedades. Ninguna de las diferencias observadas, pues, se pudo atribuir a los efectos causados por la ingesta de maíz MON810. Para estudiar en detalle las rutas metabólicas relacionadas con hepatotoxicidad y daño celular hepático, así como para validar el experimento de *microarray*, se realizó un análisis de expresión diferencial dirigida (ver apartado “Expresión génica de marcadores seleccionados” más adelante)

b) Análisis por *microarray* en el ensayo de toxicidad crónica de 1 año

En el estudio de toxicidad crónica realizado durante un año, se alimentaron grupos de ratas con una dieta a base de un 33% de maíz producido por Monsanto y cultivado durante el año 2013. El esquema seguido para el análisis de expresión diferencial fue igual al ensayo de 90 días (ver Tabla 17), mediante *microarray* de Affymetrix, y se utilizaron los mismos programas de análisis de datos, criterios estadísticos de normalización, tasas de cambio y niveles de significancia estadística. Primero se obtuvieron los números de genes diferenciales entre todos los grupos testados (Figura 49). En este caso, el rango de GDE obtenidos varió entre 5 y 431, suponiendo más de cuatro veces menos que las detectadas en el estudio A del ensayo de 90 días (Figura 42). Además, los grupos de hembras y machos 67mg_1a presentan solo y GDE, que supusieron hasta el 0,02% de los genes totales. Igual que en el caso del ensayo de 90 días, las diferencias mayores se detectaron entre diferentes sexos (hasta el 1,4%).

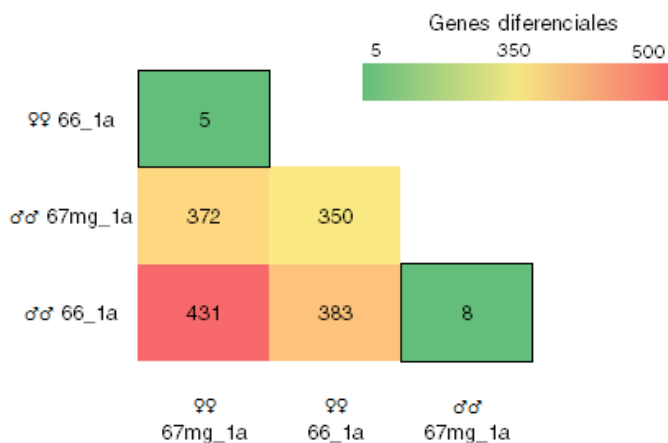


Figura 49. Número de genes diferenciales de cada grupo de ratas analizados del ensayo de 1 año. Las casillas sombreadas representan las diferencias entre los grupos alimentados con maíz MG y control del mismo estudio y mismo sexo.

A continuación, y para identificar genes diferenciales con relevancia estadística y biológica se corrigieron los p valores por el método FDR, igual que en los de 90 días. En el ensayo de un año, seleccionando criterios de significancia $q < 0,05$ y $FC \geq 2$ no se obtuvieron GDE en ninguno de los grupos alimentados con maíz MG en machos y hembras. Estos resultados indicaron que los transcriptomas de los hígados de las ratas alimentadas con dieta MG durante 1 año no presentaron diferencias significativas. Esto ya se había intuido en la exploración inicial de la variabilidad (Figura 39 y Figura 40 en el apartado “Variabilidad de los perfiles transcriptómicos de hígados de ratas”).

Los resultados obtenidos de este ensayo indicarían que, ciertamente, las diferencias observadas en el ensayo de 90 días se debieron al patrón de muestreo mañana-tarde. Las ratas del ensayo de 1 año estuvieron expuestas a la dieta MG durante un tiempo largo, considerado crónico, en función de las expectativas de vida de las mismas. Por tanto, se debería haber manifestado cualquier efecto de daño celular hepático debido a la ingesta de maíz MON810 en este período de tiempo.

ii. Expresión génica de marcadores seleccionados

Para estudiar en detalle cualquier efecto provocado por la dieta transgénica sobre los transcriptomas del hígado de rata que no se hubieran podido detectar por el perfil transcriptómico general, se realizó un análisis de expresión dirigido de genes marcadores de toxicidad hepática y daño celular. Se diseñó un panel de 91 genes (88 marcadores más 3 genes endógenos) con temperaturas de hibridación similares (T_m aproximada $=60^\circ\text{C}$) para establecer un protocolo de RT-qPCR. Este experimento permitió, además, la validación del experimento de *microarray*. La expresión cuantitativa se realizó utilizando *Fluidigm 48x48 Dynamic Array* (Fluidigm, San Francisco, CA). La cuantificación relativa se realizó en base al método de la curva estándar con el programa *Data Analysis Gene Expression* (Ballester *et al.* 2013). Todas las reacciones de PCR tuvieron eficiencias cercanas a 1 y los coeficientes de regresión, $R > 0,95$. La respuesta a la toxicidad provocada por algún compuesto externo implica la desregulación de cierto número de genes y alteración de rutas metabólicas. Estas rutas metabólicas generalmente hacen referencia a metabolismo de xenobióticos, colestasis, esteatosis y cáncer. Además, se sabe que todas estas vías están específicamente interconectadas. Por este motivo, los 88 genes seleccionados pertenecen a una – o varias - de estas rutas (Figura 50).

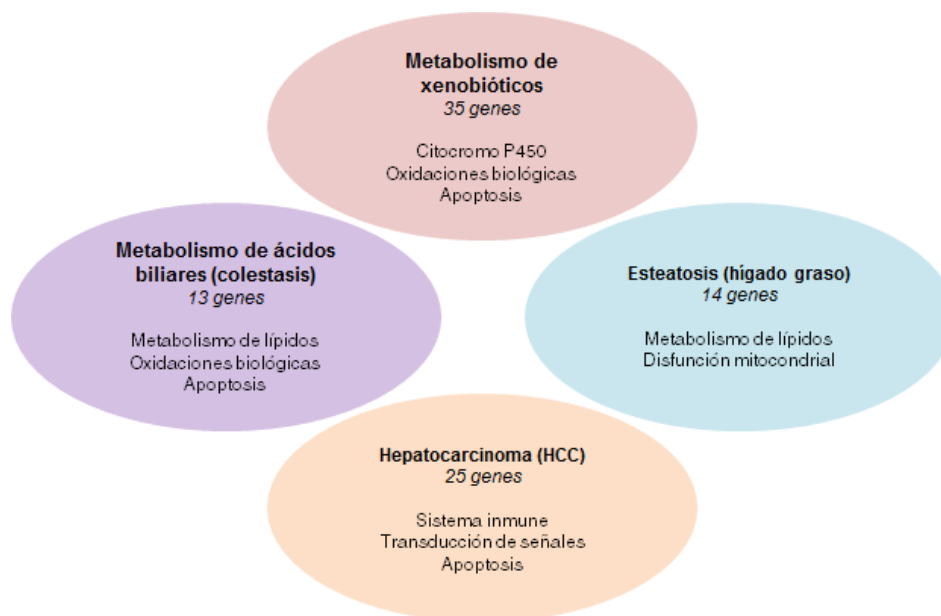


Figura 50. Rutas metabólicas principales relacionadas en la respuesta a sustancias tóxicas en el hígado.

a) Expresión génica dirigida en el ensayo de toxicidad de 90 días

El sistema de qPCR no se pudo poner a punto para 19 de los 88 genes marcadores analizados en el ensayo de 90 días. Los genes sin expresión detectable correspondieron a: genes de metabolismo de xenobióticos (4), marcadores de colestasis (4), de cáncer (9) y de esteatosis (2). Aun con todo, se pudo evaluar el estado de las rutas ya que todas éstas estuvieron representadas por varios genes con expresión detectable. Los valores de expresión relativos de los 69 genes restantes se usaron para examinar las diferencias entre grupos mediante un t test. Considerando los criterios de significancia de $p < 0,05$ y $FC \geq 2$ se obtuvieron 11 y 13 diferencias en las hembras de los estudios A y B; y, 23 y 16 diferencias en los machos de los estudios A y B, respectivamente.

Metabolismo de xenobióticos

En los 31 genes analizados de la ruta del metabolismo de xenobióticos se incluyeron genes relacionados con la apoptosis, el estrés oxidativo y la carcinogénesis química. En las hembras del estudio A (♀♀ 67mg_90d) se encontraron 7 genes diferencialmente reprimidos (Figura 51). En las hembras del estudio B, se encontraron 3 genes reprimidos y 3 sobreexpresados. Ninguno de ellos se presentó alterado en el mismo sentido en los dos grupos de hembras, indicando que la alteración no podría relacionarse con un efecto provocado por la dieta MG en las hembras. En el caso de los machos, los del estudio A (♂♂ 67mg_90d) presentaron 9 genes del metabolismo de xenobióticos sobreexpresados y 1 reprimido. En los del estudio B (♂♂ 48mg_90d) en cambio, se obtuvieron 6 genes sobreexpresados y 1 reprimido (Figura 51). En los dos grupos de machos alimentados con dieta MG los genes *cyp2b1* y *cyp2d4* se detectaron sobreexpresados significativamente, pero estos cambios no fueron consistentes en las hembras (Tabla 24), lo cual se explica porque estos genes presentan dimorfismo sexual (www.ebi.ac.uk). Estos niveles de expresión se correspondieron con los del experimento de *microarray*. Estos dos genes, pertenecen a la superfamilia Cyp, están implicados en la cadena transportadora de electrones dependiente de NADPH en los microsomas del hígado (uniprot.org). Se sabe que se expresan de manera rítmica en ratón, con una mayor acumulación durante la fase oscura (Tahara y Shibata 2016). En general, los genes relacionados

con apoptosis y estrés oxidativo presentaron niveles de expresión muy variable y no existió ningún patrón de acumulación consistente entre dietas ni sexos (Figura 51 y Tabla 24). Tampoco se vio un patrón de acumulación en función de la hora de sacrificio (excepto *cyp2b1* y *cyp2d4*) porque estos genes no fueron dianas directas del núcleo molecular del reloj. Por tanto, los animales alimentados con maíz MON810 no presentaron signos de apoptosis, estrés celular oxidativo ni carcinogénesis química en hígado.

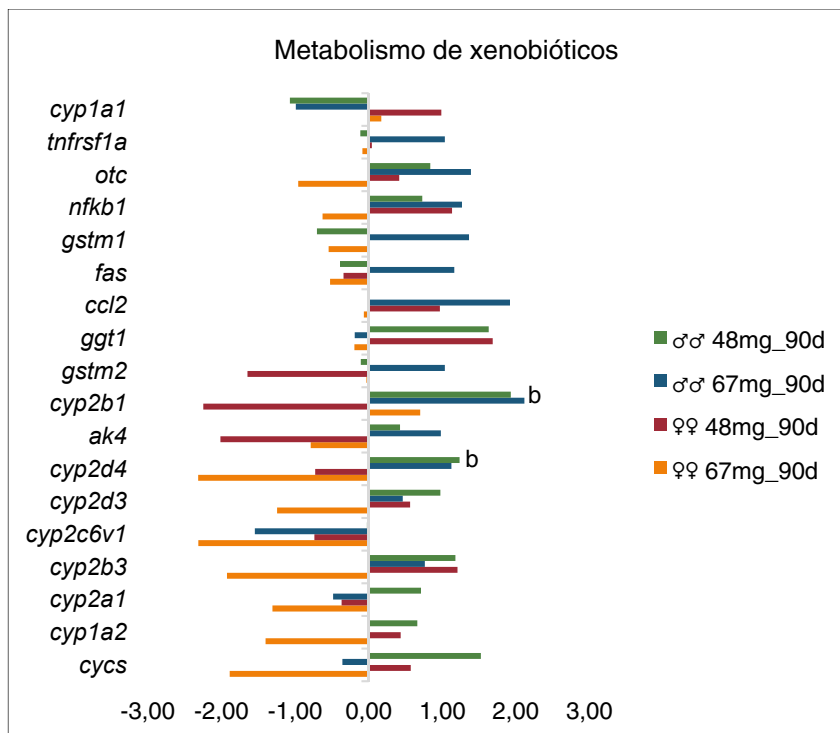


Figura 51. Expresión relativa de los genes marcadores del metabolismo de xenobióticos en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 90 días. [b: genes diferenciales comunes en los machos de los estudios A y B].

Metabolismo de ácidos biliares

El gen *cyp7a1*, es el gen principal en el metabolismo de colesterol y se expresa de manera rítmica, por regulación del factor de transcripción Rev-erb α (Tahara y Shibata 2016). En todos los grupos de ratas se vio una inhibición de *cyp7a1* (Figura 52), aunque en las hembras del estudio B (♀♀ 48mg_90d) no fue una inhibición significativa respecto al grupo control. El gen *abcb4*, que codifica un transportador de fármacos, oscila en una tasa de cambio de 2 aproximadamente durante 24h (Tahara y Shibata 2016) y se encontró sobreexpresado en los cuatro grupos, aunque en las hembras del estudio A no fuera significativo (Tabla 24). El patrón de expresión de estos dos genes coincidió con el del *microarray*, exhibiendo, por tanto, una acumulación circadiana. Como el resto de genes de la ruta no fueron alterados, no existieron signos de colestasis en las ratas alimentadas con dieta MG y además las ratas del ensayo de un año presentaron el patrón de acumulación contrario (Tabla 24).

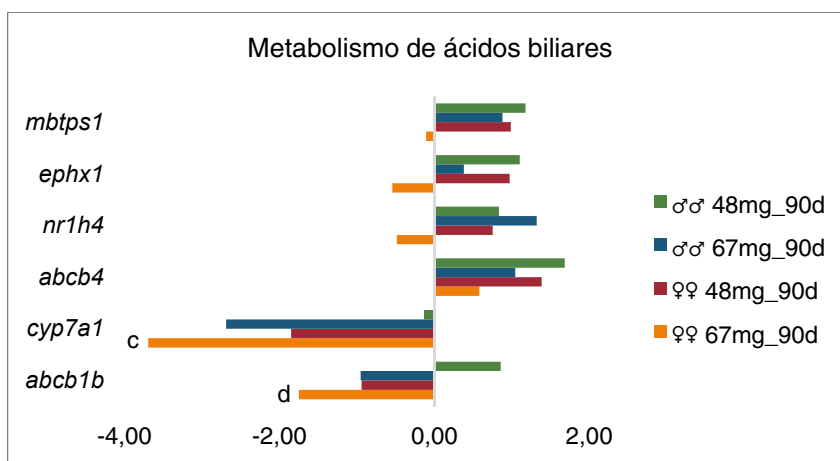


Figura 52. Expresión relativa de los genes marcadores de metabolismo de ácidos biliares en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 90 días. [c: genes diferenciales comunes en las hembras de los estudios A y B, y en los machos del estudio A; d: genes diferenciales comunes en los machos de los estudios A y B, y en las hembras del estudio B].

Hepatocarcinoma

El cáncer hepático es un cáncer maligno que puede derivar en cirrosis, y por este motivo, en el análisis de esta patología se han incluido genes transductores de señales, relacionados con la apoptosis y el sistema inmune. De los 16 genes que se analizaron todos presentaron valores muy variables en los cuatro grupos de ratas analizadas y no se vio un patrón de acumulación relacionado con la dieta, el estudio o el sexo (Tabla 24). Los genes *gpc3*, *psme3* y *ldha* fueron diferencialmente acumulados en las hembras estudio B y en los dos grupos de machos (Figura 53) validando la expresión observada en el *microarray*. El gen *gpc3* está implicado en la regulación del crecimiento celular, desarrollo, diferenciación y migración. La expresión esta acumulada en tejidos tumorales (Fujiyama *et al.*, 2001). La *ldha* está relacionada con estrés oxidativo y sobreexpresado en tumores (Zou *et al.* 2010) y el *psme3* codifica por la subunidad 3 del complejo activador de proteasoma y se encuentra sobreexpresado en tumores. No se expresó el gen marcador tumoral *afp*, ni los factores de transcripción *tnfa*, *mdka* ni las interleucinas relacionadas con el sistema inmune. Además, las exanimaciones necroscópicas e histopatológicas de los grupos del ensayo de 90 días no revelaron ningún tejido tumoral (Zeljénková *et al.* 2014).

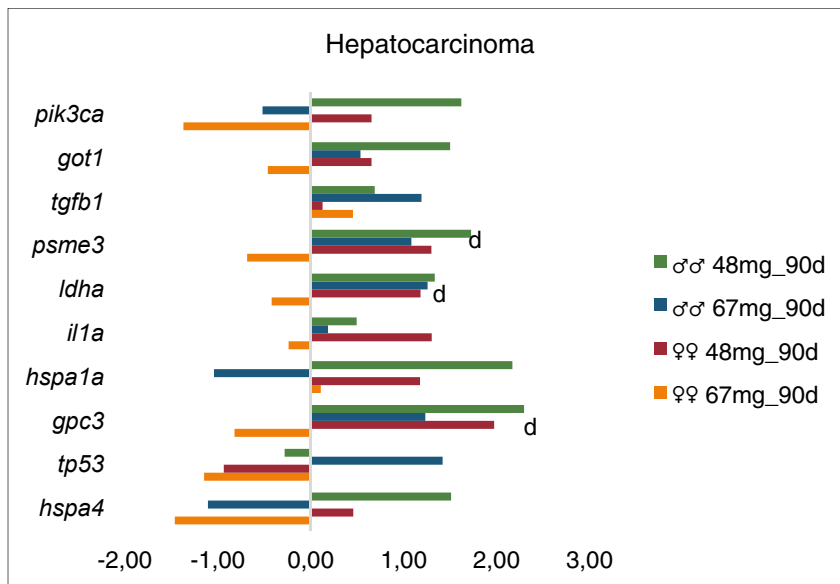


Figura 53. Expresión relativa de los genes marcadores de cáncer hepático en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 90 días. [d: genes diferenciales comunes en los machos de los estudios A y B, y en las hembras del estudio B]

Esteatosis

La esteatosis hepática implica una excesiva acumulación lipídica intracelular en forma de gotas lipídicas citosólicas. Esta puede estar inducida por condiciones como la sobrealimentación, la diabetes o el tratamiento por fármacos (Sahini *et al.* 2014). La esteatosis implica una disfunción mitocondrial debido al metabolismo de ácidos grasos alterado. De los 12 genes testados relacionados con la esteatosis, solamente se vieron 3 genes significativamente sobreexpresados en los machos del estudio A (♂♂ 67mg_90d) (Figura 54). Este grupo presentó niveles de triglicéridos y colesterol altos en los análisis bioquímicos (Zeljenková *et al.* 2014) pero no presentó ninguna ruta metabólica sobrerrepresentada en el análisis de *microarray* (ver “Análisis por *microarray* en el ensayo de toxicidad aguda de 90 días” en la p. 118). Ningún otro grupo presentó genes de la ruta alterados (Tabla 24), por tanto, no existió un daño por esteatosis provocado por la dieta MG.

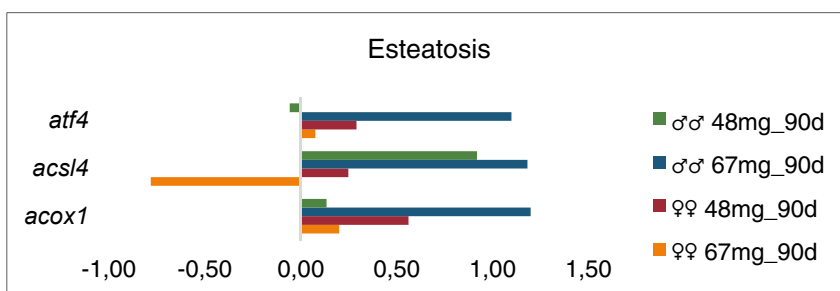


Figura 54. Expresión relativa de los genes marcadores de esteatosis en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG.

Tabla 24. Valores de expresión de los genes diferencialmente expresados en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG respecto al control. Los niveles de expresión significativos se muestran en azul (inhibición) y en rojo (acumulación).

Gen	Ensayo 90 días				Ensayo 1 año		
	♀♀ 67mg_90d	♀♀ 48mg_90d	♂♂ 67mg_90d	♂♂ 48mg_90d	♀♀ 67mg_1a	♂♂ 67mg_1a	
Metabolismo xenobióticos	cycs	-1,89	0,57	-0,35	1,52	4,48	no detectado
	cyp1a2	-1,40	0,44	0,01	0,66	0,70	0,35
	cyp2a1	-1,30	-0,37	-0,48	0,71	5,55	1,06
	cyp2b3	-1,92	1,21	0,76	1,18	0,09	-1,67
	cyp2c6v1	-2,31	-0,74	-1,54	-0,02	0,25	-0,30
	cyp2d3	-1,24	0,57	0,46	0,98	4,04	no detectado
	cyp2d4	-2,31	-0,73	1,13	1,24	1,25	-0,93
	ak4	-0,79	-2,01	0,98	0,43	-0,36	-0,24
	cyp2b1	0,07	-2,24	2,12	1,93	-1,07	-0,31
	gstm2	-0,03	-1,64	1,04	-0,11	0,01	2,49
	ggt1	-0,19	1,69	-0,19	1,63	1,00	no detectado
	ccl2	-0,06	0,97	1,92	-0,02	-0,12	0,37
	fas	-0,52	-0,34	1,16	-0,39	0,67	-1,75
	gstm1	-0,54	no detectado	1,36	-0,70	-0,13	0,26
	nfkb1	-0,62	1,13	1,27	0,73	2,97	no detectado
	otc	-0,96	0,42	1,39	0,84	0,17	0,60
	tnfrsf1a	-0,08	0,04	1,04	-0,11	2,64	no detectado
	cyp1a1	0,17	0,99	-0,99	-1,07	1,59	-2,85
	casp12	-0,19	0,49	0,38	0,23	-1,30	0,60
	casp3	-0,71	0,52	0,92	-0,69	-2,62	-1,86
casp7	no detectado				-1,81	0,82	
cyp3a1	-0,29	-0,21	-0,48	0,56	-0,71	1,87	
Metabolismos ácidos biliares	abcb1b	-1,75	-0,94	-0,95	0,85	2,10	1,82
	cyp7a1	-3,70	-1,85	-2,69	-0,13	3,55	no detectado
	abcb4	0,58	1,39	1,04	1,68	-0,73	0,37
	nr1h4	-0,49	0,75	1,32	0,83	-0,40	-0,28
	ephx1	-0,54	0,97	0,38	1,10	0,77	0,37
	mbtps1	-0,11	0,99	0,88	1,17	-0,87	-0,08
	abcg5	-0,06	0,40	-0,70	0,73	3,59	-2,18
	scarb1	-1,60	-0,04	0,00	1,09	5,17	1,31
	slc10a1	-0,26	-0,77	0,95	0,37	0,15	1,24
Cáncer hepático	hspa4	-1,46	0,46	-1,10	1,51	2,50	no detectado
	tp53	-1,15	-0,93	1,42	-0,28	-0,86	-1,98
	gpc3	-0,82	1,97	1,23	2,29	-0,14	-0,88
	hspa1a	0,11	1,18	-1,04	2,17	0,08	-0,44
	il1a	-0,24	1,30	0,18	0,49	7,00	no detectado
	ldha	-0,42	1,18	1,26	1,33	3,09	no detectado
	psme3	-0,68	1,30	1,08	1,73	0,15	-0,61
	tgfb1	0,45	0,13	1,19	0,69	-0,30	-0,01
	got1	-0,46	0,65	0,54	1,50	0,41	-0,61
	pik3ca	-1,37	0,65	-0,52	1,62	3,03	-0,61
ctnnb1	-1,70	-0,43	-0,59	0,34	-0,66	-1,85	
Esteatosis	acox1	0,20	0,56	1,20	0,13	0,63	0,23
	acsl4	-0,78	0,25	1,18	0,92	4,50	0,42
	atf4	0,08	0,29	1,10	-0,06	1,14	0,14
	acat1	-0,43	0,22	1,00	-0,24	3,58	-1,51
	nr1h3	-0,35	0,46	0,87	0,24	1,14	0,59
	xbp1	-0,31	0,23	0,95	-0,91	1,14	3,25

b) Expresión génica dirigida en el ensayo de toxicidad de 1 año

En el grupo de ratas del ensayo de 1 año, se testaron los mismos genes marcadores que en las del ensayo de 90 días. De los 88 genes testados, 14 no se expresaron en ningún grupo de animales que correspondieron a 1 gen del metabolismo de xenobióticos, 4 marcadores de colestasis, 8 de cáncer y 1 de esteatosis. Las diferencias de expresión de los 74 genes se testaron mediante un t test. Considerando los criterios de significancia de $p < 0,05$ y $FC \geq 2$ se obtuvieron 17 y 12 genes diferenciales en las hembras y machos, respectivamente.

Metabolismo de xenobióticos

De los 34 genes del metabolismo de xenobióticos testados, en el grupo de hembras 4 fueron inhibidos y 5 sobreacumulados. En los machos, fueron 3 inhibidos y 3 sobreexpresados. Los genes *casp3*, *casp7* y *casp12* se encontraron inhibidos en las hembras 67mg_1a (Figura 55). Estos genes pertenecen a la familia de caspasas y se acumulan en los procesos celulares apoptóticos. Este resultado podría indicar que las rutas apoptóticas estarían reprimidas en las ratas que recibieron la dieta MG, respecto a las que recibieron maíz convencional. Sin embargo, el gen *cycs*, que codifica el citocromo c, se encuentra sobreacumulado en las mismas hembras que recibieron la dieta MG. Esto resta relevancia biológica a este resultado debido a que altos niveles de *cycs* pueden responder a estrés mitocondrial, que acabaría liberando el citocromo al citoplasma, activando las rutas de apoptosis (*casp3/7*) vía caspasa 9. Por otro lado, los genes *cyp1a1*, *cyp2a1*, *cyp2d3* y *cyp2d4* fueron inducidos en las hembras que recibieron dieta MG, mostrando un patrón de expresión típico de estrés hepático relacionado con la exposición a xenobióticos o con un estrés oxidativo. Los machos que recibieron la dieta MG, no presentaron estos genes sobreacumulados, ni los genes del citocromo P450 reprimidos (*cyp2b3* y *cyp3a1*) ya que algunos genes del citocromo presentan una expresión variable según el sexo (Figura 55). Estos resultados indicarían una expresión variable de estos genes entre grupos y muy probablemente no asociada a la alimentación con la dieta MG.

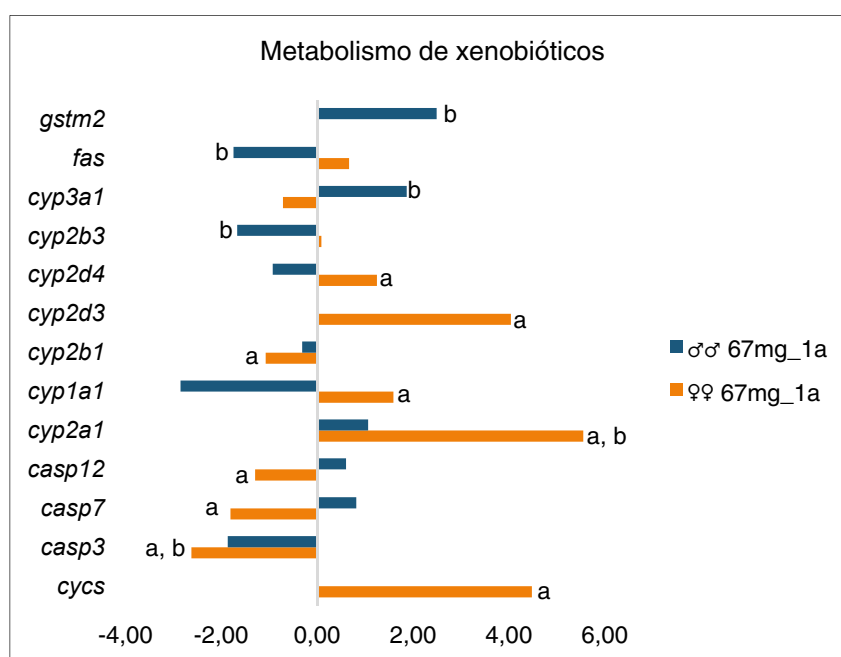


Figura 55. Expresión relativa de los genes marcadores de metabolismo de xenobióticos en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 1 año. [a: genes diferenciales en hembras; b: genes diferenciales en machos].

Metabolismo de ácidos biliares

Los genes *slc10a1*, *scarb1*, *abcg5* y *abcb1b*, del metabolismo de ácidos biliares, presentaron niveles de expresión altos tanto en machos como hembras alimentados con maíz MG (Figura 56). Sin embargo, se ha descrito que los genes *slc10a1* y *abcg5* se encuentran inhibidos en los casos de patologías hepáticas (genevisible.com, www.ebi.ac.uk/gxa). Todos estos genes están íntimamente relacionados con el metabolismo del colesterol, su absorción en la dieta y su liberación vía biliar a la sangre, así como en la distinción y selección del colesterol del resto de esteroides como los derivados de plantas (Jozefczuk *et al.* 2012; Sahini *et al.* 2014; Tahara y Shibata 2016). Sin embargo, los datos bioquímicos indicaron que todos los animales, tanto los alimentados con maíz MG como convencional, presentaron niveles de colesterol normales (Zeljenková *et al.* 2016).

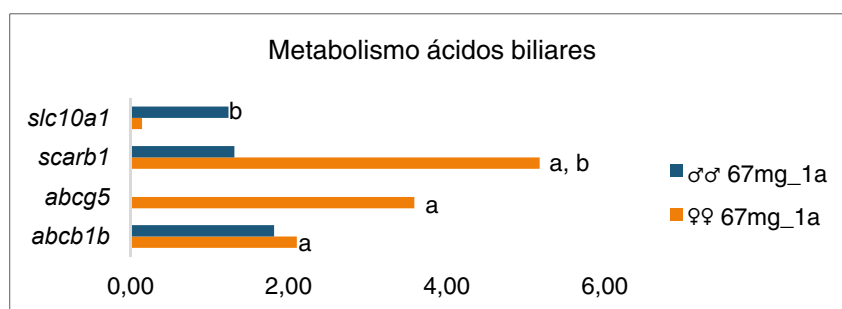


Figura 56. Expresión relativa de los genes marcadores de metabolismo de ácidos biliares en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 1 año. [a: genes diferenciales en hembras; b: genes diferenciales en machos].

Hepatocarcinoma

Los genes marcadores de cáncer hepático que salieron diferenciales fueron *ctnnb1* y *tp53* en hembras; y *pik3ca* e *il1a*, en machos. Solamente los genes *pik3ca* e *il1a* presentaron niveles de expresión elevados en el grupo de machos del ensayo de un año (♀♀ 67mg_1a) (Figura 57). El *pik3ca* es un gen oncogénico que se encuentra sobreexpresado en diferentes hepatocarcinomas (www.proteinatlas.org). El gen *il1a* codifica por una interleucina como respuesta a una inflamación aguda y se expresa en algunos procesos cancerosos (www.proteinatlas.org). La elevada expresión de estos dos genes podría indicar algún tipo de neoplasia en el hígado de los machos. En la necropsia y en los estudios histopatológicos se detectaron lesiones tumorales, sin embargo, estos también se detectaron en los grupos que recibieron la dieta control (Zeljenková *et al.* 2016). De hecho, la expresión de alguno de estos marcadores podría considerarse normal, tratándose de animales de edad avanzada.

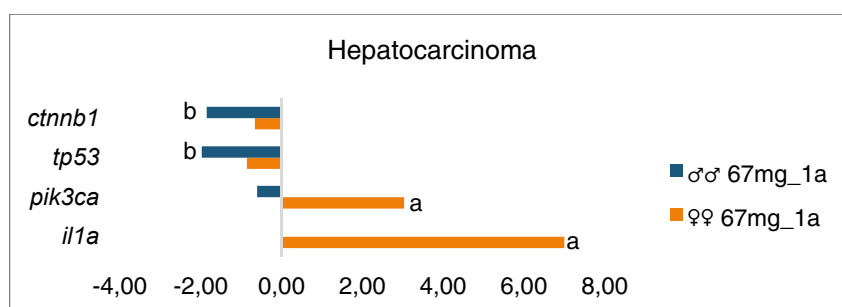


Figura 57. Expresión relativa de los genes marcadores de cáncer hepático en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 1 año. [a: genes diferenciales en hembras; b: genes diferenciales en machos].

Esteatosis

De los 13 genes de esteatosis testados, solamente 4 de ellos fueron significativamente diferenciales. Las hembras (♀♀ 67mg_1a) presentaron 3 genes (*acat1*, *acsl4* y *nr1h3*) sobreexpresados que podrían indicar una disfunción mitocondrial (Figura 58). El gen *nr1h3* es un receptor nuclear llamado receptor X hepático encargado de la homeostasis lipídica en el hígado, así como regulador de la glándula tiroidea (Christoffolete *et al.* 2010). Sin embargo, se ha visto que se sobreexpresa como respuesta a interleucina 5 en distintos procesos como puede ser el eflujo de colesterol y la prevención de arteriosclerosis por colesterol (Chen *et al.* 2012). Por tanto, podría estar relacionado con los genes sobreacumulados observados anteriormente en el metabolismo de colesterol y ácidos biliares en las mismas hembras que recibieron dieta MG. Los machos (♂♂ 67mg_1a) presentaron el gen *xbp1* sobreacumulado, que codifica por un factor de transcripción de unión a cajas X. Este gen está relacionado con estrés en retículo endoplásmico en hepatocitos (Sahini *et al.* 2014). Sin embargo, por sí solo no es suficiente para determinar un efecto negativo de la dieta MG sobre los machos, ya que el resto de genes de la ruta en machos ♂♂ 67mg_1a no se vieron alterados.

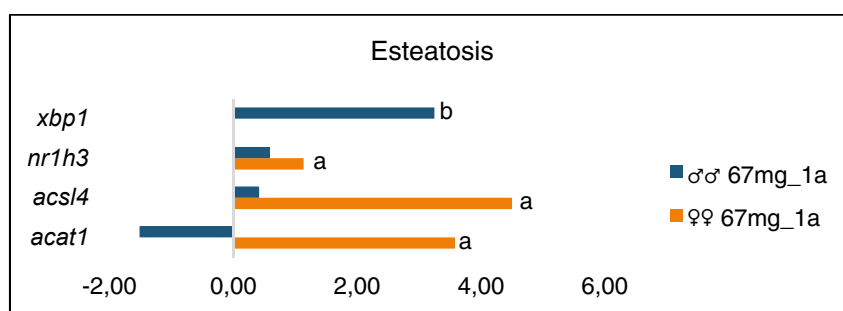


Figura 58. Expresión relativa de los genes marcadores de esteatosis en los grupos de ratas alimentadas con pienso MG durante 1 año. [a: genes diferenciales en hembras; b: genes diferenciales en machos].

En el análisis de expresión diferencial de las ratas de los ensayos de 90 días y 1 año se apreció que los resultados entre estos dos ensayos son consistentes por el hecho que la dieta no provocó daños hepáticos en los grupos alimentados con dieta MG. Se esperaría que cualquier daño severo agudo (cáncer hepático, colestasis) detectado en el estudio de 90 días, tuviera también signos en un ensayo de 1 año. En ningún caso se pudo observar este hecho. Además, las diferencias en los estudios A y B fueron grandes, indicando que las diferencias observadas se debieron a los diferentes estados fisiológicos de los animales en el momento del sacrificio debido a una irregularidad horaria. Finalmente, para considerar un efecto relevante provocado por la dieta MG, cualquier cambio debería detectarse consistentemente en los dos estudios, independientemente de la variedad de maíz usada. Aunque sí se detectaron genes individuales significativos en algunos grupos de ratas (tanto en los estudios A, B o C), en ningún caso se vieron rutas completas desreguladas. Además, todos los genes marcadores seleccionados para el análisis dirigido estuvieron interconectados pudiendo aparecer en enfermedades como cáncer, cirrosis, diabetes, colestasis o esteatosis. No obstante, la mayoría de ellos no presentaron una regulación circadiana que pudiera correlacionar con la hora de sacrificio ni con la ingesta de la dieta MG. Por otra parte, los estudios a 1 año, permiten detectar efectos toxicológicos que aparecen a largo plazo. Los resultados del análisis de expresión dirigido mostraron en hembras y machos varios genes alterados y todos ellos de expresión muy variable. No obstante, los hígados de las hembras del estudio de 1 año no presentaron alteraciones cuando

se analizaron mediante *microarray*, ni tampoco presentaron alteraciones en los análisis bioquímicos, urinarios ni histopatológicos (Zeljenková *et al.* 2016) indicando que los grupos de ratas alimentadas durante 1 año con dieta a base del 33% de maíz MON810 no manifestaron ningún efecto toxicológico respecto a las que fueron alimentadas con maíz convencional.

2.2 Proteómica de hígado de rata alimentada con maíz MON810

El análisis proteómico bidimensional (2D) permite investigar cambios biológicos en un proteoma, esto son, los cambios en los productos proteicos más abundantes en respuesta a un determinado factor interno o externo como una enfermedad, un agente tóxico o cambios del ambiente. Una de las aplicaciones más frecuentes de la proteómica 2D en animales ha sido la investigación de perfiles proteómicos alterados por un agente tóxico. En varios estudios toxicológicos (Liu *et al.* 2016; Ljunggren *et al.* 2016; Miller *et al.* 2016) la proteómica 2D ha permitido identificar proteínas que se acumulan a diferentes niveles. Además, existen herramientas importantes, como bases de datos de mapas bidimensionales de diferentes tejidos en ratón y rata (world-2dpage.expasy.org/swiss-2dpage) para investigar las correlaciones con enfermedades humanas.

En este último capítulo se realizó la proteómica 2D en hígados de rata de los estudios de toxicidad de 90 días para determinar alteraciones en los perfiles proteómicos en las ratas alimentadas con maíz MON810 respecto a las convencionales con consecuencias sobre la salud animal.

Diseño experimental

Los ensayos de toxicidad realizados en este trabajo se describen en el apartado “Transcriptómica comparativa en hígado de rata alimentada con maíz MON810 en la página 113. En la proteómica 2D se siguió el mismo diseño que en el análisis transcriptómico: se compararon los grupos control con los tratamientos en los estudios A y B en hembras y machos independientemente. Los grupos analizados y el diseño experimental se recogen en la Tabla 25.

Tabla 25. Diseño experimental del análisis proteómico en hígado de rata en el ensayo de toxicidad aguda a 90 días.

Ensayo de toxicidad	Estudio	Sexo		Dieta (33% maíz)
		Hembras (n=16)	Machos (n=16)	
90 días	Estudio A (Monsanto)	♀♀ 66_90d	♂♂ 66_90d	control
		♀♀ 67mg_90d	♂♂ 67mg_90d	MG
	Estudio B (Pioneer)	♀♀ 16_90d	♂♂ 16_90d	control
		♀♀ 48mg_90d	♂♂ 48mg_90d	MG

Se realizaron extracciones proteicas de los hígados por triplicado de un *pool* de los 16 individuos de cada grupo y se prepararon extractos proteicos totales mediante precipitación por el protocolo de *2-D Clean Up Kit* (GE Healthcare). Posteriormente se compararon los extractos de todos los grupos en geles SDS-PAGE de 7 cm con tinción de plata para determinar la calidad de los extractos proteicos, estimar la abundancia y comprobar el patrón de bandas. No se vio alterada la cantidad de proteínas totales en los hígados de los grupos alimentados con pienso MG respecto al grupo control y el patrón de bandas fue muy conservado entre replicados y grupos, lo que sugirió un buen estado de las proteínas en general.

Una vez comprobada la calidad de los extractos, se cargaron 150 µg de proteína total en geles 2D de 18 x 20 cm, realizando cuatro replicados de cada grupo. Las proteínas totales se analizaron por 2D utilizando un rango amplio de pH (3 a 11) en la primera dimensión para enfocar correctamente el máximo número de proteínas ácidas y básicas, y aumentar así el espectro del proteoma hepático analizable. Una vez finalizada la electroforesis, se visualizaron los *spots* por tinción con sales de plata. La Figura 59 muestra un ejemplo del proteoma resuelto de hígado en machos y hembras y se observa una buena resolución y enfoque de proteínas en el rango de 11-245 KDa, así como en el rango de pH de 4-10. Para el análisis de las imágenes de los geles se utilizó el programa Ludesi (www.ludesi.com), y la estimación de la abundancia relativa de las proteínas se determinó utilizando el valor del volumen normalizado de los *spots*. El protocolo ensayado permitió resolver entre 988 y 1.003 *spots*, con un promedio de 997 *spots* por gel. Para el análisis comparativo se usó todo el gel, donde se enfocaron los *spots* los cuales estuvieron consistentemente bien resueltos en todos los geles.

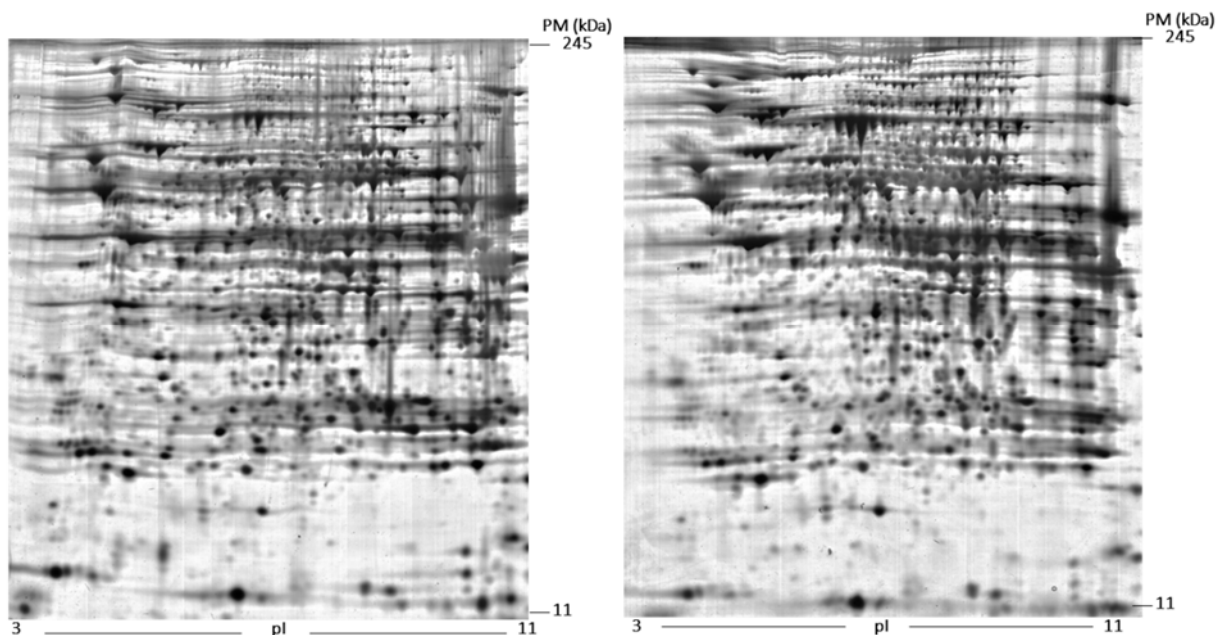


Figura 59. Proteoma representativo de hígado de rata del estudio de alimentación de 90 días. Se muestra el perfil de los *spots* resueltos en geles de pH 3 -11 y de peso molecular de 11 a 245 kDa (izquierda: perfil proteómico de hígado de macho y derecha: perfil proteómico de hígado de hembra).

Variabilidad general de los perfiles proteómicos de hígados de rata

Se exploró inicialmente, la variabilidad entre los cuatro grupos en machos y hembras para estimar la dispersión entre los dos sexos y se determinó que la correlación entre todos los grupos fue muy alta (coeficiente de correlación de Pearson, $R > 0,82$). A continuación, se visualizó la similitud de los proteomas de hígados de machos y hembras de los dos estudios mediante un análisis de clúster jerárquico. El dendrograma obtenido (método UPGMA y distancia euclídea) de la Figura 60, muestra los ocho grupos de animales separados en dos clústeres según su perfil proteómico de hígado. Un clúster está formado por los cuatro grupos de machos de los estudios A y B y las hembras que recibieron dieta control del estudio B (grupo ♀♀ 16_90d). En el otro clúster se agrupan los tres otros grupos de hembras restantes. Así, los perfiles proteómicos analizados se separaron principalmente según el sexo y no por la dieta recibida, ya que los grupos alimentados con la dieta MG no formaron un clúster separado del resto, sino que resultaron más similares a los grupos alimentados con la dieta control.

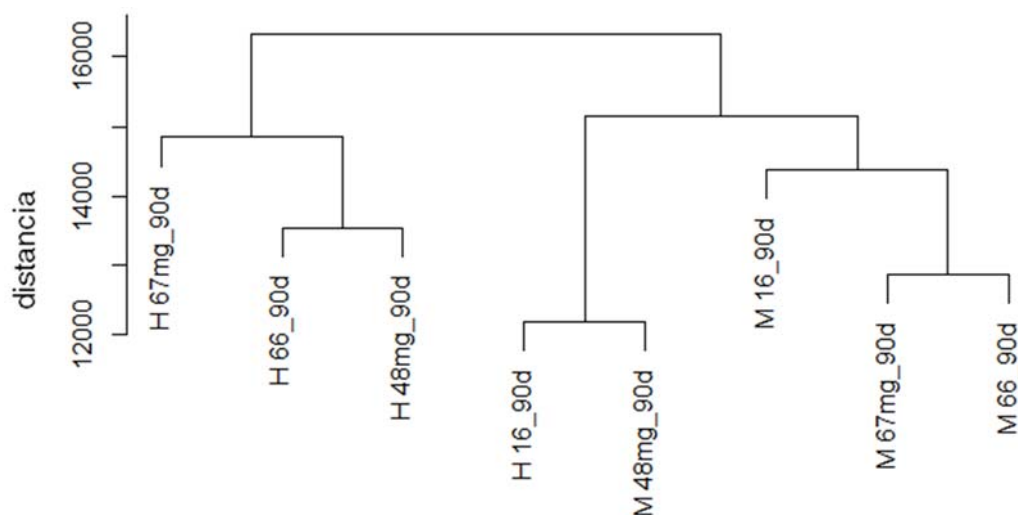


Figura 60. Representación mediante un dendrograma de los 8 grupos de ratas de machos y hembras. Los grupos se clasifican según los volúmenes de los *spots* normalizados detectados por proteómica bidimensional de las hembras (H) y machos (M).

Posteriormente, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de los valores de los volúmenes de los *spots* transformados a su logaritmo natural de los ocho grupos de animales. Este análisis se usó para determinar los diferentes factores de variación en el conjunto de datos. Las tres primeras componentes (PC1, PC2 y PC3) explicaron el 57% de la varianza (Figura 61). En la representación de las componentes no se observó una diferenciación de los grupos por ninguno de los factores analizados (sexo, estudio, dieta). Es decir, la alimentación con pienso MG no provocó cambios cuantitativos a nivel global en los proteomas de los hígados de las ratas.

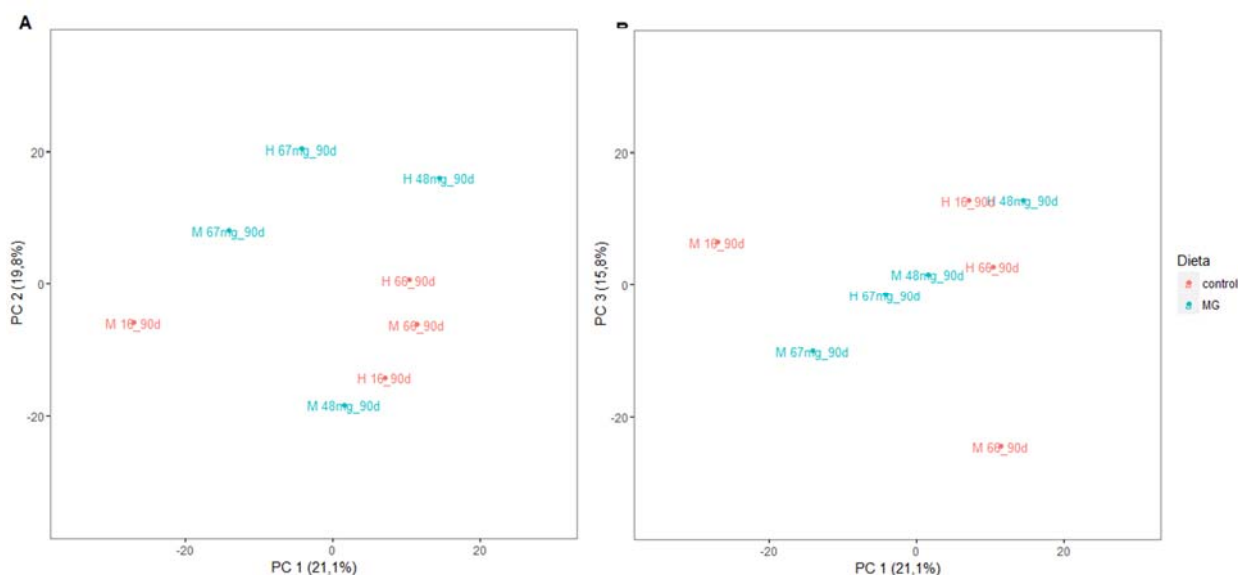


Figura 61. Análisis de componentes principales (PCA) de los volúmenes de todos los *spots* de los proteomas de hígado. A) PC1 respecto a PC2. B) PC1 respecto a PC3. Se representan las hembras (H) y machos (M), de los estudios A, B 2 alimentados con dieta MG (en rojo) y con dieta control (no MG, en azul).

Para complementar los datos obtenidos en el PCA se realizó un test ANOVA y estimar el efecto de los factores estudio y dieta sobre los proteomas de hígados de las hembras y machos por separado. Como se observa en la Tabla 26, en el grupo de hembras se identificaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para el factor dieta, indicando que la dieta tuvo un efecto relevante en los proteomas de las hembras alimentadas con la dieta MG respecto a la dieta control. Además, se dio un ligero efecto de interacción de los factores dieta y estudio en los dos grupos de hembras y machos ($p < 0,1$), lo que indicó que el efecto de la dieta sobre el proteoma en las hembras estuvo en parte modulada por la varianza experimental del propio estudio.

Tabla 26. Análisis ANOVA del efecto de los factores dieta y estudio sobre los proteomas de hígado en machos y hembras. 11 Análisis realizado sobre los volúmenes normalizados de los *spots* de cuatro grupos de hígados de rata en machos y 12 hembras. Factor dieta (MG o control) y estudio (estudio A o B). [Gl: grados de libertad, valor F: estadístico de Fisher; 13 Pr(>F), valor p de significancia Códigos de significancia: 0 *****, 0,001 ****, 0,01 ***, 0,05 **, 0,1 *]

Hembras

Factor	Gl	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	valor F	Pr(>F)	Significancia
Dieta	1	9,31	9,31	4,71	0,03	**
Estudio	1	3,80	3,80	1,93	0,17	
Dieta: Estudio	1	12,48	12,48	2,35	0,07	*

Machos

Factor	Gl	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	valor F	Pr(>F)	Significancia
Dieta	1	1,51	1,51	0,75	0,39	
Estudio	1	0,14	0,14	0,07	0,79	
Dieta: Estudio	1	12,48	12,48	2,35	0,07	*

Para analizar en detalle el efecto observado de la dieta sobre las hembras se realizó un test de Tukey HSD (*Honestly-significant difference*) con intervalos de confianza del 95%. Este test informó que solo el proteoma hepático de las hembras que recibieron dieta MG del estudio A (67mg_90d) presentó diferencias levemente significativas ($p < 0,1$) respecto al grupo control de hembras del estudio B (16_90d). Por tanto, se pudo concluir que el efecto significativo observado de la dieta, así como la interacción de los efectos dieta-estudio en hembras se debió en realidad a diferencias entre grupos MG y control de distintos estudios, y por tanto no fue atribuible a la modificación genética.

Proteínas diferenciales en hígados de rata alimentadas con maíz MON810

Se realizó un test t de Student para encontrar las posibles proteínas diferenciales específicas en cada grupo de ratas que recibieron dieta MG respecto a las dietas control. Se establecieron unos criterios de significancia $FC=2$ y p valor ajustado por FDR, $q < 0,05$ y se obtuvo un solo *spot* (*spot* #27) significativamente sobreacumulado en los hígados de hembras alimentadas con maíz MG del estudio A (67mg_90d). Estos resultados encajaron con los resultados del análisis por PCA y ANOVA, donde no se observaron diferencias relevantes entre grupos atribuibles a la alimentación con pienso MG. Además, la única diferencia detectada a nivel de *spots* correspondió al grupo de hembras donde se detectaron diferencias significativas en el ANOVA y posterior test Tukey. Posteriormente, se consideraron unos criterios de significancia menos restrictivos ($FC=1,5$ y $q < 0,1$) para poder hallar proteínas que potencialmente pudieran causar algún efecto sobre los proteomas de hígados. En este caso, se obtuvieron 5 y 4 *spots* diferenciales en las hembras del estudio A y B respectivamente, que 5 representaron entre el 0,4 y 0,5% de diferencias sobre el total. En los grupos de machos encontramos 0 proteínas diferenciales en el estudio A y 47 en el estudio B, que fueron el 4,8% sobre el total. Ninguno de los 7 *spots* detectados como diferenciales fue conservado entre los estudios A y B, ni entre los sexos (Figura 62). El listado de *spots* diferenciales se muestra en la Tabla 27.

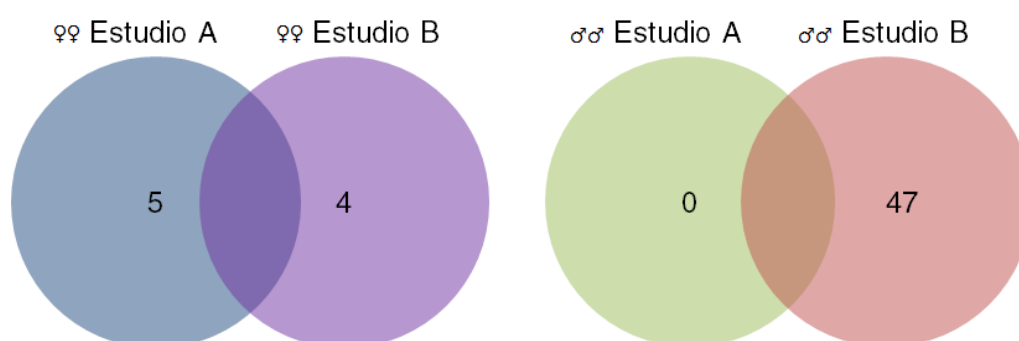


Figura 62. Diagrama de Venn de los *spots* diferenciales significativos ($FC=1,5$ y $q < 0,1$) en los hígados de los estudios A y B de hembras (♀♀) y machos (♂♂).

En resumen, no se identificaron mediante LC-MS/MS *spots* diferencialmente acumulados ya que se comprobó que el efecto dieta no causaba alteraciones en los proteomas de los hígados. Las diferencias observadas tanto cuanti- en como cualitativamente no dependieron de la dieta, estudio o sexo, y, por tanto, éstas se pudieron atribuir únicamente a la variabilidad intrínseca de cada animal.

Tabla 27. Spots diferencialmente acumulados en los proteomas bidimensionales de hígados de rata en los estudios A y B. Se indica el código de cada *spot* diferencial (*Spot #*), la tasa de cambio (FC (*fold-change*): dieta MG/control) del volumen de los *spots* comparados; el nivel de acumulación (↑(alto) o ↓(bajo) en la dieta MG) y el valor de FDR (valor q).

Grupo	Spot #	log2(FC)	Sentido FC	q valor
♀♀ 67mg_90d	732	-1,15	↓ dieta MG	0,097
	755	-0,85	↓ dieta MG	0,062
	856	-0,68	↓ dieta MG	0,007
	27	1,31	↑ dieta MG	0,022
	172	1,39	↑ dieta MG	0,097
♀♀ 48mg_90d	1156	1,40	↑ dieta MG	0,073
	607	1,42	↑ dieta MG	0,066
	943	1,92	↑ dieta MG	0,066
	784	2,57	↑ dieta MG	0,073
♂♂ 48mg_90d	590	-2,09	↓ dieta MG	0,095
	212	-1,88	↓ dieta MG	0,062
	289	-1,73	↓ dieta MG	0,063
	692	-1,57	↓ dieta MG	0,062
	310	-1,48	↓ dieta MG	0,070
	739	-1,47	↓ dieta MG	0,095
	343	-1,46	↓ dieta MG	0,070
	422	-1,45	↓ dieta MG	0,091
	806	-1,42	↓ dieta MG	0,079
	1064	-1,40	↓ dieta MG	0,095
	846	-1,30	↓ dieta MG	0,082
	597	-1,28	↓ dieta MG	0,070
	644	-1,26	↓ dieta MG	0,063
	111	-1,25	↓ dieta MG	0,095
	106	-1,20	↓ dieta MG	0,063
	1187	-1,18	↓ dieta MG	0,096
	754	-1,16	↓ dieta MG	0,062
	411	-1,14	↓ dieta MG	0,063
	384	-1,10	↓ dieta MG	0,095
	588	-0,99	↓ dieta MG	0,071
	736	-0,97	↓ dieta MG	0,063
	1152	-0,82	↓ dieta MG	0,080
	83	-0,80	↓ dieta MG	0,062
	1173	-0,78	↓ dieta MG	0,063
	148	-0,70	↓ dieta MG	0,091
	114	-0,69	↓ dieta MG	0,063
	3	0,59	↑ dieta MG	0,070
	34	0,64	↑ dieta MG	0,091
	74	0,65	↑ dieta MG	0,063
	7	0,70	↑ dieta MG	0,070
	240	0,71	↑ dieta MG	0,063
	495	0,72	↑ dieta MG	0,078
	824	0,81	↑ dieta MG	0,080
	98	0,83	↑ dieta MG	0,080
	76	0,87	↑ dieta MG	0,095
	43	0,88	↑ dieta MG	0,091
62	0,93	↑ dieta MG	0,063	
237	0,97	↑ dieta MG	0,091	
56	1,01	↑ dieta MG	0,073	
61	1,05	↑ dieta MG	0,073	
14	1,07	↑ dieta MG	0,080	
755	1,13	↑ dieta MG	0,070	
535	1,14	↑ dieta MG	0,063	
19	1,24	↑ dieta MG	0,091	
693	1,63	↑ dieta MG	0,095	
668	1,70	↑ dieta MG	0,087	
961	1,95	↑ dieta MG	0,063	

DISCUSIÓN

La agricultura está ligada a la plasticidad del genoma vegetal que permite explotar las variaciones genéticas para obtener plantas mejoradas con características de interés. La transgénesis, y las nuevas tecnologías de mejora de plantas, explotan la posibilidad de introducir nuevas fuentes de variabilidad genética de manera que no ocurre naturalmente. La importancia e impacto de las plantas transgénicas se pueden ver ilustrados por su rápida incorporación al mercado, su creciente tasa de uso y las cada vez más amplias aplicaciones que ofrecen. Los diferentes países han desarrollado una serie de protocolos para autorizar la comercialización y liberación al medio ambiente de los nuevos eventos transgénicos, fundamentados en el análisis de riesgos.

En la UE, la seguridad de las plantas modificadas genéticamente (MG) es evaluada científicamente por la EFSA que recomienda que “la evaluación de la seguridad de las plantas MG y los alimentos y piensos derivados siga una aproximación comparativa. Esto es, que los alimentos y piensos MG se comparen con los comparadores no MG para identificar las diferencias intencionadas y las no intencionadas (inesperadas) las cuales se evalúan por su posible impacto en el ambiente, la salud animal y la humana” (EFSA 2008). En la primera fase del análisis de la seguridad, se evalúa la equivalencia substancial de la planta MG respecto a una planta convencional con un fondo génico muy próximo y considerada segura para el consumo. La equivalencia substancial se evalúa mediante un análisis molecular, composicional, fenotípico y agronómico. El análisis composicional completo cuantifica 50-150 analitos que incluyen los componentes básicos como proteínas, grasas, azúcares, cenizas y minerales, y la cuantificación de otros nutrientes, antinutrientes, sustancias alergógenas y toxinas naturales. El análisis composicional de estas sustancias concretas viene determinado según la especie vegetal en los documentos consenso de la OECD (OECD 2006, www.oecd.org/biotrack). La segunda fase del análisis de riesgos se centra en la nueva característica introducida en la planta MG (relacionada, en la mayoría de los OMG autorizados, con resistencia a insectos, tolerancia a herbicidas o mejora de características nutricionales). El análisis de riesgos contempla asimismo la caracterización del donador del transgén y el proceso de transformación, así como la caracterización molecular de la secuencia insertada, el lugar de inserción y las secuencias flanqueantes del genoma huésped. Esto es particularmente relevante ya que se pueden producir reorganizaciones genómicas asociadas a la inserción del transgén en regiones ricas de genes que podrían provocar cambios no intencionados a nivel fisiológico (Koncz *et al.* 1992; Latham *et al.* 2006; Miki *et al.* 2009). Actualmente se están desarrollando nuevas tecnologías de transformación de plantas más dirigidas y que comportarían una modificación del genoma menos aleatoria (Lusser *et al.* 2012).

Desde el año 2013 en la reglamentación de la UE sobre la autorización de plantas transgénicas (Reglamento Europeo N° 503/2013), se exige la realización de estudios alimentarios *in vivo* adaptados del

estudio de toxicidad a 90 días en roedores descrito en las directrices del ensayo 408 de la OECD (OECD 1998). En este ensayo se definen los parámetros para testar el material experimental como las especies animales, géneros, número de individuos, número de dosis, etc. y las metodologías para medir las respuestas fenotípicas como peso corporal, ingesta, análisis bioquímicos, etc. Estos ensayos se han usado comúnmente, para estudiar el riesgo toxicológico de xenobióticos como fármacos, pesticidas o aditivos. La EFSA ha elaborado una guía para adaptar estos protocolos al estudio de alimentos o piensos MG en ensayos a 90 días en ratas (EFSA 2011a). El panel de expertos de OMG de la EFSA recomienda que se consideren los estudios a 90 días en roedores en la evaluación de plantas MG con características metabólicas modificadas enfocadas a combatir estreses medioambientales, como sequía o salinidad, o a mejorar la alimentación y la salud humana (EFSA 2008). Sin embargo, los expertos sugieren que, cuando se ha demostrado la equivalencia substancial de una planta MG respecto a la comparadora no MG a nivel molecular, composicional, fenotípico y agronómico, los estudios de alimentación animal no aportan una información relevante para el análisis de riesgos (EFSA 2008).

Entre la comunidad científica se ha admitido que es poco probable que las sustancias presentes en bajas concentraciones y con bajo potencial tóxico (como un ingrediente de un alimento) provoquen un cambio no intencionado observable en los estudios en animales (EFSA 2010; EFSA 2008; Kuiper *et al.* 2013) lo cual aplica a las PMG. Esto es debido, primeramente, a que la planta MG solo se puede incluir en el alimento hasta un cierto límite para asegurar una dieta equilibrada. Por ejemplo, el maíz únicamente puede representar entorno a un 30-40% de la dieta en ratas (Snell *et al.* 2012). En otras especies, como arroz o soja, la planta MG se ha incluido hasta un 50% (Snell *et al.* 2012). Ello implica que la concentración de la proteína transgénica en la dieta puede ser muy baja en comparación con los niveles de las sustancias puras ensayadas en estudios toxicológicos. En consecuencia, resulta muy improbable observar una respuesta toxicológica ligada a la dosis del OMG. Segundo, en la mayoría de OMG evaluados hasta el momento, los estudios composicionales realizados han demostrado que la planta MG es substancialmente equivalente a la respectiva convencional comparadora. De esta manera los estudios de toxicidad se realizan sin una hipótesis concreta a testar ni los controles positivos adecuados.

Las evidencias científicas (EFSA 2008; Kuiper *et al.* 2013) han concluido que los estudios de alimentación con piensos enteros son innecesarios para evaluar las plantas MG que han demostrado ser sustancialmente equivalentes a sus comparadores convencionales en los análisis moleculares, composicionales, fenotípicos y agronómicos. Aun así, la normativa europea especifica el requerimiento de estos estudios en los procesos de aprobación de las plantas MG. Por este motivo surgen consideraciones éticas en relación al uso de animales de experimentación en este contexto; y es relevante la investigación con el objetivo de mejorar, reducir y, si es posible, substituir el uso de animales en la evaluación de plantas MG. En varios documentos científicos (Kok y Kuiper 2003; Cellini *et al.* 2004; EFSA 2012b; Kuiper *et al.* 2013; Ricroch 2013) se ha destacado que un análisis molecular integral y mejorado de la planta MG podría resultar mucho más informativo para detectar cambios fisiológicos no intencionados en la planta MG y que puedan provocar efectos adversos para la salud.

Esta tesis doctoral se ha desarrollado en el marco del proyecto GRACE, que plantea una revisión del proceso de autorización de las plantas MG en la UE. Se ha tomado como modelo de estudio el maíz MON810 que es el único transgénico que actualmente se cultiva en la UE con fines comerciales

(ec.europa.eu/food/plant/gmo). Este maíz es resistente a insectos lepidópteros, concretamente a las especies que provocan la plaga del taladro del maíz, y es uno de los eventos MG más extensamente cultivados en todo el mundo (www.isaaa.org/gmapprovaldatabase). Por dichas razones este maíz es uno de los OMG más estudiados a nivel científico lo cual se refleja en los numerosos trabajos sobre la caracterización molecular del transgén (Holck *et al.* 2002; Hernández *et al.* 2003; La Paz *et al.* 2010; La Paz *et al.* 2010), la seguridad alimentaria (Hammond *et al.* 2006; Barros *et al.* 2010; Coll *et al.* 2010; Coll *et al.* 2011; La Paz *et al.* 2014) y el impacto medioambiental (ILSI Research Foundation 2011; Koch *et al.* 2015). Además, se ha utilizado también como modelo en los estudios de coexistencia de cultivos MG y convencionales en algunas zonas de Europa (Messeguer *et al.* 2006; Palauelmàs 2009; Palauelmàs *et al.* 2012; Melé *et al.* 2015).

Como ya hemos señalado, este maíz ha sido analizado en varios artículos científicos a nivel de seguridad alimentaria mediante estudios a 90 días, sin embargo, nunca antes se han realizado estudios a largo plazo. Para una revisión de todos los estudios, ver los documentos generados por el proyecto GRACE (www.grace-fp7.eu y www.cadima.info). Remarcablemente, en el proyecto GRACE, por primera vez, se han analizado exactamente las mismas variedades de maíz mediante los ensayos establecidos en la normativa europea y mediante una serie de ensayos alternativos y complementarios como análisis ómicos y estudios de alimentación a 1 año, para comparar ambas aproximaciones. El objetivo de este trabajo, es emitir una propuesta mejorada del protocolo para la evaluación de plantas MG y con una base estrictamente científica. Las reflexiones y propuestas de GRACE serán consideradas por la Comisión Europea en su reconsideración de la obligatoriedad, para todas las evaluaciones de plantas MG, de estudios con animales (Reglamento Europeo N°503/2013).

El material vegetal con el que se ha trabajado se considera singular y muy completo. Se han testado dos variedades de maíz del evento MON810, obtenidas y comercializadas por dos empresas de semillas diferentes lo cual ha permitido estudiar la influencia del fondo genético sobre la expresión del transgén. Las líneas *near-isogenic* de cada una de las variedades se han usado como comparadores no MG, ya que son las variedades comerciales más próximas genéticamente a la planta MG. Para representar la diversidad de la especie se han incluido hasta ocho variedades convencionales ampliamente comercializadas con genotipos y características agronómicas diferentes. Finalmente, se han analizado las cosechas de estas variedades en dos años consecutivos (2012 y 2013) para testar la contribución de los factores ambientales sobre la expresión del transgén. Las condiciones meteorológicas en estos dos años fueron particularmente dispares, destacando las fuertes tempestades locales en la época de floración del segundo año. El diseño experimental de este trabajo, por tanto, ha incluido muchas variedades de maíz (y dos condiciones ambientales) en comparación a otros análisis comparativos previamente realizados para explorar la seguridad de las plantas MG considerando varios factores y realizar un análisis lo más completo posible.

Todas las variedades se han cultivado en la misma región donde es habitual el cultivo de maíz y particularmente el maíz MON810: en los dos años del estudio el maíz MON810 representó el 70% del total de maíz cultivado (agricultura.gencat.cat). Se siguieron las prácticas de cultivo habituales en la región, procurando el mejor rendimiento para cada una de las variedades. Los parámetros morfológicos y fenológicos fueron los estándares en cuanto a tiempos de floración y madurez fisiológica, así como otros

parámetros agronómicos monitorizados (se obtuvieron rendimientos en torno a 13.000 kg/ha). No se observaron infecciones víricas, y en los cultivos del 2013 se vio una ligera infección fúngica por *Fusarium spp.* en las variedades convencionales 66_13 y AL_13 (2,5% y 1,3% respectivamente). Las variedades convencionales sufrieron ataques de taladro muy reducidos (<0,4% en todas las variedades excepto en la variedad SYNEPAL cultivada en el 2013 que presentó un 3,3%) (Zeljenková *et al.* 2014; Zeljenková *et al.* 2016). Por tanto, el maíz se ha cultivado bajo condiciones muy homogéneas lo cual permite reducir las variaciones experimentales en todo el ensayo.

Como se indica en el Reglamento Europeo Nº 503/2013, en el análisis de riesgos del maíz MG MON810 se evalúan los efectos intencionados mediante una caracterización molecular del producto del transgén que en este caso se trata de una versión truncada de la proteína Cry1A(b). A tal fin puede producirse sintéticamente la proteína y evaluarla mediante estudios de toxicidad siguiendo los protocolos diseñados para testar sustancias puras (OECD 1998). De forma complementaria a los protocolos reglamentados, diferentes grupos de investigación han publicado estudios complementarios que demuestran la nula alergenicidad de la proteína Cry1A(b) recombinante (Adel-Patient *et al.* 2011). Los dossieres oficiales de la aprobación del MON810 son documentos públicos y demuestran la equivalencia substancial del maíz para la autorización del mismo en la UE (Monsanto 2007; EFSA 2009; Comisión Europea 2016). Tal y como se exige en el mencionado documento de autorización de cultivos MG (Reglamento Nº503/2013), posteriormente, se estudian los efectos no intencionados mediante el principio de equivalencia substancial entre la planta MG y el comparador convencional para contrastar los niveles de compuestos como micro, macro y antinutrientes, toxinas naturales y contaminantes químicos. Paralelamente, todas las dietas elaboradas con diferentes dosis y variedades de maíz destinadas a los ensayos de toxicidad de 90 días y 1 año han sido analizadas en el proyecto GRACE. Todas las dietas mostraron niveles muy similares de todos los analitos (cenizas, carbohidratos, lípidos, proteínas, almidón, fibras, aminoácidos, minerales, vitaminas, azúcares, antinutrientes y metabolitos secundarios) y no se detectaron microorganismos patógenos después de la irradiación de las dietas (Zeljenková *et al.* 2014; Zeljenková *et al.* 2016). Los análisis composicionales demostraron que las diferencias entre las dietas que contenían maíz convencional, *near-isogenic*, o MON810 fueron biológicamente irrelevantes excepto por la contaminación de fumonisinas en la dieta *near-isogenic* destinada al estudio de 1 año. Esta irregularidad no se consideró que pudiera perjudicar la salud de los animales de experimentación (Zeljenková *et al.* 2016).

Ómicas sobre el material vegetal

En la presente tesis doctoral nos hemos propuesto evaluar las nuevas tecnologías de análisis molecular masivo, ómicas, para comparar de forma exhaustiva las plantas MG con sus respectivos comparadores convencionales como alternativa a los estudios animales en el análisis de riesgos moleculares de los transgénicos. De esta forma estas tecnologías podrían (i) mejorar los análisis para evaluar la equivalencia substancial, o bien (ii) identificar algunos analitos o rutas alteradas en la planta MG. En el primer caso, si se demostrara que la planta MG es substancialmente equivalente a su *near-isogenic*, no sería necesario realizar ensayos de alimentación en animales. En el segundo caso, si se identificaran rutas alteradas se dispondría de una hipótesis para testar en los estudios de toxicidad, lo que facilitaría el diseño experimental de éstos.

Hemos realizado un análisis comparativo del transcriptoma y proteoma de las variedades de maíz MON810, las *near-isogenic* y las convencionales, para obtener una visión holística e integrada de los mimos e identificar rutas concretas que puedan indicar funciones celulares alteradas en el maíz MG respecto al convencional. Las variedades convencionales son necesarias en estos estudios para incluir toda la variabilidad natural de la especie y poder determinar la relevancia biológica de los resultados obtenidos, ya que como indica la EFSA, existe una clara diferencia entre la significancia estadística y la relevancia biológica (EFSA 2011c). Los análisis ómicos han sido realizados en paralelo en dos laboratorios dentro del consorcio de GRACE para confirmar la correlación y robustez de los resultados obtenidos.

En el análisis transcriptómico mediante la plataforma de secuenciación masiva Illumina HiSeq, los porcentajes de mapeo fueron altos (más del 70%) como en otros estudios similares (Hansey *et al.* 2012; Bi *et al.* 2014; Chettoor *et al.* 2014) a pesar de haber trabajado con la anotación de la variedad B73 (Schnable *et al.* 2009), genéticamente muy diferente (www.ensembl.org). Se analizaron más de 63.000 transcritos de maíz y en los tres pares de variedades MON810 y *near-isogenic* solamente se detectaron 34, 65 y 132 transcritos estadísticamente diferenciales, suponiendo menos del 0,01% de todos los transcritos analizados. La variación transcriptómica entre las variedades convencionales de este mismo experimento puede llegar a representar casi el 3% del total (más de 1.700 transcritos diferenciales entre dos variedades convencionales). Nuestros resultados son consistentes con los observados en otros tejidos de semilla de maíz mediante técnicas de análisis transcriptómico comparativo como *microarray* (Coll *et al.* 2008) y secuenciación por 454 (La Paz *et al.* 2014), aunque estos presentaron una menor profundidad de análisis (14.850 transcritos aproximadamente). Además, en estos estudios se han obtenido un mayor número de genes diferenciales ya que solamente se trabajó con dos parejas de variedades MON810 y *near-isogenic*. Se ha descrito que el método bioinformático seguido Cufflinks (Trapnell *et al.* 2010; Trapnell *et al.* 2012) es el más conservador a la hora de detectar diferencias (Seyednasrollah *et al.* 2013; Sonesson y Delorenzi 2013; Rahmatallah *et al.* 2014) en comparación con otros programas populares como edgeR (Robinson *et al.* 2010) y DESeq (Anders y Huber 2010). Paralelamente, un estudio de secuenciación masiva de embrión de maíz MON810, analizado con dichos programas, indicó que existen muy pocas diferencias transcriptómicas en el maíz MON810 respecto al isogénico. Es relevante destacar que los genes diferenciales en las variedades de maíz MON810 no identificaron ninguna ruta metabólica alterada, por lo que se suscribe la equivalencia substancial.

En la proteómica 2D se obtuvieron más de 1.400 *spots* que representaron las proteínas más abundantes cubiertas por el rango de pH ensayado y detectados con tinción de plata. Este número de detecciones fue superior en otros estudios donde se compararon semillas de maíz MG con las convencionales (Barros *et al.* 2010; Coll *et al.* 2011; Vidal *et al.* 2015). De forma similar a los resultados obtenidos en la caracterización por RNA-Seq, las diferencias a nivel de proteínas encontradas entre las variedades transgénicas y las *near-isogenic* fueron muy pocas: en una de las parejas no se vieron diferencias significativas estadísticamente, en las otras tres parejas se vieron 3, 4 y 9 *spots* diferenciales, que llegaron a representar el 0,7% del total de proteínas detectadas. En este estudio se han incluido dos variedades de ciclo FAO de maduración diferentes lo cual se manifestó en una divergencia a nivel transcriptómico, pero no a nivel proteómico, lo que demuestra el grado de sensibilidad de la transcriptómica. El experimento de

transcriptómica tiene una cobertura de todos los genes descritos mientras que la proteómica, debido a la mayor diversidad de las proteínas, cubre un porcentaje pequeño del total de las proteínas y es dependiente del protocolo elegido.

En el caso del transcriptoma, sólo se han observado 4 transcritos comúnmente desregulados en las variedades MON810; y ninguno de ellos localizó en el cromosoma 5, donde se insertó el transgén de *cry1A(b)*: los genes de este cromosoma no se vieron alterados por la inserción y/o expresión del transgén. De estos 4 transcritos, únicamente una isoforma se expresó en el mismo sentido en las tres muestras MG estudiadas, lo cual descarta la relevancia de los 3 restantes. Se trata de una isoforma localizada en una región genómica donde se ha descrito un transposón en la variedad anotada. Los transposones pueden llegar a representar hasta el 80% del genoma del maíz (McClintock 1950; Fedoroff 2012), tienen interacciones con el genoma y pueden contribuir a la regulación de la expresión de genes en respuesta a diferentes condiciones ambientales (Makarevitch *et al.* 2015). El extremo 5' a la inserción del transgén MON810 en el cromosoma 5, está flanqueado por una LTR (*long terminal repeat*) correspondiente a un retrotransposón del tipo Zeon-1 (La Paz *et al.* 2010), pero el transposón diferencial común obtenido no se encuentra en la misma región.

Los resultados obtenidos de la proteómica del maíz, indican que no se obtuvieron *spots* diferenciales conservados en los cuatro pares de variedades MG y near-isogenic. Nuestros resultados corroboran que existen menores diferencias a nivel proteómico en las variedades MON810 y sus comparadoras que entre convencionales (Barros *et al.* 2010; Coll *et al.* 2011). Las diferencias entre cada par de variedades corresponden a proteínas relacionadas con la acumulación de nutrientes en la semilla, el estrés y la defensa, muy abundantes y variables en distintas variedades, a lo largo de la maduración del grano y en respuesta a condiciones ambientales. Ninguna de estas proteínas ha sido indicativa de rutas metabólicas celulares alteradas en el maíz MON810 respecto a las convencionales.

En el análisis de las diferencias detectadas entre una variedad MON810 respecto a su comparador *near-isogenic* se aplicó el siguiente razonamiento: si se detectan diferencias en una pareja de variedades y éstas no son consistentes en otra pareja obtenida por una empresa de semillas diferente, significa que estas diferencias no se pueden considerar causadas por la inserción del transgén, sino que dependen fundamentalmente del fondo genético. De forma similar, si las diferencias no son consistentes en cultivos realizados en distintas condiciones ambientales se deriva una conclusión similar: las diferencias no son causadas por la inserción del transgén, sino que dependen de las condiciones ambientales. En los dos experimentos de comparativa molecular masiva se ha demostrado que el fondo genético y al año de cultivo son factores más importantes para provocar diferencias transcriptómicas y proteómicas en las variedades transgénicas que la propia modificación génica. En otros estudios donde se han ensayado otras condiciones ambientales como diferentes localizaciones o prácticas de cultivo, se han obtenido los mismos resultados indicando que estos son factores que tienen un mayor efecto en los cambios moleculares que la modificación genética en sí misma (Barros *et al.* 2010; Coll *et al.* 2010).

Como ya hemos mencionado, la secuencia 5' *upstream* al promotor 35S del transgén es homóloga al LTR del zeón – 1 (Hernández *et al.* 2003; La Paz *et al.* 2010) mientras que la región 3' corresponde a un gen que codifica por la ubiquitina ligasa HECT E3 (Rosati *et al.* 2008). En nuestro estudio no hemos identificado

tráncritos ni proteínas diferenciales correspondientes a estos genes. Esto podría ser debido a que estos genes no se expresan en el embrión maduro como ya se ha indicado en otros estudios (La Paz *et al.* 2014). Además, ninguno de los tráncritos diferenciales comunes en las tres variedades MON810 se localizó en el cromosoma 5 donde está insertado el transgén de *cry1A(b)* y por tanto los genes de este cromosoma no se han visto alterados por la inserción y/o expresión de la proteína Cry1A(b).

Los resultados obtenidos en los experimentos de transcriptómica y proteómica de maíz MON810 indican que existen menos variaciones entre las variedades de maíz MG y sus respectivos controles *near-isogenic* que entre todo el conjunto de variedades, genotipos y años de cultivo estudiados. Para valorar el impacto de las pequeñas diferencias observadas entre los pares de variedades MON810 y controles, se cuantifican las expresiones de las moléculas observadas en todas las variedades estudiadas. En ambos estudios la mayoría de diferencias observadas están dentro del rango biológico normal y no han sido indicativas de peligro para la salud debido a que las diferencias observadas no son consistentes en las diferentes muestras de maíz. Por tanto, los resultados de estos dos experimentos demuestran que la semilla de maíz es sustancialmente equivalente a su homólogo convencional no MG.

Es importante, desde un punto de vista de seguridad alimentaria, controlar los niveles de alérgenos o antinutrientes en los alimentos o piensos. En el presente análisis, no se identificaron moléculas que pudieran indicar un riesgo de seguridad alimentaria en el maíz MON810 de manera diferencial. Por tanto, estos resultados no indicaron un riesgo molecular adicional de la semilla de maíz MON810 atribuido a la modificación genética. La relación entre los tráncritos y proteínas diferencialmente expresados no se asoció al DNA insertado en el transgén y no se consideró un riesgo para la salud de los consumidores. Por tanto, las variedades de maíz testadas demostraron ser tan seguras a nivel molecular como los híbridos comerciales de maíz tal y como ya se había apuntado en otros estudios menos completos (Coll *et al.* 2008; Coll *et al.* 2009; Barros *et al.* 2010; Coll *et al.* 2010; Coll *et al.* 2011; Fonseca *et al.* 2012; La Paz *et al.* 2014; Decourcelle *et al.* 2015; Vidal *et al.* 2015).

Los análisis composicionales dirigidos sobre las variedades de cultivos transgénicos se centran en detectar entre 50 y 150 compuestos conocidos, que incluyen sustancias que supongan un riesgo para la seguridad alimentaria. En este sentido se determinan con detalle los niveles de metales pesados, antinutrientes, alérgenos y toxinas. La variación cuantitativa de estos compuestos es particularmente importante desde un punto de vista de seguridad alimentaria en cualquier maíz MG o convencional. Por el contrario, las tecnologías ómicas permiten el análisis de un mayor número de analitos, que potencialmente, podrían cubrir todo el transcriptoma, proteoma y metaboloma, y podrían detectarse rutas y funciones celulares alteradas que provocaran un efecto adverso. El uso de las tecnologías ómicas a nivel regulatorio de las plantas MG implicaría un cambio de paradigma, ya que implicaría la detección y cuantificación de varios miles de analitos.

El análisis transcriptómico por RNA-Seq ha permitido la detección del propio transgén del maíz MON810. En las variedades MON810 se identificaron una serie de lecturas no mapeadas en el genoma de maíz, que correspondieron a *cry1A(b)* derivado de *B. thuringiensis*, que lleva un promotor fuerte constitutivo y se expresa pues en el tejido en estudio (no se muestran los datos). En caso de los cultivos transgénicos con características inducibles, como la patata A01 A que hemos analizado en este trabajo, o específicas de

tejido no se podrían detectar lecturas del transgén si la planta no se encuentra en las condiciones en las que se expresaría el transgén. Por el contrario, la proteómica 2D en semilla de maíz MON810 no nos ha permitido detectar la proteína Cry1A(b) expresada constitutivamente. Cabe tener en cuenta que el protocolo ha permitido identificar solamente aquellas proteínas dentro del rango de pH y peso molecular ensayado y las más abundantes que solamente podrían llegar a representar el 2% aproximadamente (Martyniuk *et al.* 2012) de todas las proteínas del tejido. Ello podría ser debido a la sensibilidad de esta técnica, que tampoco permite detectar proteínas de membrana, que no es el caso concreto de la proteína Cry1a(b) ya que en anteriores tesis doctorales se observó que la proteínas tiene localización citoplasmática (La Paz, 2011). Además, como la naturaleza de las proteínas es muy variable el método de extracción puede provocar la pérdida de algún un tipo de proteínas específico. Los métodos de extracción son pues, un compromiso entre la obtención de un número máximo de proteínas y una buena calidad del extracto, sin impurezas que puedan alterar el proteoma 2D. Se ha demostrado que el procedimiento seguido es robusto y sensible para discriminar proteomas con alteraciones importantes y que esto supone una ventaja desde el punto de vista de la seguridad alimentaria de cultivos MG.

Cabe destacar, que a día de hoy la proteómica ha sido mejorada y se han desarrollado metodologías que permiten un mayor rendimiento y profundidad ya que permite cuantificar varios miles de proteínas en un solo experimento. Un ejemplo muy común es la es la espectrometría Orbitrap (Scigelova y Makarov 2006; Geiger *et al.* 2010). Esta tecnología ya se ha implementado de manera rutinaria en estudios de proteómica vegetal ya que requiere menos recursos que la proteómica bidimensional con tinción de plata.

Nuestros resultados de la comparación del maíz MON810 mediante ómicas respecto a su variedad isogénica indican que no existen diferencias con relevancia biológica en el maíz MON810 que sean causadas por la inserción del transgén. Esto dificulta el propósito del presente trabajo que es mostrar la capacidad de las tecnologías ómicas para detectar cualquier efecto no intencionado, que debiera considerarse en la evaluación de riesgos. Sin embargo, pueden realizarse algunas consideraciones respecto a la utilidad y la sensibilidad de estas tecnologías. Por una parte, hemos podido valora la utilidad de la proteómica mediante un análisis de muestras de maíz contaminadas y una patata transgénica. Por otro lado, hemos valorado la sensibilidad de la transcriptómica en los hígados de rata como veremos más adelante.

Hemos podido testar la proteómica bidimensional como técnica con capacidad discriminatoria entre perfiles proteómicos de variedades de maíz no aptas para el consumo y la aplicación de esta tecnología en el análisis de riesgos de otras especies vegetales que expresan un transgén diferente. Nuestros resultados indican que la técnica de proteómica 2D permite detectar cambios fisiológicos en muestras de maíz con elevada contaminación fúngica respecto a la misma variedad en condiciones adecuadas para el consumo. Ello indica que, por lo menos en casos severos, esta aproximación podría diferenciar los proteomas aptos y no aptos para el consumo. Se han identificado 2 *spots* que podrían revelarse como marcadores de contaminación biótica en maíz, ya que se acumulan diferencialmente en las muestras contaminadas. También se ha demostrado la adecuación de la proteómica en la evaluación de riesgos de los OMG en el tubérculo de patata cisgénica que expresa una resistencia fúngica.

Se han realizado otros estudios de caracterización masiva de cultivos MG con características agronómicas mejoradas como otros maíces resistentes a insectos (Zeng *et al.* 2014), soja tolerante al herbicida glifosato (García-Villalba *et al.* 2008), arroz con eventos apilados (Liu *et al.* 2012) o arroz con alto contenido en triptófano (Wakasa *et al.* 2006). Aunque en estos experimentos no se hayan incluido tantas variedades como en el presente trabajo, todos ellos revelan que las plantas MG son similares a las respectivas no MG, aunque se detecten diferencias menores. La proteómica 2D se puede usar para estimar cuali- y cuantitativamente los alérgenos gracias a las mejoras en la sensibilidad y precisión de la LC-MS/MS (Thelen *et al.* 2012) y esto es particularmente relevante desde un punto de vista de seguridad alimentaria (Fasoli *et al.* 2009; Ricroch 2013). Estos estudios, igual que nuestros resultados, demostraron variaciones relacionadas con factores como la variedad o el ambiente, los cuales produjeron mayor influencia que la transgénesis.

Existe un interés para generar una base de datos sobre la caracterización, mediante análisis composicionales, tecnologías ómicas o estudios en animales, de las plantas convencionales consideradas seguras y aptas para el consumo incluyendo la diversidad genética natural de diferentes fondos genéticos, localidades, años de cultivo, sistemas de cultivo, etc. ya que, como hemos comprobado en este trabajo, estos son factores que afectan mayoritariamente a los “omas”. De esta manera se podría disponer de un archivo de los valores considerados seguros de los diferentes parámetros testados. Así, cualquier OMG nuevo a testar se podría comparar mediante esta información disponible. Para tal fin, se ha propuesto la creación de un sistema de documentación, CADIMA (www.cadima.info) donde se archiven todos los análisis realizados en diferentes grupos de investigación y se pueda recurrir a ellos en estudios de análisis de riesgos de plantas. De esta manera no se tendrían que repetir los análisis de las variedades convencionales y solamente se necesitarían nuevas aportaciones para actualizar la información.

De forma paralela a la aproximación presentada en esta tesis doctoral, en el marco del proyecto GRACE el grupo de RIKILT (Wageningen, Holanda) ha adaptado el modelo predictivo SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) (Wold y Sjöström 1977; De Maesschalck *et al.* 1999) para usarlo en el análisis de riesgos de las plantas transgénicas e identificar plantas potencialmente peligrosas. El modelo requiere la disposición de diversos perfiles transcriptómicos, proteómicos o metabolómicos de muestras convencionales consideradas seguras, que representarán la variabilidad natural de la especie; así como una nueva variedad a ensayar (en este caso, MG). Se comparan los niveles de todos los transcritos, proteínas o metabolitos de cada muestra, de forma conjunta, en un análisis similar al PCA para reducir la variabilidad de los perfiles ómicos. De esta forma se define un grupo de muestras seguras; frente al que se compara la muestra a testar. En el marco del proyecto GRACE se analizaron de esta forma los transcriptomas y proteomas presentados en esta tesis doctoral, así como los otros perfiles moleculares masivos obtenidos en otros grupos (datos no publicados). En todos los casos el SIMCA mostró que las variedades MG se agrupaban con las variedades seguras, en concordancia con los análisis mostrados anteriormente.

Ómicas sobre órganos animales

Como ya hemos destacado, en la solicitud de autorización de los OMG en la UE se exige un estudio de alimentación a 90 días en roedores para determinar el posible riesgo toxicológico de la PMG. Los estudios

de alimentación a 90 días no están diseñados para detectar posibles efectos reproductivos o de desarrollo. Y por ese motivo, en algunos casos se pueden requerir estudios de alimentación a largo plazo, si existen indicios de cambios estructurales de la planta MG o bien indicios de efectos toxicológicos en los estudios a 90 días en los órganos reproductivos (EFSA 2008).

En este trabajo se han valorado los estudios en animales desde el punto de vista de la información adicional que aportan respecto a los estudios de caracterización molecular, composicional, agronómica y fenotípica de la propia planta MG. Se ha realizado un estudio de alimentación a 90 días y uno a 1 año, ya que no se habían realizado anteriormente estudios a largo plazo en roedores para maíz resistente a insectos. Las mismas variedades de maíz que han sido analizadas en este trabajo mediante las ómicas han sido la base para la fabricación de piensos destinados a los estudios de alimentación en ratas. Se han realizado además estudios de alimentación a 90 días y 1 año con las variedades convencionales para construir un archivo histórico de toda la información de los parámetros en animales de la misma edad, sexo y cepa en el mismo laboratorio.

Tal y como se indica en las adaptaciones del test 408 para la evaluación del riesgo de los transgénicos, durante los estudios de alimentación animal se realizaron observaciones periódicas en todos los animales de todos los grupos. Estas observaciones consisten en determinar el estado de la salud de todos los animales, de todas las mucosas y secreciones, reacciones sensitivas, examinación oftalmológica, análisis bioquímicos y urinarios. También se ha registrado el peso corporal, la ingesta y la bebida. Al final del estudio se sacrificaron los animales y se examinaron los órganos internos. La evaluación de los daños causados por la alimentación se completó mediante la histopatología de cortes de órganos diana. Aunque se detectaron algunas diferencias individuales en algún parámetro concreto, ninguna de éstas fue atribuible a la dieta transgénica. En general no se observaron alteraciones a nivel histopatológico en ninguno de los animales que pudiera atribuirse consistentemente a la ingesta por el maíz MON810. Los resultados obtenidos de los estudios de alimentación mostraron que el maíz MON810 contenido hasta un 33% en la dieta no provocó efectos adversos en las ratas Wistar Han RCC en exposiciones de 90 días y 1 año, independientemente de los fondos genéticos de las variedades de maíz (Zeljenková *et al* 2014; Zeljenková *et al*. 2016). En este trabajo, se consideró que las dosis máximas de maíz que permitían una dieta equilibrada se situaban en torno al 33%. Según información de algunas empresas de fabricación de piensos este valor podría subir hasta aproximadamente un 40%, valor que se está testando actualmente en el marco del proyecto G-TwYST, y que sería deseable ensayar en un estudio de 4 semanas previo al de 90 días (o de mayor duración), con el fin de incluir la mayor cantidad posible de OMG en la dieta, sin perjuicio de su composición equilibrada para los animales en cuestión.

En esta tesis doctoral se ha testado el potencial de las ómicas para detectar posibles efectos toxicológicos derivados del consumo de dieta MG sobre órganos diana de los animales. En este caso las ómicas se realizan sobre órganos diana para determinar rutas celulares alteradas en el tejido y que se puedan explicar por la ingesta del material MG. La transcriptómica y la proteómica se han realizado sobre el hígado por ser el principal órgano con funciones digestivas y detoxificantes. De forma complementaria un grupo de la FUB (*Freie Universität Berlin*) ha estudiado a nivel transcriptómico y proteómico, el intestino de los mismos animales.

El análisis transcriptómico comparativo de los hígados de rata se realizó mediante *microarray*. En todos los casos (excepto en la comparativa ♀♀ 48mg_90d versus ♀♀ 16_90d) las diferencias entre grupos alimentados con maíz MON810 respecto al grupo alimentado con *near-isogenic* fueron menores en comparación a las diferencias entre otros grupos. En el estudio de 90 días, todos los grupos de machos y hembras alimentados con un 33% de maíz MG se sacrificaron por la mañana y los controles (0% de maíz MG) por la tarde. Esta diferencia metodológica se vio reflejada en las rutas celulares alteradas entre estos dos grupos. Los genes diferenciales obtenidos formaban parte de rutas del ritmo circadiano y también de metabolismo de xenobióticos y secreción de ácidos biliares. El ritmo circadiano es un proceso biológico interno, que permite mantener un ritmo de 24 horas de los procesos celulares y permite la adaptación a señales como la luz o la ingesta (Ferrell y Chiang 2015). Los resultados obtenidos de la expresión génica han sugerido que las rutas alteradas como el metabolismo de xenobióticos y secreción biliar han salido diferenciales como consecuencia del horario de sacrificio diferencial. Por el contrario, en el estudio de 1 año los animales se sacrificaron de manera aleatoria y no se observaron genes diferenciales entre los grupos alimentados con maíz MON810 y *near-isogenic*. Estos resultados confirmarían que las diferencias observadas en el estudio de 90 días fueron provocadas por la hora del sacrificio y no por la ingesta de la dieta con maíz transgénico.

Los efectos toxicológicos provocados por la ingesta de maíz transgénico deben manifestarse de igual manera en todos los grupos alimentados con el mismo evento independientemente del genotipo, con la misma dosis del OMG. El estudio de 90 días ha indicado que existen alteraciones hepáticas, que, aunque no se vieron a nivel fenotípico en la exploración necroscópica ni histopatológica, sí se pudo detectar mediante el análisis por *microarray*. Esta observación es indicativa de la elevada sensibilidad de la transcriptómica en comparación a los análisis establecidos para los ensayos de 90 días. Además, se esperaría que cualquier daño severo agudo (cáncer hepático, colestasis) detectado en el estudio de 90 días tuviera también signos en el ensayo de 1 año, y los estudios a 1 año permitirían ver efectos tardíos provocados por la ingesta del MG. En ningún caso se han podido observar genes diferenciales que se expresaran de manera estable en los estudios de 90 días con las dos variedades de maíz de fondo genético diferente y en el estudio de 1 año.

El análisis de expresión dirigido por *array* de qPCR de los ensayos de 90 días y 1 año se centró en detectar genes de patologías hepáticas (cáncer, esteatosis, colestasis y metabolismo de xenobióticos). Los marcadores de estas patologías se expresaron de manera muy variable entre todos los replicados y grupos y no se encontraron consistencias entre grupos indicando que no existe un efecto tóxico derivado de la ingesta del maíz MON810. Se detectaron algunos genes individuales diferenciales en algunos grupos de ratas, pero en ningún caso se vieron rutas completas desreguladas. En el estudio de 90 días se vieron grandes diferencias entre los dos grupos alimentados con los transgénicos de diferentes casas comerciales, lo cual podría deberse a los diferentes estados fisiológicos de los animales en el momento del sacrificio. Los análisis de expresión dirigido, además, nos han permitido validar el experimento del *microarray*, indicando que no existen diferencias entre grupos provocadas por la ingesta de dieta MG.

El análisis transcriptómico por *microarray* de los hígados de los estudios de 90 días ha revelado diferencias a nivel de genes relacionadas a la hora del sacrificio. Otros grupos de investigación que han participado en el proyecto GRACE han visto que existe una desregulación circadiana en órganos como el intestino o

el bazo cuando se han comparado por ómicas (R. Einspanier, datos no publicados). Esto demuestra que la esta técnica es suficientemente sensible como para detectar diferencias de muestreo. Se esperaría pues que la técnica permitiría detectar un efecto toxicológico sobre los hígados producido por la alimentación de maíz transgénico. Este resultado es suficientemente relevante, para tenerse en cuenta en el diseño de futuros estudios para mejorar los resultados y su interpretación.

La expresión de proteínas, estudiadas mediante proteómica 2D sobre el hígado de las ratas del estudio de 90 días, no se vio afectada en las ratas alimentadas con maíz MON810. Por tanto, en este estudio no se pudieron detectar diferencias asociadas al ciclo circadiano ni a la ingesta del transgén. En este caso, esto podría ser debido a que la proteómica 2D se analizan las proteínas más abundantes obtenidas mediante un método de extracción determinado, y éstas podrían no haber sufrido cambios debido al ciclo circadiano o a la alimentación por el maíz MON810. Estos resultados sugieren que la transcriptómica es una herramienta más apropiada para un análisis masivo y no dirigido, que la proteómica 2D.

Se han realizado otros estudios de alimentación a 90 días en ratas para determinar la seguridad de maíz, soja y arroz resistente a insectos o tolerantes a herbicidas. En estos estudios no se reportaron diferencias significativas y por tanto se concluyó que no existían efectos adversos de los eventos testados (Betz *et al.* 2000; Zhu *et al.* 2004; Hammond *et al.* 2006; Poulsen *et al.* 2007). También se han realizado estudios de duración mayor para evaluar riegos de las piensos y alimentos MG. En la mayoría de estudios se han usado ratas, pero también ratones, vacas y peces. La duración de estos estudios depende de la esperanza de vida de los animales de experimentación, aunque generalmente varía entre los 6 meses y 2 años (Ricroch *et al.* 2011; Snell *et al.* 2012). Una discusión detallada sobre los resultados obtenidos en diferentes estudios a largo plazo y multigeneracionales se describe en el artículo de A. Ricroch, así como en las revisiones realizadas en el proyecto GRACE (manuscrito en preparación). En estos estudios se han usado diferentes animales, duraciones y composiciones de la dieta. No se han detectado nuevos peligros de seguridad y estos estudios no han aportado información adicional o suplementaria a la obtenida de los estudios de 90 días. No se habían realizado, previamente, estudios de toxicidad crónica en ratas para testar el maíz MON810, aunque sí se han realizado sobre vacas (Steinke *et al.* 2010). También se ha evaluado en varios estudios soja y arroz tolerante a herbicida (Daleprane *et al.* 2009; Daleprane *et al.* 2009; Snell *et al.* 2012).

En conclusión, los estudios alternativos para valorar los riesgos del maíz MON810 como las ómicas y el estudio de toxicidad a 1 año no han indicado que el maíz MON810 presenta características diferentes al convencional que puedan indicar un riesgo para la salud. Estos resultados son complementarios a los realizados mediante las pruebas ya reglamentadas como los análisis composicionales. En conclusión, se han usado diferentes tecnologías ómicas en algunos estudios y en ningún caso han surgido nuevas incisiones de nuevos riesgos en las plantas MG comerciales, lo cual no sorprende si se considera que las PMG han sido comercializadas y consumidas durante los últimos 18 años.

Los datos obtenidos en esta tesis doctoral han indicado que los análisis por ómicas son capaces de detectar variaciones experimentales (por ejemplo, hora de muestreo) y, por tanto, el diseño experimental debe ser reevaluado para optimizar este tipo de aproximaciones y los datos deben ser evaluados cuidadosamente. Además, la expresión de genes en el intestino e hígado de los animales del estudio de

toxicidad aguda mostró resultados concordantes. Los resultados de este trabajo de los estudios de toxicidad aguda, junto al resto de resultados obtenidos en el mismo proyecto, indican que las tecnologías ómicas ofrecen una oportunidad de análisis y conocimiento de los riesgos potenciales de la planta MG muy global. De esta manera, y si los resultados de la caracterización de la planta no indican un peligro potencial, no existe una necesidad relevante para los estudios de animales. Por tanto, la necesidad de los estudios de toxicidad extendidos a un año está mucho menos justificado.

Paralelamente a la proteómica y transcriptómica, otros grupos del proyecto GRACE han realizado análisis comparativos mediante metabolómica del maíz MON810 respecto al convencional. También se ha aplicado esta metodología sobre los órganos y tejidos de las ratas. De manera similar a los resultados de transcriptómica y proteómica, no se han encontrado diferencias, a nivel de metabolitos, entre el maíz MON810 y las variedades convencionales que indiquen un riesgo para la salud. Los intestinos y bazo de las ratas alimentadas con 33% de maíz MON810 analizado por metabolómica no presentaron signos de alteraciones toxicológicas. De forma complementaria, otro grupo del proyecto GRACE (FUB) ha adaptado los ensayos de toxicidad de plantas MG sobre cultivos celulares intestinales o gástricos (citotoxicidad, proliferación celular, etc.). Los estudios *in vitro*, en general, son más baratos y rápidos que los estudios *in vivo*. La propuesta serviría para utilizar este tipo de estudios como paso previo a los estudios en animales, para disponer de una hipótesis más específica a testar en los estudios de toxicidad animal. Aunque aún no se han establecido los métodos para realizar estudios de toxicidad *in vitro* sobre plantas MG comercializadas existen varios estudios a favor de estos ensayos, que en el futuro podrían reemplazar, al menos parcialmente, los estudios de toxicidad en animales (Bushey *et al* 2014).

Las tecnologías ómicas evaluadas en este trabajo se consideran técnicas prometedoras para complementar o substituir los análisis dirigidos que se exigen en el Reglamento N° 503/2013. Los datos obtenidos, además, en el conjunto del proyecto GRACE demuestran que las ómicas son técnicas muy informativas y sensibles (a nivel cualitativo y cuantitativo), que permiten una evaluación masiva (a diferencia de los análisis dirigidos) de las muestras vegetales para poder usarlas en los procesos de evaluación de alimentos y piensos MG. Las tecnologías ómicas son una aproximación integrativa de análisis de riesgos a nivel de biología de sistema. Esto es que permiten la detección de cambios a nivel molecular, metabólico y fisiológico. Las tecnologías masivas ómicas podrían ayudar en la investigación de efectos no intencionados derivados de la inserción del transgén, ya que permiten una caracterización molecular profunda de las plantas MG.

Por tanto, se propone una reevaluación de los análisis de evaluación de riesgos de los OMG en la UE que incluyan las tecnologías ómicas testadas en esta tesis, transcriptómica, proteómica y también la metabolómica en la caracterización molecular de la planta ya que éstas han demostrado ser mucho más informativas que los análisis composicionales, moleculares, agronómicos y fenotípicos. Sólo en casos, evaluados caso a caso, en los que la planta MG demostrara algún peligro adicional al de la convencional se podrían requerir estudios adicionales y que incluyeran estudios de toxicidad. Además, se realizan ensayos de toxicidad en animales cuando en muchos casos la caracterización molecular de la planta MG

no demuestra un riesgo respecto a la convencional y por tanto no existe ninguna hipótesis a evaluar en los ensayos de toxicidad.

El proceso de transformación genética de las plantas es impredecible y también lo son las posibles reorganizaciones genómicas asociadas. Por este motivo, los efectos colaterales no esperados no se controlan y deben ser evaluados caso a caso. Para evitar estas consecuencias genómicas, una propuesta interesante para la modificación genética sería usar metodologías más “limpias”. Por ejemplo, las ZFN y CRISPR/Cas se han postulado recientemente como una tecnologías eficaces y precisas para provocar cambios en el genoma de manera dirigida (Gaj *et al* 2013; Sander y Joung 2014). Los posibles peligros asociados a estas tecnologías y los criterios para la evaluación de su seguridad, están actualmente en discusión en la EFSA (EFSA 2012d). Se debe mencionar que los efectos no intencionados no son específicos de la tecnología del DNA recombinante, sino también han sido frecuentemente observados en las técnicas de obtención de plantas tradicionales debido a la recombinación genética natural, las reorganizaciones genómicas naturales y la actividad de elementos transponibles en los genomas de plantas (Cellini *et al* 2004; Latham *et al* 2006). Interesantemente, existe un estudio realizado mediante *microarray* que indica que las alteraciones transcriptómicas son mayores en plantas mutagenizadas que en plantas transgénicas (Batista *et al* 2008). A diferencia de las líneas transgénicas, las líneas mutagenizadas no son sometidas a un análisis de seguridad alimentaria en la UE.

Existen varios retos que deberán superarse respecto a la ciencia y tecnología de los alimentos en el futuro próximo. Entre éstos se incluye a) la producción de alimentos funcionales, b) la evaluación de la seguridad, calidad y trazabilidad de los alimentos, c) el desarrollo y producción de nuevos alimentos transgénicos (que incluyan también mejoras nutricionales) y d) la comprensión de los efectos de los beneficios (y riesgos) de estos alimentos en la salud humana y animal. Entre estos retos el uso y evaluación de los transgénicos ha sido tratado en esta tesis. Para ello se han seguido varias aproximaciones, por una parte, se ha realizado un análisis comparativo completo del maíz mediante ómicas y por otra parte se ha testado un modelo que podría simplificar el análisis de riesgos de los transgénicos, como el SIMCA. Las conclusiones extraídas mediante los dos métodos, son comparables e implica que ambas aproximaciones podrían ser válidas. La falta de protocolos experimentales estandarizados aún es un factor limitante para la aplicación de las tecnologías ómicas antes de ser aceptadas por las autoridades reguladoras. Aun así, la implementación rutinaria de estas técnicas en varios grupos de investigación, va a permitir unificar y validar las plataformas de análisis y los protocolos que permitan una comparación de los resultados entre los laboratorios. Se augura que próximamente van a aparecer nuevas y mejoradas metodologías de análisis masivo como mejora de la profundidad en la proteómica y metabolómica, que harán el análisis de los OMG más fiable y eficaz. Por otra parte, también se espera que las herramientas bioinformáticas se extiendan y estandaricen para que sean útiles para cualquier profesional del sector independientemente de la formación.

Hemos abordado la cuestión de si las tecnologías alternativas como las ómicas o los estudios a largo plazo en animales, pueden proveer indicaciones útiles para determinar los efectos no intencionados en alimentos o piensos MG. La aplicación de las regulaciones estrictas en la UE no es científicamente defendible, ya que establece la obligatoriedad de realizar estudios en animales; cuando los estudios en profundidad de las plantas MG podrían aportar una información muy profunda sobre posibles impactos de las plantas MG.

Este criterio es compartido en el seno del proyecto GRACE y también las diferentes partes interesadas, incluidas, no solamente empresas del sector sino también agricultores y defensores de los derechos de los animales. En caso de que los estudios sobre el material vegetal aportaran alguna hipótesis de toxicidad, los estudios con animales (de duración dependiente del tipo de indicio de toxicidad) deberían realizarse. En este caso, la inclusión de estudios realizados con técnicas ómicas (en este momento, y por su cobertura, preferentemente transcriptómica), debería permitir extraer mayor información a partir de los estudios en animales. En este sentido, y a falta de experimentos realizados con sustancias que presenten una toxicidad demostrada, podría especularse que la inclusión de análisis ómicos sobre órganos diana de rata podría permitir acortar este tipo de estudios (lo que repercutiría en su coste y en una reducción del número de animales utilizados). Los estudios a largo plazo solo deberían considerarse caso a caso, cuando existan indicaciones de un efecto cancerígeno de la planta MG o cuando existan incertidumbres sobre la seguridad nutricional de la planta MG después de realizar los estudios a 90 días.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El análisis transcriptómico del embrión de maíz mediante secuenciación masiva por RNA-seq, ha permitido detectar y cuantificar más de 160.000 isoformas que representan todo el genoma, en un total de 11 muestras correspondientes a 2 variedades de maíz MON810 y 6 convencionales, cultivadas en 2 condiciones ambientales diferentes.
2. En las tres comparaciones entre maíz MON810 y *near-isogenic*, con fondos genéticos y condiciones ambientales distintas, se han observado tasas de cambio transcriptómico muy bajas (0,01%), representando 50 veces menos que entre convencionales.
3. Los transcritos diferencialmente expresados en muestras MG respecto *near-isogenic* no se han integrado en rutas metabólicas alteradas y se expresan al mismo nivel que el observado en las variedades convencionales. Ninguno de los transcritos ha sido diferencial común en diferentes variedades de maíz MON810, excepto una isoforma mapeada en una región con un transpón anotado.
4. El análisis proteómico bidimensional de semilla de maíz ha permitido cuantificar unos 1.200 *spots* que representan ~ 2% de las proteínas totales, en un total de 16 muestras correspondientes a 2 variedades de maíz MON810 y 7 convencionales, cultivadas en 2 condiciones ambientales diferentes.
5. En las tres comparaciones entre maíz MON810 y *near-isogenic*, con fondos genéticos y condiciones ambientales distintas, se han observado tasas de cambio proteómico del 0,72%, mientras que, en las convencionales, se han visto el doble.
6. Los cambios proteómicos observados entre variedades MG y sus respectivas *near-isogenic* han sido particulares de cada par de variedades. Las proteínas correspondieron mayoritariamente a proteínas muy abundantes en el grano seco y maduro de maíz, como LEA, HSP o proteínas de reserva del tipo globulinas. Los niveles de acumulación de estas proteínas varían a lo largo del desarrollo del grano y en función de las condiciones ambientales como se ha visto en el resto de variedades convencionales.
7. La proteómica 2D ha permitido discriminar proteomas de variedades de maíz con elevada contaminación fúngica, debido a un cambio fisiológico importante, y no aptas para el consumo.
8. La adecuación de la ómicas en la evaluación de riesgos asociados a OMG varía en función de las especies vegetales y tejidos de interés, presentando una mayor cobertura en el análisis del grano de maíz que en el del tubérculo de patata, en que se resolvieron menos *spots* y se observó una variabilidad proteómica más elevada.

9. Ninguno de los transcritos ni proteínas diferenciales observados en el maíz MON810 se ha asociado a una consecuencia directa de la inserción y/o expresión del transgén *cry1A(b)*, demostrando la equivalencia substancial del maíz MON810. Las ómicas permiten el análisis integrado y masivo de varios miles de analitos a diferencia de los testados en los análisis composicionales dirigidos.
10. Los transcriptomas obtenidos por hibridación en *microarray* de los hígados de ratas alimentadas con 33% MON810 durante 90 días mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto a las que recibieron dietas control (33% maíz convencional). Estas diferencias se identificaron con cambios asociados con el ciclo circadiano y los procesos que éste regula; y pudieron explicarse por la diferencia horaria en el sacrificio de los animales. El análisis de expresión dirigido del estudio de toxicidad de 90 días ha concluido que los pocos genes alterados carecen de relevancia biológica ya que no se asocian a un efecto tóxico de la dieta MG sobre la salud.
11. Los transcriptomas obtenidos por hibridación en *microarray* de los hígados de ratas alimentadas con 33% MON810 durante 1 año no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a las que recibieron dietas control (33% maíz convencional) confirmando el resultado de los estudios a 90 días.
12. La detección de cambios en el ciclo circadiano entre los distintos grupos de ratas en el ensayo a 90 días demostró la mayor sensibilidad del análisis transcriptómico de órganos como el hígado, respecto a los estudios de toxicidad estándar, cuando se aplican a alimentos o piensos enteros. El análisis transcriptómico, mediante tecnología de hibridación de *microarray*, se postula como una herramienta capaz de aportar información adicional a los ensayos de toxicidad de OMG con alimentos/piensos enteros en ratas.
13. Los ensayos de toxicidad en ratas durante 90 días y 1 año mediante análisis de expresión dirigido, *microarray* y proteómica 2D, no han permitido detectar diferencias significativas entre grupos tratados y grupos control que pudieran atribuirse a la ingesta de pienso MON810. Este resultado confirma la seguridad del maíz MON810 sobre la salud de las ratas.
14. El análisis proteómico 2D de los hígados de rata ha permitido comparar 1.000 *spots*, de los cuales el 0,4% han mostrado acumulación diferencial en los hígados de ratas alimentadas durante 90 días con 33% MON810 respecto a las que recibieron maíz convencional. Estas diferencias podrían ser causadas por el horario de sacrificio diferencial entre ambos grupos. No se detectaron proteínas diferenciales en la comparativa directa.
15. Las tecnologías ómicas ensayadas, secuenciación masiva, *microarray* y proteómica 2D, se postulan como herramientas alternativas y adecuadas para el análisis de riesgos de las plantas MG.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico

Maíz

Todas las muestras de maíz utilizadas en esta tesis fueron cultivadas en campos de agricultor, siguiendo las prácticas agrícolas estándar en la región de l'Empordà (Girona, Catalunya, España; 42° 05' N, 3°E). Las variedades a ensayar fueron elegidas con el criterio de su elevado uso comercial histórico en la región. Las semillas fueron obtenidas en mercados locales y se sembró aproximadamente una hectárea de cada variedad de MON810 y las respectivas líneas *near-isogenic* y unos 500 m² de las otras variedades convencionales, durante la temporada de siembra de los años 2012 y 2013. La densidad de siembra fue de 80.000 plantas por ha, con un espacio de 75 cm entre hileras. En los campos cercanos no hubo cultivo de maíz durante la misma época para minimizar el riesgo polinización cruzada.

Los aspectos agronómicos más destacados fueron los siguientes:

- Fertilización: 600 kg de N, P y K (15-15-15 NPK), se aplicó antes de la siembra
- Las malas hierbas se controlaron mediante aplicación de herbicida de preemergencia (HARNESS® GTZ, 4 L/ha, principio activo: 41% acetoclor, 19,5% terbutilazina); y aplicación de herbicida de postemergencia (Callisto®, 1 L/ha, principio activo: 480 g/L de mesotriona), en caso de necesidad.
- No se aplicó insecticida.

Se registraron todos los datos climáticos (estación meteorológica en la zona de la Fundación Agronómica Experimental Mas Badia), morfológicos, fisiológicos, agronómicos, fenológicos y patológicos (inspección visual en campo por expertos del mismo centro). Todos los registros fueron habituales en la zona, aunque se observaron las siguientes particularidades:

Año 2012: la presencia de *S. nonagrioides* y *O. nubilalis* fue inferior a 0,4% (menos de 0,06 larvas de taladro por planta de maíz convencional). No se observaron infecciones víricas (MDMV y MRDV) ni de hongos en campo. Especial atención merecen las etapas de floración y maduración, que en la cosecha del 2012 fueron como se esperaba; y el rendimiento se consideró muy bueno (13.000-14000 kg/ha).

Año 2013: se detectó hasta un 13% de infestación por taladro en algunas variedades convencionales. Se observó asimismo infección fúngica, que afectó entorno al 10% de las plantas de las variedades DKC6666 y SYNEPAL. En pleno período de fertilización (19 de julio) se produjo una tormenta de granizo considerada anormalmente intensa, que tuvo una afectación puntualmente muy fuerte.

A finales de verano se cosechó cuando los granos de cada variedad se consideraron en madurez fisiológica y preparados para la cosecha. Su contenido hídrico se situó en torno al 14-16%. Se recolectó la parte central de cada campo (descartando los bordes) y se separaron los granos de las mazorcas *in situ* de manera mecánica. Después de la cosecha los granos se secaron en un horno industrial durante 1-2 días a 60°C para lograr un contenido hídrico inferior al 14%, lo que garantiza su mejor conservación.

Dietas

Se muestrearon los granos de maíz de todas las variedades siguiendo la norma ISO 24333 para la toma de muestras de cereales (AENOR 2009). Una alícuota de unos 250 g de los granos de maíz se guardaron en el laboratorio a -80°C. Otra alícuota de unos 90 kg (del año 2012) y de 500 kg (del año 2013) destinados a los estudios de alimentación en ratas de noventa días y un año, respectivamente, se enviaron a Mucedola S.L., empresa italiana de fabricación de piensos. Allí los granos se molturaron y se prepararon las dietas. Una alícuota de 1 kg del grano molturado y de las dietas preparadas fueron enviadas a RIKILT, Wageningen, Holanda, donde se codificaron y se distribuyeron a los respectivos laboratorios encargados de los análisis composicionales y de las ómicas sobre el maíz y las dietas. De esta forma se estableció un ensayo doble ciego.

Las dietas se obtuvieron en la empresa Mucedola siguiendo las recomendaciones nutricionales de los expertos de la empresa Harlan UK Ltd. Se estableció que todas las dietas debían ser isocalóricas y isoproteicas (Tabla 28). Las dietas fueron ajustadas siguiendo los requisitos nutricionales de las ratas de la cepa Wistar Han, que se utilizó en los ensayos. Todas las dietas tenían el mismo porcentaje de maíz, que se estableció en el 33%, valor cercano al máximo posible en dietas equilibradas para este tipo de animales; y se utilizaron únicamente ingredientes vegetales no MG: además del maíz se incluyó trigo, soja y aceite de soja (Tabla 29). Se realizó un análisis composicional exhaustivo de todas las dietas, que incluyó composición química, contenido de OMGs, contaminación química (micotoxinas, metales pesados, pesticidas) y contaminación microbiológica.

Tabla 28. Composición nutricional de las dietas.

Macronutrientes	% (p/p)
Proteínas	16,2
Carbohidratos	45,6
Lípidos	6,1
Fibra	3,8
Fibra neutra detergente	15,2
Ceniza	6,4
Energía (kcal/g)	3,0

Tabla 29. Ingredientes de las dietas.

Ingrediente	% (p/p)	Ingrediente	% (p/p)
Maíz	33,0	CaHPO ₄	0,8
Germen de trigo	25,0	Sal	0,5
Trigo	18,2	Minerales	0,5
Harina de soja (48%)	15,0	Vitaminas	0,5
Aceite de soja	3,5	L-lisina	0,2
CaCO ₃	1,7	DL-metionina	0,1
Levadura de cerveza	1,0	Cloruro de colina	0,05

Patata

Se cultivaron 7 líneas de patata comerciales, 6 líneas experimentales y un par MG y *near-isogenic* en el centro *Plant Sciences de la University of Wageningen UR* (Wageningen, Holanda). Los tubérculos fueron cosechados en setiembre de los años 2010, 2011 y 2012 como se describe en van Dijk *et al*, 2009; 2012. Ocho tubérculos de peso medio de cada cosecha se seleccionaron para cada variedad y se lavaron con agua. Posteriormente se cortaron manualmente en cubos de 1cm³ y se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se liofilizaron durante 18 horas y se molturó con un mortero hasta obtener un polvo fino. Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Ratas

Los estudios de alimentación en ratas (90 días y 1 año) se describen en los artículos Zeljenková *et al* 2014 y Zeljenková *et al*, 2016. Éstos se llevaron a cabo siguiendo los documentos guía establecidos por la EFSA (EFSA 2011b) y la OECD (TC408, OECD, 1998). Los ensayos se realizaron cumpliendo los requisitos de las buenas prácticas de laboratorio (GLP) en el estabulario del Departamento de Toxicología de la *Slovak Medical University en Bratislava* (Eslovaquia). Ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar Han RCC machos y hembras de 5 semanas de edad, con un peso homogéneo ($\pm 20\%$ de la media), se obtuvieron de Harlan (San Pietro al Natisone, Italia) y se empezó el estudio una semana después de recibir los animales. En cada jaula se estabularon dos animales del mismo sexo y tratamiento; y se definió cada jaula como una unidad experimental, tal y como recomienda la EFSA.

El cálculo del tamaño de la muestra se basó en un efecto estandarizado (SES, *standardised effect size*: la diferencia de las medias entre el grupo control y el tratado dividido por la desviación estándar). Se asumió que un SES con una DS de 1 o menos no tenía relevancia a nivel toxicológico. Este cálculo, mediante un test de dos colas y nivel de significancia del 5%, reveló que un grupo de 17 y 20 ratas tendrían el 80% y el 90% de probabilidades, respectivamente, de detectar diferencias entre los grupos de la dieta MG y control de los estudios de 90 días y un año. Para el estudio de 90 días se redondeó a 16 porque las ratas debían enjaularse por parejas.

Finalizados los estudios de 90 días y 1 año se realizó la necropsia y se registraron los pesos húmedos de los órganos. Las muestras de los órganos se guardaron en una solución neutralizada de formalina 10%. Posteriormente, se realizó un análisis histopatológico de los órganos (Zeljenková *et al* 2014; Zeljenková *et al* 2016). Los órganos sobre los que se realizaron los estudios ómicos (en esta tesis, el hígado) se extirparon y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, conservándose a -80°C.

Primers

Para el diseño de *primers* se ha usado la herramienta Primer-BLAST del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Se muestran las secuencias y características de aquellos destinados a validación del RNA-Seq realizado en maíz (Tabla 30) y a los análisis de expresión dirigida de genes relacionados con toxicidad hepática en rata (Tabla 31).

Tabla 30. *Primers* de la validación del análisis RNA-Seq en embrión de maíz.

Gen	Descripción	Id Transcrito	Secuencia (5'→3')	Producto (pb)
adh	alcohol dehydrogenase		F: TTGGACTAGAAATCTCGTGCTGA R: GCTACATAGGGAGCCTTGTCCT	
cc3	<i>Putative cystatin</i>	GRMZM2G440968_T01	F: TGAGGTACACAATGAGCGGC R: CAGCATCGCGTTGGTCTTG	139
ccmc	<i>Cytochrome c biogenesis C</i>	GRMZM2G407837_T01	F: CTCTACTCACCCACGCGTTT R: CCGTCCCCTCTTACCCCTAA	200
ccmfn	<i>Cytochrome c biogenesis FN</i>	GRMZM2G314328_T01	F: TTGTGGCGCGAAGTACTCTT R: TCCATAACATAACGGGGCGG	72
cl276081	<i>Acyl-desaturase</i>	GRMZM2G316362_T01	F: TGTCGCTAGCTGTCAGTGTC R: TCCAATCTGGGTTCCAAATCGT	150
cox1	<i>Cytochrome c oxidase subunit 1</i>	GRMZM2G450825_T01	F: CCACATTCTGGGCACAGCTA R: ATCCCAGTCAACCCATGCTG	87
cwc15	<i>Pre-mRNA-splicing factor cwc15</i>	GRMZM2G154278_T02	F: TGTC AAGAGAAGGTGGGACGA R: CGGTGGAAGTCACTCCTGAT	108
deh13	<i>Dehydrin 13</i>	GRMZM2G169372_T03	F: TCAAGGACAAGATCACCGGC R: CTGTGCTGCGACACCAGAT	157
fpgs	<i>Folypolyglutamate synthase</i>	GRMZM2G393334_T01	F: ATCTCGTTGGGGATGTCTTG R: AGCACCGTTCAAATGTCTCC	132
hsp22	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G007729_T03	F: CAGACCCATTTGCTTTGCTCTC R: GACCAACAAGACGAAGTCAGC	101
loc100192606	<i>NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein</i>	GRMZM2G095206_T02	F: TCCTGCTGTTCTGCCTTCTC R: TCTGGATAAACATCTTCGTCTTC	154
loc100274565	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G047274_T01	F: ACCTCATCACAGATCAGGATTTCA R: GTTCACGGGACTGGGTCTTA	162
loc100279473	<i>Putative SAC3/GANP family protein</i>	GRMZM2G134753_T01	F: GGTTTATGAAACACATGCCCGA R: CAGTTGTGACTGGCACTGGT	76
loc100282956	<i>16.9 kDa class I heat shock protein 3</i>	GRMZM2G049767_T01	F: TGGTGTCAAGTACGTCTGGC R: AGCTTCCAAGTTGGGGGAAC	141
loc100381655	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G098875_T02	F: AGTTGAGGCTGGTGTGCGATT R: TTGAGGTGCTTTGACTCTCTG	110
loc103646028	<i>Histone H4</i>	GRMZM2G421279_T01	F: GTCGCTGTGTTCTGTGGTGTC R: GCAGCTCTCTGGGCAAATAAA	199
loc103647134	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM5G874578_T01	F: TTGATGAGAGGGTCGGGGT R: GGATGAAATGGCTGTTGCGG	188
lug	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G425377_T01	F: TGCATGAATTGAATCGCAGC R: GGTGGAAAACACACGAGTGGA	178
mep	<i>Serinc-domain containing serine and sphingolipid biosynthesis protein</i>	GRMZM2G018103_T01	F: TGTACTCGGCAATGCTCTTG R: TTTGATGCTCCAGGCTTACC	203

mon	cry1A(b)		F: GATGCCTTCTCCCTAGTGTTGA	113
nad2	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G406378_T01	R: GGATGCACTCGTTGATGTTTG F: AATGCCCCAGGTCACAAGAG	177
nad4l	<i>NADH dehydrogenase subunit 4L</i>	GRMZM2G475482_T01	R: TCTCTTCTACCGATGCCCA F: GTCAGAGATTGCCGTGGAGAT	99
opr2	<i>12-oxophytodienoate reductase 2</i>	GRMZM2G000236_T01	R: ACCAAAGCTGTTTCAGTCCCT F: ATCGGGAGGAAGGCAACAAG	142
pco105720b	<i>Calmodulin-like protein</i>	GRMZM2G088819_T01	R: TAGAAGGTGGAGCGGTCGTA F: GAAACCAGCCACTGAAACGG	81
pgm	<i>Phosphoglucomutase, cytoplasmic 1</i>	GRMZM2G109383_T01	R: ATTTCTGAACAAACGCGACCG F: GCTCAAGCTCTCCAAGATGC	273
prms	<i>Pathogenesis-related protein PRMS</i>	AC205274.3_FGT001	R: AACGCTCCCAATTACAGCAC F: TACTCCGAGAACTCGCCTCA	114
rps12	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G358236_T02	R: GTACTTCTCCGCGAACTGCT F: GCGTGCTTCGGATCAATGTC	151
rps7	<i>Putative uncharacterized protein rps7</i>	GRMZM2G069427_T01	R: ACCTTCGCCTGGAATGTGAG F: GCTTGCGAATTTGCAGCACC	166
stk11	<i>CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 11</i>	GRMZM2G177050_T01	R: GTTGAACACGCAGCCTTCTT F: ATCAAGTCGTTCCCAACCC	159
ubce	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme spm2</i>	GRMZM2G027378_T01	R: CAGCACGAAGTGGACCTTCT F: TGCGTTAATCAGGAGACAGG	267
uch	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase</i>	GRMZM2G164418_T01	R: AATCACAAAGACAGGCAGGG F: CCCATAACCGAGGACAGTA	184
unch1	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G038874_T01	R: TGTCCCCCTAAACCAATGAA F: TGCAACTAGCCGATGCTTTG	78
unch2	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G141605_T01	R: CGAATGATTTGAAATACGCATCCCT F: TACACAGGTGTGGGCTTACAG	71
unch3	<i>Putative uncharacterized protein orf111-a</i>	GRMZM5G897562_T01	R: AAGTGACCGACCCCTTGATGA F: ACACGGGCAAGGAAGCATAA	171
unch4	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G128754_T01	R: TCGATTCAATCCTGCCCCAG F: GAAAGGGAACCGTCTACCAGTT	168
wak	<i>Putative WAK receptor-like protein kinase family protein</i>	GRMZM2G456487_T01	R: GAAGGGGTAATACGCACTAAGCAC F: AAGCGATTGCAATAGGGACCTC	179
zm119316	<i>Pollenless3</i>	GRMZM2G123986_T01	R: GGACTCCATGTCAAGTGTACC F: GATCCGGGAGAAGGTTCCAGC	200
zm125695	<i>Tyrosine/DOPA decarboxylase 1</i>	GRMZM2G009400_T01	R: ACCAGCTGGAAGTGCTTGG F: TGTGTGCTATACGACCTGCC	76
zm128370	<i>DRE-binding protein 3</i>	GRMZM2G069126_T01	R: TCAGCTCTGTTCCAGGATGGC F: AGACATTACCATCGCATCGCA	70
zm28206	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G098999_T01	R: GATGTTGTGGCTACCTTCGC F: TCATTATCGGCACAAAAGGACA	195

zm32438	<i>Class IV heat shock protein</i>	GRMZM2G346839_T01	R: GCTACCGATAGCTGCTTTGGA F: GGAGCTCTGAACAGTCAAACG	73
zm33200	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G369182_T01	R: ACGTCGTGGAACATACAGAACA F: GGCCGAGATGAGGAAGATGG	136
zm3740	<i>22.0 kDa class IV heat shock protein</i>	GRMZM2G375517_T01	R: GAGAGCTCATCGACCCACAC F: GCGTGACGATGCATTCAGAC	73
zm40861	<i>Carotene epsilon-ring hydroxylase</i>	GRMZM2G143202_T01	R: GCAACGGGATCAATACGCAC F: ATAGGTGCTGTTACGGCGTG	122
zm64734	<i>Uncharacterized protein</i>	GRMZM2G121654_T01	R: TATCCCAAACCTCTGGGGAC F: AGCCAGCTTTGCTTCTCTCT	136
zm7377401	<i>Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein</i>	GRMZM2G099758_T02	R: GCAGTGCAGTTGCCTTCTTT F: TCCTCCGCCCTCCAGTTCTTA	125
zm97159	<i>50S ribosomal protein L27</i>	GRMZM5G804816_T03	R: TAGAGGTCGGAGAGCCAATGT F: TGGTAATCAGCATGGCACTGT	100
zfp16-2	<i>ZFP16-2</i>	GRMZM2G002805_T01	R: CCAGATAACTCTGTAGCACTGGT F: TCCGCACGAAAAACATCACC	112
			R: TGAGTCATCTCTTCGCGGTC	

Tabla 31. *Primers del análisis de expresión dirigida en hígado de rata.*

Gen	Descripción	UniGene	Secuencia (5'→3')	Producto (bp)
Acaa1	<i>AcetylCoA acyltransferase 1A</i>	NM_012489.2	F: GCCCTGTCAAGTACCCCAAG R: CGTCAGAGGTACAGATGGCTT	76
Acat1	<i>AcetylcoA acetyltransferase 1</i>	NM_017075.2	F: AGCCATTGAAAAGGCAGGGA R: GCAATGGGTAGACCTGCACC	126
Acox1	<i>AcylCoA oxidase 1, palmitoyl</i>	NM_017340.2	F: CTCCTCGAAGCCAGCGTTA R: TTGAGGCCAACAGGTTCCAC	149
Acsl4	<i>AcylCoA synthetase longchain family member 4</i>	XM_006257316.2	F: GAAAGCAAAGTGAAGGCGGC R: TCGGGGTACTCCGCTCTATT	95
Adh7	<i>Alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide</i>	NM_134329.1	F: ACAGACAAAGCATGTGCGAGAGA R: CAGAATGAGAGCTCGGGTGG	79
Atf4	<i>Activating transcription factor 4</i>	NM_024403.2	F: AATGGCTGGCTATGGATGGG R: TCTGTCCCGAAAAGGCATC	70
Atf6	<i>Activating transcription factor 6</i>	NM_001107196.1	F: ACCAGGTGAAGACTGGGAGT R: TTAATGTCTGAGCAGAAGTGGCT	189
Cat	<i>Catalase</i>	NM_012520.2	F: CACAGTCGCTGGAGAGTCAG R: CCCACAAGGTCCCAGTTACC	99
Cpt1	<i>Carnitine palmitoyltransferase 1</i>	XM_006230695.1	F: CTAGACACCACTGGCCGAAT R: CCCAGAGCCCTGTACCAAAG	76
Cpt2	<i>Carnitine palmitoyltransferase 2</i>	NM_012930.1	F: TTTGAGACTGGCGTTGGGAA R: ACCAGGGGCCTGAGATGTAG	91
Echs1	<i>Enoyl coa hydratase, short chain, 1, mitochondrial</i>	XM_003748886.2	F: GCCACTGGGACCATATCACC	73

Eif2ak3	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3</i>	NM_031599.2	R: CCCCCACCAAGAGCATAGC F: GCTTGCTCCCACATCGGATA	200
Nr1h3	<i>Nuclear Receptor Subfamily 1, Group H, Member 3</i>	XM_006234535.	R: CTAAGGACCTGCCGCGAG F: CAGAGCCTACAGAACTTCGTCC	71
Xbp1	<i>Xbox binding protein 1</i>	NM_001271731.1	R: TAGCTCGTTCCCCAGCATTT F: CTGAGTCCGCAGCAGGTG	78
Afp	<i>Alphafetoprotein</i>	NM_012493.2	R: AAGAGGCAACAGCGTCAGAA F: CAGGATGGGGAAAGCGTCA	72
Ctnnb1	<i>Catenin (cadherin associated protein), beta 1</i>	XM_008766691.1	R: GCACTCTGCTGTTTTGCTCG F: ACCTGTAAATCGTCCTTTAGGAGT	121
Gldn	<i>Gliomedin</i>	NM_181382.2	R: GGAACAAGCAAGGCTAGGGT F: CATCTGCCTTACAGGACCACC	90
Got1	<i>Glutamicoxaloacetic transaminase 1, soluble</i>	NM_012571.2	R: AGACCAGGCTGTCCATCTGA F: GTCCCCTCAGATTCCATCGC	155
Gpc3	<i>Glypican 3</i>	NM_012774.1	R: TCATCTGTGCGGTACGCTCC F: CTCTGGTGACGGCATGATGA	93
Gpt1	<i>Glutamicpyruvate transaminase 1</i>	XM_008765599.1	R: TTGTTCCCTGGAGCATCGTC F: GTTTGGGTCCTGCTGGTAAGA	152
Hspa1a	<i>Heat shock 70 kda protein 1a</i>	NM_031971.2	R: CAGGATGCTCTGATATCTTGGCT F: CGCTCCAGGTGTGATCTAGG	92
Hspa4	<i>Heat shock 70 kda protein 4</i>	XM_006246232.1	R: TTGCAGACCGAACGAAGGAG F: AGCAGCAAAGAGCCAGGTAAT	79
Hspa5	<i>Heat shock 70 kda protein 5</i>	NM_013083.2	R: TGAGAATGCACGCCCATGAA F: CTACGAAGGTGAACGACCCC	75
lfna	<i>Interferon alpha</i>	NM_001014786.1	R: GCAGGAGGGATTCCAGTCAG F: TCATGCCTGAAGGACAGAAAGT	97
lfnb1	<i>Interferon beta 1, fibroblast</i>	NM_019127.1	R: GCTCATGCAGGACAGGGATA F: TGCCCTCTCCATCGACTACA	103
Il1a	<i>Interleukin 1 alpha</i>	NM_017019.1	R: GCTGAGGTTGAGCCTTCCAT F: ACTCATCGGGAGGAGACGAC	115
Il1b	<i>Interleukin 1 beta</i>	NM_031512.2	R: TCCGGAATCTCCTTCAGCAAC F: CAGCTTTCGACAGTGAGGAGA	139
Il6	<i>Interleukin 6</i>	NM_012589.2	R: TTGTCGAGATGCTGCTGTGA F: CACTTCACAAGTCGGAGGCT	77
Il6r	<i>Interleukin 6 receptor</i>	XM_008761127.1	R: TGCCATTGCACAACCTTTTCT F: CCACACAGGTCTCTGTTGAAGA	200
Ldha	<i>Lactate dehydrogenase A</i>	NM_017025.1	R: TGACTTCCATTTCTTCTTGAGTCT F: ATCTCGCGCACGCTACTG	72
Mdk	<i>Midkine</i>	XM_006234593.2	R: TTGAATCTTTGGGACCGCT F: GACCTCTGCCTAGGGGCTTA	82
Pik3ca	<i>Phosphatidylinositol4,5bisphosphate 3kinase, catalytic subunit alpha</i>	NM_133399.2	R: GTTATCATCCAGCGGGAGC F: TCAGATCATCCGAATCATGGAGA	70

Ppara	<i>Peroxisome proliferator activated receptor alpha</i>	NM_013196.1	R: GCCATAAGGTAGCATGCGAAG F: GTCCTCTGGTTGTCCCCTTG	143
Psmc3	<i>Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3</i>	NM_001011894.1	R: TCAGTCTTGGCTCGCCTCTA F: TCGTTGCTGAAGGTGGATCA	84
Rxra	<i>Retinoid x receptor alpha</i>	NM_012805.2	R: CACCAAGTCTTCTGCCTCACT F: CGCTCCTCAGGCAAACACTA	104
St13	<i>Suppression of tumorigenicity 13</i>	NM_031122.1	R: TTGTTGTCACGGCAGGTGTA F: ATGCCAAGAGAGCCAGTGTTT	124
Tgfb1	<i>Transforming growth factor, beta 1</i>	NM_021578.2	R: TCGCCTTTCCCTCTCCATTT F: CTGCTGACCCCCACTGATAC	94
Tnfa	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>	XM_008772775.1	R: AGCCCTGTATTCCGTCTCCT F: ATGGGCTCCCTCTCATCAGT	106
Tp53	<i>Cellular tumor antigen p53</i>	NM_030989.3	R: GCTTGGTGGTTTGTACGAC F: AGCGACTACAGTTAGGGGGT	198
Ak4	<i>Adenylate kinase 4</i>	XM_006238445.2	R: CGCTGTGGTGGGCAGAATA F: CACCAGTTTTCTGGGACGGA	148
Cyp1a1	<i>Cytochrome p450, family 1, subfamily a, polypeptide 1</i>	NM_012540.2	R: GCATGATTGAGTGGGCAACC F: CCCTAACTCTCCCTGGATGC	107
Cyp1a2	<i>Cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2</i>	NM_012541.3	R: GGATGTGGCCCTTCTCAAATG F: GAGCGAGGAGATGCTCAACC	79
Cyp2a1	<i>Cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 1</i>	XM_008759105.1	R: GAAGTCCACAGCATTCCCTGA F: ACGTACAGGTTGCAAAGATGG	148
Cyp2b1	<i>Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 1</i>	XM_008765491.1	R: GTAGTCCTGGCAGACATGGTAG F: TACCAACCCTTGATGACCGC	132
Cyp2b3	<i>Cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 3</i>	NM_173294.2	R: GGTACCCTCGGAACATGGTG F: ATAAGGGAGGCTCTGGTGGA	92
Cyp2c11	<i>Cytochrome P450, subfamily 2, polypeptide 11</i>	NM_019184.2	R: GACACACCGTATTCCTGCAT F: TGAAGGACATCGGCCAATCAA	81
Cyp2c13	<i>Cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 13</i>	NM_138514.1	R: AGGGCTTCATGCCCAAATACA F: CCTTCTCAGCAGGAAAACGGA	124
Cyp2c6v1	<i>Cytochrome P450 2C6</i>	XM_008759632.1	R: TGATGTCCTTTGGGTCAACCAG F: AGTGCCTTGTGGAGGAACTG	77
Cyp2d3	<i>Cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 3</i>	NM_173093.1	R: GGAGTGAGTAGCATTACATAGC F: AAGACTTGGGACCCTGACCA	76
Cyp2d4	<i>Cytochrome P450 2D4</i>	NM_138515.2	R: TCCCTTGGCCTTCTCTATCT F: ATGACCCACGCTTCATCAGG	87
Cyp3a1	<i>Cytochrome P450 3A1</i>	NM_013105.2	R: ACACATTCAGGAGCATGGGC F: TTCTAAAGTTGTGCCACGG	70
Cyp3a2	<i>Cytochrome P450 3A2</i>	NM_153312.2	R: ATTCAGCAGAACTCCTTGAGGG F: GGAGTTGGCAAGGTCTGTGA	74
Gpx1	<i>Glutathione peroxidase 1</i>	NM_030826.3	R: GATGTGGATGGAGATGGTCCC F: CCGGGACTACACCGAAATGA	104

Gstm1	<i>Glutathione s transferase mu 1</i>	NM_017014.1	R: TGCCATTCTCCTGATGTCCG F: TTTTGGAGCCCAAGTGCCTG	189
Gstm2	<i>Glutathione s transferase mu 2</i>	NM_177426.1	R: GACAGGTCCCTCCCTGTGAGT F: ATTTGAACCCAAGTGCCTGGA	70
Otc	<i>Ornithine carbamoyltransferase</i>	NM_013078.1	R: CTTCAGGCCCTCAAACCGAG F: GGATCCTGCTCAACAAGGCA	76
Sod1	<i>Superoxide dismutase 1, soluble</i>	NM_017050.1	R: ACTGGCTTCCCATACCGAAA F: TTTTGCTCTCCAGGTTCCG	151
Sord	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>	NM_017052.2	R: TGTCTGACACCACAAGTGG F: ATCCAGCCGACACCTCAAAG	112
Bad	<i>BCL2associated agonist of cell death</i>	NM_022698.1	R: ATTGGGTAGTTCTCCAGGCG F: CTTGAGGAAGTCCGATCCCG	82
Bcl2	<i>Bcell CLL/lymphoma 2, apoptosis regulator</i>	NM_016993.1	R: CATACTCTGGGCTGCTGGTC F: GGATAACGGAGGCTGGGATG	88
Casp3	<i>Caspase 3</i>		R: CGTCTTCAGAGACAGCCAGG F: GAGCTTGGAACGCGAAGAAA	113
Casp6	<i>Caspase 6</i>	NM_031775.3	R: GAGTCCATCGACTTGCTTCCA F: CCAGCTCAAGACCCCTAACC	107
Casp7	<i>Caspase 7</i>	XM_008760550.1	R: ACTTTCCCCTGTGGACAGCA F: CTATGTGCCCCGTCAGTACC	130
Casp9	<i>Caspase 9, apoptosisrelated cysteine peptidase</i>	NM_031632.1	R: CGGACATCCATACCTGTCCG F: GAACCAGGGTCCAGCAATC	168
Casp12	<i>Caspase 12</i>	NM_130422.1	R: CCTGCCCGCTGAATATCCTC F: TGCCAATTCCGACAAACAGC	99
Ccl2	<i>Chemokine (CC motif) ligand 2</i>	NM_031530.1	R: CTGGATTCTGATGCAGAAGATGG F: TGTCTCAGCCAGATGCAGTTAAT	82
Cycc	<i>Cytochrome c, somatic</i>	NM_012839.2	R: TCCAGCCGACTCATTGGGAT F: CTTGGGCTAGAGAGCGGGA	74
Dffa	<i>DNA fragmentation factor, alpha polypeptide</i>	NM_053679.2	R: TTAATTCCGGTCCGGGCTGG F: GTCCAACCAGAACGAGTCCA	187
Dffb	<i>DNA fragmentation factor, beta polypeptide</i>	NM_053362.1	R: GAGCCTTCCCAACGACTCTG F: TGTCACTCACATAGCCGTGC	71
Fas	<i>Fas cell surface death receptor</i>	NM_139194.2	R: TGTCAGCCTGGTGAACGAAAA F: GACTCCTCCCCTTCTGTGC	87
Faslg	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>	XM_006250148.2	R: TCAAGAGAAACAGTGGGTGC F: TGAGAAGCCATCATGTCCAGC	136
Ggt1	<i>Gamma-glutamyltransferase 1</i>	NM_053840.2	R: GATTCCAGAAAAGCGGGGA F: CCACTCTCGTCTCTTGGCTG	83
Nfkb1	<i>Nuclear factor of kappa in Bcells, polypeptide b1</i>	NM_001276711.1	R: CGGAACTGGGCAAATGTTTCA F: CCATCTGTTGACAGTGGTATATCTG	96
Tnfrsf1a	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a</i>	NM_013091.1	R: GTCCCCAGGGAAAGTATGCC F: GTCCCCAGGGAAAGTATGCC	72

Abcb1a	<i>ATP binding cassette, subfamily B, member 1A, multidrug resistance protein</i>	XM_006235994.2	R: AGTAGGTTCCCTTTGTGGCACTT F: TGGGGTAAACACGCTGTCAC R: ATTCCTCCTTTTCTGAATGCTTCC	168
Abcb1b	<i>ATP binding cassette, subfamily B, member 1B</i>	XM_008762687.1	F: ATGGTTCAGGCTGGAGCAAA R: TACGTGCCATGTTTGAACACC	88
Abcb4	<i>ATP binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 4</i>	XM_008762697.1	F: CGCTAGACGCGTGTGGGA R: GCTGCCTAGTTCAAAGTCGC	166
Abcg5	<i>ATP binding cassette, subfamily G (WHITE), member 5</i>	NM_053754.2	F: CTTAGGTAGCTCAGGCTCAGGGA R: CAGCCGTTCAAAACACTTCC	102
Baat	<i>Bile acid coa:amino acid Nacyltransferase</i>	NM_017300.2	F: GTCGAACTACGGTTTTGGCG R: CCGGATATGCACAGGCTCAT	121
Cyp7a1	<i>Cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1</i>	NM_012942.2	F: GGAATTGCCGTGTTGGTGAG R: AGGTTACCAGCTTTCTTCT	72
Efna1	<i>Ephrin A1</i>	XM_008761228.1	F: AGGCAGTGTCAGAGAAAGGTG R: GTCCTCCTCTCGGAACCTTGT	177
Ephx1	<i>Epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)</i>	NM_001034090.3	F: GGAGTTGGAGAGTGGAGAAAC R: AAGTTCCAGCCACATGACTC	88
Ern1	<i>Endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1</i>	NM_001191926.1	F: GCGCAGGTGCAATGACATAC R: GACCTGCAGGACTGGATCTTC	160
Mbtps1	<i>Membranebound transcription factor peptidase, site 1</i>	NM_053569.1	F: GCGAGTAAACATCCCCGAA R: TCTCATTAGGCCGAGTCCA	186
Mbtps2	<i>Membranebound transcription factor peptidase, site 2</i>	NM_001035007.1	F: TTGTGGATCGCAGAAGGAGG R: ACACAGATGACTTCAACACCA	137
Nr1h4	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4</i>	NM_021745.1	F: GGCTGCAAAGGTTTCTTCCG R: TCCCATCTCTGCACTTCC	138
Scarb1	<i>Scavenger receptor class B, member 1</i>	NM_031541.1	F: CCCCATGAACTGTTCCGTGA R: GATCTTCCCTGTTTGCCCGA	79
Slc10a1	<i>Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter), member 1</i>	NM_017047.1	F: CATCCTCAAGGGAGGCATGAT R: CGAACATGATGCTGTTGCC	92

2. Metodologías

Técnicas de biología molecular de ácidos nucleicos

i. Extracción DNA

El DNA de las muestras de tejidos vegetales se obtuvo mediante el NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel, Francia) siguiendo las instrucciones del protocolo.

Procedimiento:

- Pesar entre 200 y 250 mg de muestra homogenizada en un tubo eppendorf de 2 mL.
- Añadir aprox. 600 µL de Buffer CF del Kit NucleoSpin (precalentado a 65°C ± 5°C). Mezclar 15 s. en el vórtex.
- Añadir 10 µL de Proteinasa K (10 µg/µL) y mezclar 2-3 s.
- Añadir 20 µL de RNasa A (20 µg/µL) y mezclar durante 15 s.
- Incubar los tubos 30-45 min., a 1400 rpm, a 65°C ± 5°C.
- Centrifugar 10min a 13.000 rpm.
- Precalentar el Buffer CE a 70°C ± 5°C.
- Transferir 300 µL de sobrenadante a un tubo eppendorf de 1,5 mL que contenga una mezcla de 300 µL de buffer C4 y 200 µL de etanol 100%. Mezclar en el vórtex 30s.
- Para cada muestra se utiliza una columna con membrana de sílice (incluida en el kit). Cargar toda la mezcla en la columna y centrifugar 1 min. a 13.000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Colocar la columna en un nuevo tubo eppendorf (incluido en el kit). Lavar la columna añadiendo 400 µL de Buffer CQW. Centrifugar 1 min. 13.000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Colocar la columna en un nuevo tubo eppendorf (incluido en el kit). Lavar la columna añadiendo aprox. 700 µL de Buffer C5. Centrifugar 1 min. 13.000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Colocar la columna en un nuevo tubo eppendorf (incluido en el kit). Añadir 200 µL de Buffer C5. Para eliminar totalmente el Buffer C5, centrifugar 2 min. a 13.000 rpm.
- Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1,5 mL y añadir en el centro de la membrana de sílice 50 µL de Buffer CE precalentado a 70°C ± 5°C. Incubar durante 5 min. a TA.
- Centrifugar los tubos durante 1 min. a 13.000 rpm y descartar la columna. Homogeneizar los tubos con el DNA final 2-3 s. vórtex.

Soluciones:

Proteinasa K: añadir 2,7 mL Buffer PB a la proteinasa K liofilizada. Guardar a -20°C.

RNasa A: añadir 10 mL Buffer RNasa (Tris-HCl pH 7,5 1M, 30 µL NaCl 5M) a la RNasa A liofilizada. Guardar a -20°C.

ii. Extracción de RNA

a. Obtención de RNA total de embrión de maíz

Para la extracción de RNA de embrión de maíz se ha usado el protocolo Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue Kit (Promega).

Procedimiento:

- Se extraen los embriones de la semilla de maíz. Esto se realiza con un bisturí y procurando que no queden restos de tejido de endospermo en el embrión. Una vez escindidos, se guardan inmediatamente en N2 líquido.

- Para cada variedad, molturar 25 embriones por replicado en N₂ líquido con la ayuda de una masa y un mortero hasta que quede un polvo muy fino. El tejido no debe descongelarse en ningún momento.
- Para cada pool de 25 embriones, añadir 6 mL de *Homogenization Solution*.
- Homogenizar la suspensión mediante un agitador
- Para cada extracción de RNA individual se usan 500 µl del homogenado total (el resto se guarda a -80°C).
- Añadir 500 µL de homogenado total en un tubo eppendorf de 1,5 ML.
- Centrifugar 3 min. a 15.000 rpm a 4°C.
- Recuperar 200 µL del sobrenadante y seguir las instrucciones del protocolo Maxwell 16 LEV simplyRNA Tissue Kit (Promega)
- Una vez finalizada la extracción (1h aprox.) se recupera el volumen total de RNA
- Centrifugar 2 min. a 8.000 rpm a 4°C para eliminar las partículas magnéticas.
- Guardar el extracto a -80°C.

b. Obtención de RNA total hígado de rata

Para la extracción de RNA total del tejido de hígado de rata se usó el protocolo RNeasy Plus Mini Kit de Qiagen (Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo recomendado.

Procedimiento:

- Molturar el hígado de rata en N₂ líquido con la ayuda de una masa y un mortero hasta que quede un polvo muy fino. El tejido no debe descongelarse en ningún momento.
- Hígados estudio 90 días: tanto para el análisis de *microarray* como para el análisis de expresión dirigida se hace una mezcla equivalente en peso de los 16 hígados de cada grupo y se homogeniza bien el *pool*.
- Hígados estudio 1 año: se hace una mezcla equivalente en peso de los 20 hígados de cada grupo y se homogeniza bien el *pool* para el experimento de *microarray*. Para el análisis de expresión dirigida se hace una mezcla equivalente en peso de los 2 hígados de cada unidad experimental (una jaula que contiene dos individuos del mismo sexo); en total se tendrán 10 muestras por cada grupo.
- Pasar 20 mg de tejido molturado a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- Añadir 350 µL de tampón RLT.
- Centrifugar 3 min. a velocidad máxima.
- Transferir el sobrenadante a una columna gDNA Eliminator.
- Centrifugar 30s. a 10.000 rpm.
- Recuperar el líquido restante y añadir el mismo volumen de etanol al 50%. Mezclar bien pipeteando.
- Transferir 700 µL de la muestra a la columna RNeasy.
- Centrifugar 15 s. a 10.000 rpm.
- Eliminar el líquido resultante. Añadir 700 µL de tampón RW1 a la columna.
- Centrifugar 15 s. a 10.000 rpm.
- Eliminar el líquido resultante. Añadir 500 µL de tampón RPE a la columna.
- Centrifugar 15 s. a 10.000 rpm.
- Eliminar el líquido resultante. Añadir 500 µL de tampón RPE a la columna.
- Centrifugar 2 min. a 10.000 rpm.
- Colocar la columna RNeasy en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ML. Añadir 50 µL de agua libre de RNasa en el centro de la membrana de la columna.
- Centrifugar 1 min. a 10.000 rpm.

iii. Cuantificación de ácidos nucleicos

La cantidad de DNA o RNA presente en una muestra se midió mediante un espectrofotómetro (NanoDrop), leyendo la D.O. a una λ de 260 nm. Un valor de 1 de D.O. a 260 nm se corresponde a aproximadamente 50ug/mL de DNA de doble cadena y 40ug/mL. La pureza de las muestras de ácidos nucleicos se determinó calculando las relaciones entre las absorbancias a 260 nm, 280 nm i 230 nm. La relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm indica la presencia de proteínas si sale fuera de rango de 1.7 a 2. La relación entre absorbancia a 260 nm y 230 nm da información sobre la presencia de polifenoles en la muestra.

iv. Análisis de la calidad del RNA

La calidad del RNA se evaluó en todas las muestras para el análisis transcriptómico mediante el RIN (*RNA Integrity Number*) y el ratio entre los RNA ribosomales 28s/18s (Schroeder *et al* 2006). Se usó 1 μ L de RNA total entre 25-100 ng/ μ L para obtener estos parámetros mediante el protocolo *Agilent 6000 Nano Kit* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y los resultados se leyeron en el *Agilent 2100 Bioanalyzer System* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) en el Laboratorio del Servicio de Genómica del CRAG. Para todas las muestras de RNA de plantas se consideró un RIN>7 y 28s/18s>2. Para las muestras de tejido animal se consideró RIN mayor que 8 y la relación entre rRNA mayor a 2.

v. Retrotranscripción

Para obtener cDNA a partir de RNA se usó el *SuperScript IV First-Strand Synthesis System* de Invitrogen.

Procedimiento:

- Para la unión de los primers a la cadena molde de RNA, preparar en un tubo de PCR los siguientes componentes:

50 μ M Oligo d(T) ₂₀	1 μ L
10 mM mix dNTP (10mM cada uno)	1 μ L
Muestra de RNA (20 ng/ μ L)	10 μ L
Agua DEPC	hasta 13 μ L

- Mezclar bien y centrifugar brevemente.
- Calentar la mezcla a 65°C, 5 min.
- Dejar enfriar en hielo inmediatamente 1 min.
- Mezclar bien en un agitador magnético.
- Para preparar la mezcla de la reacción de RT, combinar los siguientes reactivos en un tubo de PCR:

5 x SSIV Buffer (a TA)	4 μ L
100 mM DTT	1 μ L
RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor	1 μ L
SuperScript IV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L)	1 μ L

- Mezclar bien y centrifugar brevemente.
- Añadir la mezcla de la reacción de RT al RNA unido a los *primers*.
- Incubar a 55°C, 10 min.
- Incubar a 80°C, 10 min. para inactivar la reacción.

vi. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La base teórica de la PCR está descrita en los manuales de biología molecular (Sambrook y Russell 2001). Todas las PCR que se han realizado en este trabajo han sido PCR cuantitativas a tiempo real (qPCR). Las reacciones de amplificación se han realizado en el equipo *Light Cycle 480 Real-Time PCR Instrument* (Roche). La fluorescencia emitida debido a la amplificación del gen de interés se monitoriza con el programa Light Cycle 480 v 1.5.0.

a. Detección y cuantificación de *cry1A(b)* en el maíz MON810:

La detección y cuantificación del evento MON810 en el maíz se realizó siguiendo el método validado de la JRC (gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/gmomethods, Shindo *et al*, 2002). Se realizan las qPCR a partir de 100µg DNA. Se usa el gen endógeno ADH como control con las mismas condiciones. Para amplificar el cDNA se usó DNA polimerasa comercial Premix Taq™ DNA Polymerase (TaKaRa Taq™ Version 2.0).

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Volumen (µl)
H ₂ O	-	-	6,9
Taq Takara	2x	1x	10
Primer monF	10000 nM	200 nM	0,4
Primer monR	10000 nM	200 nM	0,4
Sonda monP	10000 nM	150 nM	0,3
DNA muestra	-	50 ng/µl	2
TOTAL			20

b. Validación de RNA-Seq:

Se realizan las qPCR a partir de 100µg DNA complementario genómico (cDNA).

Reactivo	Conc. Inicial	Conc. Final	Volumen (µl)
H ₂ O	-	-	7,2
SYBR® Premix ExTaq	2x	1x	10
Primer F	10000 nM	200 nM	0,4
Primer R	10000 nM	200 nM	0,4
DNA Muestra	-	50 ng/µl	2
TOTAL			20

Condiciones PCR: 50°C 2'
95°C 10"
95°C 15"
60°C 1' } 45 ciclos

c. Array de PCR

Las RT-qPCR de las muestras de cDNA de hígado de rata se han realizado mediante un sistema de microfluidic dynamic array® de 48x48 en el equipo BioMark™ (Fluidigm). Estos experimentos.

Procedimiento:

- Preamplificación a partir de 15,6 ng de cDNA con los *primers forward* y *reverse* (20 µM cada uno) y la *TaqMan PreAmp Master Mix* (Fluidigm, BioMark ©).
- El cDNA se diluye 1:2 o 1:10 en función del gen a amplificar.

Activación: 95°C, 10 min.

16 ciclos: 95°C, 15 s.

60°C, 4 min.

- La expresión génica se detecta por *EvaGreen* (*Biorad*) usando los protocolos estandarizados de Fluidigm.
- La PCR se realiza en el equipo BioMark © mediante el siguiente programa de amplificación:

Activación: 95°C, 60 s.

30 ciclos: 95°C, 5 s.

60°C, 20 s.

Melting: 60°C, 3 s.

5°C, 1°C/3s.

vii. RNA-Seq

Las muestras de RNA de embrión de maíz con RIN>7 y relación entre rRNAs>2 se usaron para la secuenciación masiva en la plataforma Illumina HiSeq 2000 en el Beijing Genomics Institute (BGI, Hong Kong, China). Se generan lecturas de 50pb con 40 millones de lecturas por carrera de secuenciación.

viii. Microarray

Este ensayo se realizó en el servicio de genómica del CRAG. Las muestras de RNA se prepararon para el análisis de expresión génica con el protocolo *3' IVT PLUS Reagent Kit* (Affymetrix) para obtener RNA complementario amplificado y biotinidazo (cRNA) a partir de RNA poly(A) de una muestra de 250 ng de RNA total (Figura 63). El cRNA obtenido se hibridó en los *microarray GeneChip Rat Genome 230 2.0* (GeneChip 3' Expression Array) de Affymetrix en una GeneChip Fluidics Station 450 de Affymetrix. Finalmente, los resultados se escanearon y visualizaron en un GeneChip Scanner 3000 de Affymetrix.

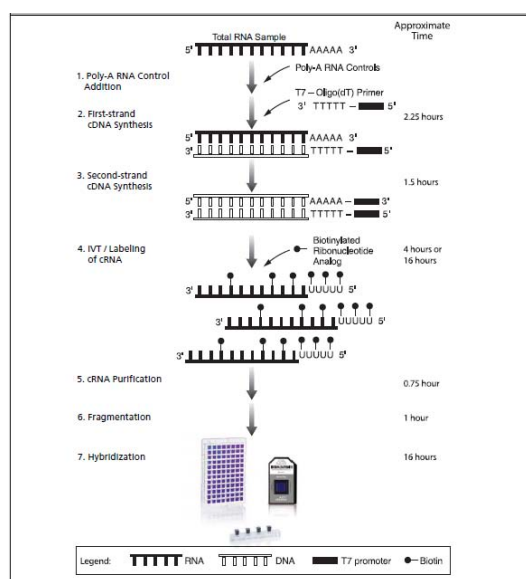


Figura 63. Procesos de amplificación y marcaje de los chips 3' IVT PLUS de Affymetrix. [Fuente: Affymetrix]

Técnicas de biología molecular de proteínas

i. Técnica ELISA para cuantificar toxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por los hongos que contaminan una gran variedad de cereales y frutas. Dichos alimentos contaminados resultan tóxicos para humanos y animales, y por lo tanto un problema primordial para la salud desde el punto de vista de los consumidores. Se usaron las pruebas ELISA *AgraQuant* de Romer Labs (Getzersdorf, Austria) para la determinación cuantitativa de aflatoxinas, fumonisinas y DON.

Procedimiento:

- Molturar 500 g de semilla de maíz con el molino con un molino de cuchillas Grindomix GM 200 (Retsch, Alemania).
- Disponer 20 g de la muestra molida dentro de un vaso sellado.
- a. Preparación de la muestra para cuantificación de deoxinivalenol (0,25/5,0):
 - Agregar 100 mL de agua destilada.
 - Agitar bien durante 3 minutos en un agitador magnético.
 - Dejar decantar la muestra, filtrar el sobrenadante a través de un filtro Whatman #1 colocado en un embudo. Recoger el filtrado.
 - Diluir el extracto filtrado con agua destilada en una relación 1:4.
- b. Preparación de la muestra para cuantificación de fumonisinas (0,25/5,0):
 - Agregar 100 mL de una solución 70/30 (v/v) de metanol: agua.
 - Agitar bien durante 3 minutos en un agitador magnético.
 - Dejar decantar la muestra, filtrar el sobrenadante a través de un filtro Whatman #1 colocado en un embudo. Recoger el filtrado.
 - Diluir el extracto filtrado con agua destilada en una relación 1:20.
- c. Preparación de la muestra para cuantificación de aflatoxinas (1/20):
 - Agregar 100 mL de una solución 70/30 (v/v) de metanol: agua.
 - Agitar bien durante 3 minutos en un agitador magnético.
 - Dejar decantar la muestra, filtrar el sobrenadante a través de un filtro Whatman #1 colocado en un embudo. Recoger el filtrado.
 - No diluir la muestra.

Ensayo:

- Colocar las tiras de dilución en una placa de soporte para pocillos. Se necesitará un pocillo de dilución para cada patrón (0, 0,25, 1, 2,5, 5 ppm) y muestra.
- Colocar el mismo número de tiras con pocillos recubiertos con anticuerpo en la gradilla.
- Medir la cantidad de Solución de Conjugado (~ 240 µL/pocillo) y colocar en una cubeta de reactivos. Dispensar 200 µL de Conjugado dentro de cada pocillo de dilución mediante una pipeta multicanal de 8 vías.
- Agregar 100 µL de cada patrón o muestra dentro del pocillo de dilución que contienen los 200 µL. Mediante una pipeta multicanal mezclar bien pipeteando y liberando la mezcla 3 veces e inmediatamente transferir 100 µL del contenido de cada pocillo de dilución a su correspondiente pocillo recubierto con anticuerpos. Incubar 15 min. a TA.
- Vaciar el contenido de las tiras de pocillos en un contenedor para residuos. Lavar llenando cada pocillo con la Solución de Lavado, y vaciar la misma de los pocillos. Repetir este paso 4 veces (un total de 5 lavados).
- Extender varias capas de papel sobre una superficie plana y golpear ligeramente la tira de pocillos a fin de eliminar la mayor cantidad de solución de lavado tras el quinto lavado. Secar la base de los pocillos con un paño limpio y seco.

- Medir la cantidad necesaria de Solución Sustrato (~ 120 µL/pocillo) y disponer dentro de un contenedor separado. Pipetear 100 µL de Sustrato dentro de cada pocillo de la tira utilizando una pipeta multicanal de 8 vías. Incubar 5 min. a TA.
- Medir la cantidad necesaria de Solución Stop (~ 120 µL/pocillo) y disponerla en un contenedor separado. Pipetear 100 µL de Solución Stop dentro de cada pocillo de la tira utilizando una pipeta multicanal. El color deberá cambiar de azul a amarillo.
- Leer los valores de D.O. de cada pocillo con un lector de placas a 450 nm.

Soluciones:

Solución de Conjugado, Solución de Lavado, Solución Sustrato, Solución Stop: vienen en el kit.

Interpretación de los resultados:

- Construir una curva de dosis – respuesta usando los 5 patrones utilizando los valores de DO.

ii. Extracción de proteínas

a. Obtención de extractos proteicos totales de semilla de maíz

Para la extracción de proteínas de la semilla de maíz se usó un protocolo basado en precipitación de ácido tricloracético (TCA) y acetona (Sambrook y Russell 2001).

Procedimiento:

- Molturar 1 g de grano de maíz en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. La muestra no debe descongelarse en ningún momento.
- Pasar 150 mg de tejido molturado a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- Añadir 600 µL de tampón de extracción más los inhibidores de proteasas (10 µg/L de aprotinina, 0.5 µg/L de leupeptina, 1 µg/L de pepstatina, 1 µg/L de E-64 y 0.1 mM de PMSF) 1 U/mL DNAsa I, 1 U/mL RNAsa A.
- Incubar 10 min. en agitación a TA.
- Centrifugar 15 min. a 15.000 rpm a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante.
- Al volumen obtenido añadir TCA 100% hasta una concentración final del ácido del 15%.
- Incubar 30 min. en hielo.
- Centrifugar 15 min. a 15.000 rpm a 4°C.
- Resuspender el pellet en 600 µL de acetona 80% fría (-20°C).
- Poner en el baño de ultrasonidos durante 5 minutos (o hasta que se haya disuelto completamente el pellet en la acetona).
- Centrifugar 15 min. a 15.000 rpm a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet al aire.
- Resuspender el pellet en 300 µL de tampón de lisis 2D.
- Guardar las muestras a -80°C.

Soluciones:

Tampón de extracción: Tris-HCl pH 7,5 50 Mm; NaCl 0.5 M; Tritón X-100 0,3% (v/v).

Tampón de lisis 2D: Urea 7M; Tiourea 8M; Chaps 4% (p/v); Tris-HCl pH 8 18mM.

b. Obtención de extractos proteicos totales de tubérculo de patata.

El protocolo para extracción de proteínas de tubérculo de patata se modificó a partir del método de SDS caliente propuesto por (Delaplace *et al* 2006).

Procedimiento:

- Pesar 200 mg de tubérculo de patata molturado y liofilizado y añadir 1 mL de tampón de lisis SDS previamente calentado a 65°C.
- Añadir 1 U/mL DNAsa I, 1 U/mL RNAsa A y 1 U/mL α -amilasa.
- Incubar 10 min. a 65°C en agitación.
- Dejar 15 min. en hielo.
- Centrifugar 15 min. a 14000 rpm a 4°C.
- Guardar el sobrenadante y volver a extraer el pellet.
- Añadir 600 μ L de tampón de lisis SDS (a 65°C).
- Incubar 10 min. a 65°C en agitación.
- Dejar 15 min. en hielo.
- Centrifugar 15 min. a 14000 rpm a 4°C.
- Añadir el sobrenadante al sobrenadante anterior.
- Centrifugar los dos sobrenadantes obtenidos durante 15min. a 14000 rpm a 4°C.
- Al volumen obtenido (~1.5 mL) añadir 3 mL DE acetona fría suplementada con 10mM de DTT (almacenada a -20°C).
- Precipitar las proteínas ON a -20°C.
- Centrifugar 20min. a 16000 rpm a 4°C.
- Lavar el pellet con 1 mL de acetona fría suplementada con 10 mM de DTT. Centrifugar 1min, a 4°C. Repetir este paso.
- Dejar secar el pellet al aire durante 30min.
- Disolver el pellet en 500 mL de tampón de lisis 2D durante 75min, a TA.
- Medir las muestras mediante el método de Bradford.
- Utilizar el 2-D Clean-Up kit (GE Healthcare) para la precipitación cuantitativa de las proteínas partiendo de una cantidad inicial de 200 μ g totales de proteína siguiendo el protocolo del fabricante.
- Resuspender el pellet final en 60 μ L de tampón de lisis 2D.

Soluciones:

Tampón de lisis SDS: SDS 4% (p/v); sacarosa 5% (p/v); PVPP 10% (p/v); DTT 0,3% (p/v); 20 mM fosfato de sodio pH 7.

*Añadir el DTT justo en el momento de realizar la extracción.

Tampón de lisis 2D: Urea 7M; Tiourea 8M; Chaps 4% (p/v); Tris-HCl pH 8 18mM.

c. Obtención de extractos proteicos totales de hígado de rata

- Molturar el hígado de rata en N₂ líquido con la ayuda de una masa y un mortero hasta que quede un polvo muy fino. El tejido no debe descongelarse en ningún momento.
- Para los hígados de 90 días: se hace una mezcla equivalente en peso de los 16 hígados de cada grupo y se homogeniza bien el *pool*.
- Para los hígados de 1 año: se hace una mezcla equivalente en peso de los 20 hígados de cada grupo y se homogeniza bien el *pool*.
- Pesar 50 mg del *pool* a un tubo eppendorf de 1,5 mL y añadir 500 μ L de tampón de lisis 2D. Añadir inhibidores de proteasas (10 μ g/L de aprotinina, 0,5 μ g/L de leupeptina, 1 μ g/L de pepstatina, 1 μ g/L de E-64 y 0,1 mM de PMSF); 1U/mL de DNAsa I y 1U/mL de RNAsa A.
- Homogenizar bien la mezcla con la ayuda de un vórtex.
- Incubar en el baño de ultrasonidos durante 15 minutos.

- Incubar 15 min. en hielo (hacer 20 s. de vórtex, cada 5 min.)
- Centrifugar 15min. a 14000 rpm a 4°C.
- Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo de 1.5 mL.
- Guardar las muestras a -80°C.

Soluciones:

Tampón de lisis 2D: Urea 7M; Tiourea 8M; Chaps 4% (p/v); Tris-HCl pH 8 18mM.

iii. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de los extractos proteicos se usó el método descrito por Bradford (Bradford 1976), basado en una reacción colorimétrica en la cual la unión del Coomassie Brilliant Blue G-250 se une a las proteínas. Se usó el reactivo *Protein Assay* de la casa comercial BIO-RAD siguiendo las instrucciones del fabricante.

iv. Separación electroforética de proteínas

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo descrito en (Sambrook y Russell 2001) y usando un equipo vertical Miniprotean III de BIO-RAD. Este equipo permite hacer geles de proteínas pequeños de 8 cm x 7,3 cm y de 1 mm de grueso.

Procedimiento:

Polimerizar los geles de poliacrilamida según las instrucciones del fabricante. La composición del gel separador y concentración se detallan a continuación:

<u>Gel separador (12,5%):</u>		<u>Gel concentrador (3%):</u>	
H ₂ O	4,33 mL	H ₂ O	2,25 ml
Tris separador	2,5 mL	Tris concentrador	1 ml
Acril:Bisacrilamida (30:0,8)	3,13 mL	Acril:Bisacrilamida (30:0,8)	0,5 ml
APS (15% p/v)	40 µL	APS (15% p/v)	40 µL
TEMED	5 µL	TEMED	6 µL
Volumen final	10 mL	Volumen final	4 mL

- Añadir tampón de carga TM 2X a la muestra del extracto proteico (v/v).
- Cocer las muestras a 100°C durante 5 min. para desnaturizar las proteínas.
- Carrera del gel: aplicar 60 V durante 15 min. (o hasta que el frente de azul de bromofenol haya entrado en el gel separador). Posteriormente subir el voltaje a 120 V hasta que el frente de azul alcanza el final del gel.
- Los geles se pueden teñir con azul de *Coomassie* para observar las bandas de proteínas según está descrito en (Sambrook y Russell 2001).

Soluciones:

Tampón separador: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 0,4% (p/v).

Tampón concentrador: Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; SDS 0,4% (p/v).

Tampón de carga TM 2X: Tris 0,10 M; SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v); azul de bromofenol 0,25% (p/v), suplementado con β-mercaptoetanol al 10% (v/v).

v. Electroforesis bidimensional

La electroforesis en dos dimensiones (2D electroforesis) es un método potente para analizar extractos complejos de proteínas. Esta técnica separa las proteínas según dos propiedades independientes en dos pasos separados: el paso de la primera dimensión, el isoelectroenfoque (IEF), separa las proteínas según

su punto isoeléctrico (pI) mediante gradientes de pH inmovilizados (IPG); en el paso de la segunda dimensión, electroforesis del gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), se separan las proteínas según su peso molecular (PM). Cada *spot* de la matriz de dos dimensiones corresponde a un tipo proteico de la muestra. Así, se pueden separar miles de proteínas diferentes y obtener información sobre su pI, su PM aparente y la cantidad de cada proteína. Este método fue introducido inicialmente en el 1975 por P.H O'Farrell y J. Klose.

a. Separación en la primera dimensión: isoelectroenfoco.

El IEF se realizó en un equipo *IPGphor Isoelectric Focusing System* (Amersham Biosciences). Se cargaron 150 µg de extracto total en tiras IPG de 18 cm (*Immobiline DryStrips gels de GE Healthcare*) de pH lineal siguiendo las indicaciones del fabricante.

*Para el maíz: tiras pH 4-7; para la patata: tiras pH 4-7; para el hígado: tiras de pH 3-11.

Procedimiento:

Para las tiras IPG de 18 cm se pueden cargar hasta 150 µg de proteína total en un volumen final de 350 µL. En este protocolo se hace una rehidratación activa de la muestra, esto es a bajo voltaje durante 10 h (ver paso 1 del IEF). Dos pasos: rehidratación e IEF

- Añadir los siguientes componentes en un tubo eppendorf de 1.5 mL:

Extracto proteico	X µL (150 µg)
Tampón IPG	7 µL
DeStreak	3 µL
Tampón de rehidratación	hasta 350 µL

- Mezclar bien todos los componentes mediante vórtex.
- Incubar 10 min. a TA.
- Repartir los 350 µL de la mezcla en el centro de la caja de las tiras (o sarcófago).
- Colocar la tira IPG con la cara del gel en contacto con la muestra. Primero introducir la parte anódica de la tira y después dejar caer el gel en el sarcófago con delicadeza (Figura 64). Eliminar las burbujas del líquido.



Figura 64. Ilustración de cómo de aplicar la solución de rehidratación en los sarcófagos. a) Repartir la muestra en el centro del sarcófago, b, c) Poner la tira IPG en contacto con la muestra y posicionar suavemente (Fuente: GE Healthcare).

- Cubrir con 2 mL de aceite conductor (*IPG DryStrip Cover Fluid de GE Healthcare*) repartidos desde el centro del sarcófago hacia los polos.
- Colocar los sarcófagos en el IPGphore II y realizar el siguiente protocolo de IEF:
 - Paso 1: rehidratación. 50 V constante, 10h.
 - Paso 2. 500 V en gradiente, 1.30h.
 - Paso 3. 1000 V en gradiente, 1.30h.
 - Paso 4. 2000 V en gradiente, 1.30h.
 - Paso 5. 4000 V en gradiente, 1.30h.
 - Paso 6. 8000 V en gradiente, 2h.
 - Paso 7. 8000 V constante, 5-10h.
- Al final del protocolo deben haber acumulados uno 61.000 V totales.
- Sacar las tiras IPG del sarcófago, introducir las en una pipeta de plástico de 10 mL y guardarlas a -80°C como mínimo durante 10h.

Soluciones:

Tampón de rehidratación: tampón de lisis 2D (Urea 7M; Tiourea 8M; Chaps 4% (p/v); Tris-HCl pH 8 18Mm); 0,02% (p/v) de azul de bromofenol.

Tampón IPG: con rango de pH idéntico al usado para las tiras IPG.

b. Separación en la segunda dimensión: SDS-PAGE

La técnica se desarrolla en los geles de SDS-poliacrilamida que se corrieron en un equipo *Ettan DALTsix Electrophoresis System* (GE Healthcare). El *caster* de los geles se prepara siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para realizar esta técnica todo el material de cristal y plástico se limpia con agua Millipore Milli-Q bidestilada y con etanol 100% para evitar que queden impurezas. Geles de poliacrilamida de 20 cmx25 cm x 1 mm.

Procedimiento para la preparación de los geles bidimensionales:

- Añadir los siguientes componentes en un erlenmeyer de 500 mL:

<u>Gel separador (12,5%)</u>		<u>Gel concentrador (3%)</u>	
H ₂ O	4,33 mL	H ₂ O	2,25 ml
Tris separador	2,5 mL	Tris concentrador	1 ml
Acril:Bisacrilamida (30:0.8)	3,13 mL	Acril:Bisacrilamida (30:0,8)	0,5 ml
APS (15% p/v)	40 µL	APS (15% p/v)	40 µL
TEMED	5 µL	TEMED	6 µL
Volumen final	10 mL	Volumen final	4 mL

- Agitar durante 5 min. en un agitador magnético.
- Polimerizar los geles a TA; dejar el *caster* a 4°C ON.

Soluciones:

Tampón separador: Tris-HCl 1,5 M pH 8,8; SDS 0,4% (p/v).

Procedimiento para el equilibrado de las tiras IPG:

Los tampones de equilibrado suplementados con DTT y iodoacetamida se preparan justo en el momento de uso.

- Descongelar las tiras IPG guardadas en las pipetas de plástico. a -80°C.
- Añadir 5 mL de tampón de equilibrado suplementado con 10 mg/mL de DTT. Dejar en agitación suave durante 15 min.
- Decantar el tampón anterior.

- Añadir 5 mL de tampón de equilibrado suplementado con 25mg/mL de IAA. Equilibrar en agitación suave durante 15 min.
- Decantar el tampón anterior.

Soluciones:

Tampón de equilibrado: 50mM Tris-HCl pH 8,8; Urea 6M; Glicerol 30% (v/v); SDS 2% (p/v); azul de bromofenol 0,02% (p/v).

Procedimiento para aplicar las tiras IPG:

- Lavar la tira IPG en agua Milli-Q justo antes de introducirla en el gel para lubricarla.
- Colocar la tira entre los dos cristales del gel de SDS-poliacrilamida. Con la ayuda de una jeringa fina empujar la tira hacia abajo hasta que esté en contacto con el gel de la segunda dimensión.
- Comprobar que no quedan burbujas entre el gel y la tira.
- Sellar la tira IPG en una solución de agarosa para prevenir que se mueva en la cubeta de electroforesis.

Soluciones:

Solución de agarosa: agarosa 1% (p/v) en tampón de electroforesis 1X; azul de bromofenol 0,001% (p/v).

Procedimiento para la electroforesis:

- Colocar los geles en la cubeta de electroforesis.
- En la cubeta inferior poner tampón de electroforesis 1X y en la cubeta superior tampón de electroforesis 2X.
- La electroforesis se realiza en dos pasos. Primero pasaran 2,5 W por gel durante 30 min. Posteriormente se subirá la potencia a 15 W por gel hasta que el frente de azul de bromofenol haya alcanzado el final del gel (unas 5 h).

Soluciones:

Tampón de electroforesis 10X: Tris 0,25 M; Glicina 1,92M; SDS 1% (p/v).

c. Tinción de los geles en nitrato de plata

La tinción de geles de proteínas con nitrato de plata es 100 veces más sensible que la tinción con azul de Coomassie, es capaz de detectar hasta 0,1-1,0 ng de polipéptidos en un *spot* discreto. Esta tinción se basa en la reducción diferencial de los iones de plata que se unen a las cadenas de aminoácidos (Switzer *et al* 1979; Merrill 1990).

Todo el material de cristal y plástico se enjuagará previamente con agua Milli-Q y metanol. Todas las soluciones de la tinción se prepararán con agua Milli-Q, en el momento de uso y se mantendrán a 4°C. Todos los pasos se pondrán en agitación suave y a temperatura ambiente. El volumen de todas las soluciones será de 250 mL por gel.

Procedimiento:

- Poner los geles en solución de fijación ON.
- Eliminar la solución de fijación y añadir la solución de sensibilización. Incubar durante 30 min.
- Eliminar la solución de sensibilización.
- Lavar tres veces con agua Milli-Q durante 5 min.
- Incubar con la solución de tinción durante 20 min.
- Eliminar la solución de tinción.

- Lavar dos veces con agua Milli-Q durante 1 min.
- Añadir la solución de velado. Vigilar atentamente el gel, los primeros *spots* deben aparecer en pocos minutos. Continuar la incubación hasta obtener el contraste deseado.
- Parar la reacción anterior añadiendo solución stop.
- Lavar tres veces con agua Milli-Q durante 5 min.
- Los geles se guardan en agua Milli-Q a 4°C.

Soluciones:

Solución de fijación: etanol 40% (v/v); ácido acético glacial 10% (v/v).

Solución de sensibilización: etanol 30% (v/v); 2 g/L de Na₂S₂O₃; 68 g/L de Na₂H₃C₂O₂.

Solución de tinción: 2,5 g/L de AgNO₃.

Solución de velado: 25 g/L de Na₂CO₃; formaldehído 37% (v/v).

Solución stop: 14 g/L EDTA-Na₂·2H₂O.

d. LC-MSMS

Los *spots* más relevantes/significativos se cortaron individualmente de los geles. La identificación de los *spots* se realizó en la Plataforma de Proteómica del Parc Científic de Barcelona (PCB) mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas. Los resultados de las identificaciones fueron buscados en las bases de datos de plantas en el caso de las identificaciones de maíz y patata (Uniprot *Viridiplantae* (v. January 2015)) o en la base de datos SwissProt (v. March 2015) para las identificaciones de proteínas de ratas (ver Anexo VII para el protocolo completo).

3. Análisis estadísticos y bioinformáticos

Transcriptómica

DAG Expression

Para la cuantificación y normalización de la expresión génica de los experimentos de qPCR se ha usado el programa *DAG Expression* basado en el método de las curvas estándar (Ballester *et al* 2013). La cuantificación de la expresión de los genes se calculó como la media de los tres replicados de cada pool formado por 16 individuos en el estudio de 90 días (3 replicados por grupo). Para el estudio de 1 año se cuantificó la expresión como media de cada de los tres replicados de cada unidad experimental (10 replicados por grupo).

FastQC

Para la determinación de la calidad de cada una de las carreras de RNA-Seq se ha usado el programa FastQC con las opciones por defecto. Éste calcula diferentes parámetros de calidad a partir de los archivos.fq.

Cufflinks

Para el análisis de expresión diferencial de genes del experimento de RNA-Seq de maíz se ha usado el proceso bioinformático de Cufflinks. El valor p se corrige por el método Benjamini-Hochberg para análisis múltiples. Los parámetros modificados en el proceso de Cufflinks se describen en el Anexo VIII.

Affymetrix Expression Console Software

Expression Console Software es un programa que permite normalizar, realizar el control de calidad de las muestras de los *microarray*. Los datos de fluorescencia se han normalizado a expresión génica por el método RMA (*Robust Multi-Array Average*) (Affymetrix 2015).

Affymetrix® Transcriptome Analysis Console (TAC) Software

El análisis de expresión diferencial de los resultados del *microarray* se ha realizado mediante el programa TAC. La intensidad de cada gen de cada muestra se calcula por la media de los tres replicados mediante el método *Tukey's Bi-weight*. El valor p se corrige por el método Benjamini-Hochberg. Los algoritmos concretos de este análisis se describen en (Affymetrix 2014). Se ha calculado los genes diferenciales entre cada una de las condiciones o grupos de animales.

Proteómica

Los geles bidimensionales de proteínas se escanearon en un equipo UMAX Image Scanner (Amersham Biosciences) con las opciones por defecto.

Ludesi Redfin 3

El análisis de las imágenes de los geles se realizó con el programa Ludesi Redfin 3 (www.ludesi.com) (ver Anexo IX para algoritmos programa). Primero se detectan automáticamente los *spots* y se emparejan entre los replicados y en cada una de las muestras. Después se editaron manualmente los *spots* para corregir los errores y los *spots* no emparejados. La cuantificación de cada *spot* se basa en calcular la intensidad de la tinción que corresponde al volumen relativo de la proteína. Se usan los valores normalizados (calculados por el programa mediante unos algoritmos) de los volúmenes de los *spots* para representar las abundancias relativas de las proteínas.

Análisis estadísticos

La visualización de los datos de expresión diferencial de genes y proteínas se realizó mediante el programa R. Se calculó la matriz de correlación mediante el coeficiente de Pearson y el dendrograma por el método UPGMA y la distancia euclídea. El gráfico de densidad, *boxplot* y PCA se calculan con los valores de expresión convertidos al logaritmo 2.

BIBLIOGRAFÍA

- de Abrew, K.N. et al., 2015. A novel transcriptomics based in vitro method to compare and predict hepatotoxicity based on mode of action. *Toxicology*, 328, pp.29–39.
- Adel-Patient, K. et al., 2011. Immunological and Metabolomic Impacts of Administration of Cry1Ab Protein and MON 810 Maize in Mouse M. Fessler, ed. *PLoS ONE*, 6(1), p.e16346.
- AENOR, 2009. Cereales y productos derivados. Toma de muestras (ISO 24333). *AENOR*, pp.9–11d.
- Affymetrix, 2015. GeneChip expression analysis. Data analysis fundamentals.
- Affymetrix, 2014. User Guide Transcriptome Analysis Console (TAC) 3.0.
- Agapito-Tenfen, S. et al., 2013. Comparative proteomic analysis of genetically modified maize grown under different agroecosystems conditions in Brazil. *Proteome Science*, 11(1), p.46.
- Agrawal, G.K. & Rakwal, R., 2006. Rice proteomics: A cornerstone for cereal food crop proteomes. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(1), pp.1–53.
- Ahloowalia, B.S. & Maluszynski, M., 2001. Induced mutation- A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118(2), pp.167–173.
- Alexandratos, N. & Bruinsma, J., 2015. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision. *ESA Working paper*.
- Amiour, N. et al., 2014. An integrated “ omics ” approach to the characterization of maize (*Zea mays* L .) mutants deficient in the expression of two genes encoding cytosolic glutamine synthetase. *BMC Genomics*, pp.1–19.
- Anders, S. & Huber, W., 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology*, 11(10), p.R106.
- Anove, 2015. *Guía técnica y de Buenas Prácticas para el Cultivo de maíz Bt*.
- Arabidopsis Genome Initiative, 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*.
- Arjó, G. et al., 2013. Plurality of opinion, scientific discourse and pseudoscience: an in depth analysis of the Séralini et al. study claiming that Roundup™ Ready corn or the herbicide Roundup™ cause cancer in rats. *Transgenic research*, 22(2), pp.255–67.
- Ashburner, M. et al., 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*, 25(1), pp.25–9.
- Ballester, M., Cordon, R. & Folch, J.M., 2013. DAG expression: high-throughput gene expression analysis of real-time PCR data using standard curves for relative quantification. *PLoS one*, 8(11), p.e80385.
- Barros, E. et al., 2010. Comparison of two GM maize varieties with a near-isogenic non-GM variety using transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Plant Biotechnology Journal*, 8(4), pp.436–451.
- Bass, H.W. et al., 2004. Maize ribosome-inactivating proteins (RIPs) with distinct expression patterns have similar requirements for proenzyme activation. *Journal of Experimental Botany*, 55(406), pp.2219–2233.
- Batista, R. et al., 2008. Microarray analyses reveal that plant mutagenesis may induce more transcriptomic changes than transgene insertion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9), pp.3640–3645.
- Belanger, F.C. & Kriz, A.L., 1991. Molecular basis for allelic polymorphism of the maize Globulin-1 gene. *Genetics*, 129(3), pp.863–872.
- Belhaj, K. et al., 2013. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant methods*, 9(1), p.39.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing on JSTOR. *Journal of the Royal Statistical Society*.
- Betz, F.S., Hammond, B.G. & Fuchs, R.L., 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 32(2), pp.156–73.
- Bevan, M.W., Flavell, R.B. & Chilton, M.-D., 1983. A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature*, 304(5922), pp.184–187.
- Bi, Y.-M. et al., 2014. High throughput RNA sequencing of a hybrid maize and its parents shows different mechanisms responsive to nitrogen limitation. *BMC genomics*, 15(1), p.77.
- Bindschedler, L. V. & Cramer, R., 2011. Quantitative plant proteomics. *Proteomics*, 11(4), pp.756–775.
- Bortesi, L. & Fischer, R., 2014. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), pp.41–52.
- Bower, R. & Birch, R.G., 1992. Transgenic sugarcane plants via microprojectile bombardment. *The Plant Journal*, 2(3), pp.409–416.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), pp.248–254.

- Bravo, A., Gill, S.S. & Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxinon : official journal of the International Society on Toxinology*, 49(4), pp.423–35.
- Broeders, S. et al., 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science & Technology*, 37(2), pp.115–126.
- Bückmann, H., Thiele, K. & Schiemann, J., 2016. CMS Maize: A Tool to Reduce the Distance between GM and non-GM Maize. *EuroChoices*, 15(1), pp.31–35.
- Bushey, D.F. et al., 2014. Characteristics and safety assessment of intractable proteins in genetically modified crops. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 69(2), pp.154–70.
- Cellini, F. et al., 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food and Chemical Toxicology*, 42(7), pp.1089–1125.
- Champouret, N. et al., 2009. Phytophthora infestans isolates lacking class I ipiO variants are virulent on Rpi-blb1 potato. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 22(12), pp.1535–1545.
- Chen, J. et al., 2014. Dynamic transcriptome landscape of maize embryo and endosperm development. *Plant physiology*, 166(1), pp.252–64.
- Chen, Y. et al., 2012. Activation of liver X receptor induces macrophage interleukin-5 expression. *The Journal of biological chemistry*, 287(52), pp.43340–50.
- Chen, Z.-Y. et al., 2004. Identification of a maize kernel stress-related protein and its effect on aflatoxin accumulation. *Phytopathology*, 94(13), pp.938–945.
- Chettoo, A.M. et al., 2014. Discovery of novel transcripts and gametophytic functions via RNA-seq analysis of maize gametophytic transcriptomes. *Genome biology*, 15(7), p.414.
- Chiang, J.Y., 1998. Regulation of bile acid synthesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 3, pp.d176–93.
- Cho, S.W. et al., 2013. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature biotechnology*, 31(3), pp.230–2.
- Christoffolete, M.A. et al., 2010. Regulation of thyroid hormone activation via the liver X-receptor/retinoid X-receptor pathway. *The Journal of endocrinology*, 205(2), pp.179–86.
- Christou, P., Ford, T.L. & Kofron, M., 1991. Production of Transgenic Rice (*Oryza Sativa* L.) Plants from Agronomically Important Indica and Japonica Varieties via Electric Discharge Particle Acceleration of Exogenous DNA into Immature Zygotic Embryos. *Nature Biotechnology*, 9(10), pp.957–962.
- Citovsky, V., Wong, M.L. & Zambryski, P., 1989. Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA: implications for the T-DNA transfer process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, pp.1193–1197.
- Clarke, J.L. & Zhang, P., 2013. Plant biotechnology for food security and bioeconomy. *Plant Molecular Biology*, 83, pp.1–3.
- Cohen, S.N. et al., 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), pp.3240–4.
- Coll, A. et al., 2009. Gene expression profiles of MON810 and comparable non-GM maize varieties cultured in the field are more similar than are those of conventional lines. *Transgenic Research*.
- Coll, A. et al., 2008. Lack of repeatable differential expression patterns between MON810 and comparable commercial varieties of maize. *Plant Molecular Biology*, 68(1-2), pp.105–117.
- Coll, A. et al., 2010. Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming practices. *Plant Molecular Biology*, 73(3), pp.349–362.
- Coll, A. et al., 2011. Proteomic analysis of MON810 and comparable non-GM maize varieties grown in agricultural fields. *Transgenic Research*, 20(4), pp.939–949.
- Comisión Europea, 2016. Decisión de Ejecución (UE) 2016/321 de la Comisión de 3 de marzo de 2016 por la que se adapta el ámbito geográfico de la autorización del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) modificado genéticamente MON810. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 60, pp.90–92.
- Comission of European Communities, 2003. Guidelines for the development of national strategies and best practices to ensure the co-existence of genetically modified crops with conventional and organic farming.
- Convenio sobre la Diversidad Biológica, 2000. Protocolo de Cartagena sobre seguridad de la biotecnología del convenio sobre la diversidad biológica.
- Crickmore, N. et al., 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62(3), pp.807–813.
- Daleprane, J.B., Feijó, T.S. & Boaventura, G.T., 2009. Organic and genetically modified soybean diets: consequences in growth and in hematological indicators of aged rats. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 64(1), pp.1–5.
- Daleprane, J.B., Pacheco, J.T. & Boaventura, G.T., 2009. Evaluation of protein quality from genetically modified and organic soybean in two consecutive generations of Wistar rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(4), pp.841–847.
- Datukishvili, N. et al., 2015. New multiplex PCR methods for rapid screening of genetically modified organisms in foods. *Frontiers in microbiology*, 6, p.757.
- Davidson, R.M. et al., 2012. Comparative transcriptomics of three Poaceae species reveals patterns of gene expression evolution. *Plant Journal*, 71(3), pp.492–502.
- Decourcelle, M. et al., 2015. Combined transcript, proteome, and metabolite analysis of transgenic maize seeds engineered for enhanced carotenoid synthesis reveals pleiotropic effects in core metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 66(11), pp.3141–3150.
- Delaplace, P. et al., 2006. Potato tuber proteomics: Comparison of two complementary extraction methods designed for 2-DE of acidic proteins. *Proteomics*, 6(24), pp.6494–6497.

- van Dijk, J.P. et al., 2012. The identification and interpretation of differences in the transcriptomes of organically and conventionally grown potato tubers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(9), pp.2090–101.
- van Dijk, J.P. et al., 2009. Transcriptome analysis of potato tubers--effects of different agricultural practices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4), pp.1612–23.
- Ditewig, A.C. et al., 2014. Enrichment with wood blocks does not affect toxicity assessment in an exploratory toxicology model using Sprague-Dawley rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 53(3), pp.246–60.
- Doebley, J. & Stec, A., 1993. Inheritance of the Morphological Differences Between Maize and Teosinte: Comparison of Results for Two F2 Populations. *Genetics Society of Arllericd*.
- Doty, S.L. et al., 2007. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), pp.16816–21.
- Du, H. et al., 2014. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in maize waterlogging stress response. *Euphytica*, 198(1), pp.115–126.
- Dukowic-Schulze, S. et al., 2014. The transcriptome landscape of early maize meiosis. *BMC plant biology*, 14(1), p.118.
- Dunaevsky, Y.E. et al., 2005. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. *Molecular Biology*, 39(4), pp.608–613.
- Van Eenennaam, A.L., 2013. GMOs in animal agriculture: time to consider both costs and benefits in regulatory evaluations. *Journal of animal science and biotechnology*, 4(1), p.37.
- EFSA, 2009. Applications (EFSA-GMO-RX-MON810) for renewal of authorisation for the continued marketing of (1) existing food and food ingredients produced from genetically modified insect resistant maize MON810; (2) feed consisting of and/or contain. *EFSA Journal*.
- EFSA, 2011a. Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. *EFSA Journal*, 9(5), p.2150.
- EFSA, 2011b. Guidance on conducting repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents on whole food/feed. *EFSA Journal*, 9(12), p.2438.
- EFSA, 2012a. Review of the Seralini et al. (2012) publication on a 2-year rodent feeding study with glyphosate formulations and GM maize NK603 as published online on 19 September 2012 in Food and Chemical Toxicology. *EFSA Journal*, 10(10), pp.1–9.
- EFSA, 2012b. Risk assessment of Genetically Modified Organisms (GMOs). *EFSA Journal*.
- EFSA, 2008. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food and Chemical Toxicology*, 46, pp.S2–S70.
- EFSA, 2012c. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA Journal*.
- EFSA, 2012d. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function. *EFSA Journal*, 10(10), p.2943.
- EFSA, 2010. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to various food(s)/food constituent(s) and protection of cells from premature aging, antioxidant activity, antioxidant content and antioxidant properties, and protection of DNA, proteins an. *EFSA Journal*, 8(2), pp.1–63.
- EFSA, 2011c. Statistical Significance and Biological Relevance. *EFSA Journal*, 9(9), pp.1–17.
- FAO, 2009. Feeding the world in 2050.
- FAO/WHO, 1996. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Biotechnology and Food Safety.
- Fasoli, E. et al., 2009. Searching for allergens in maize kernels via proteomic tools. *Journal of Proteomics*, 72(3), pp.501–510.
- Fedoroff, N. V., 2012. McClintock's challenge in the 21st century. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(50), pp.20200–20203.
- Ferrell, J.M. & Chiang, J.Y.L., 2015. Circadian rhythms in liver metabolism and disease. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(2), pp.113–122.
- Fonseca, C. et al., 2012. Characterization of maize allergens - MON810 vs. its non-transgenic counterpart. *Journal of proteomics*, 75(7), pp.2027–37.
- Fraley, R.T. et al., 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(August), pp.4803–4807.
- Fromm, M.E. et al., 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Nature Biotechnology*, 8(9), pp.833–9.
- Fujiyama, S. et al., 2001. Tumor markers for hepatocellular carcinoma. *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy*, 28(5), pp.723–732.
- Gaj, T., Gersbach, C.A. & Barbas, C.F., 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Cell*, 31(7), pp.397–405.
- García-Villalba, R. et al., 2008. Comparative metabolomic study of transgenic versus conventional soybean using capillary electrophoresis–time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1195(1), pp.164–173.
- Geiger, T., Cox, J. & Mann, M., 2010. Proteomics on an Orbitrap benchtop mass spectrometer using all-ion fragmentation. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 9(10), pp.2252–61.
- Gelvin, S.B., 1998. Agrobacterium VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. *Journal of Bacteriology*, 180(16), pp.4300–4302.
- Gelvin, S.B., 2012. Traversing the Cell: Agrobacterium T-DNA's Journey to the Host Genome. *Frontiers in plant science*, 3(52), pp.1–11.
- Gohlke, J. & Deeken, R., 2014. Plant responses to Agrobacterium tumefaciens and crown gall development. *Frontiers in plant science*, 5(155), pp.2–11.
- Gong, F. et al., 2014. "Omics" of Maize Stress Response for Sustainable Food Production: Opportunities and Challenges. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 18(12), pp.714–732.

- Griffin, J.L. & Kauppinen, R.A., 2007. Tumour metabolomics in animal models of human cancer. *Journal of proteome research*, 6(2), pp.498–505.
- Habib, H. & Fazili, K.M., 2007. Plant protease inhibitors : a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2(3), pp.68–85.
- Hammond, B.G. et al., 2006. Results of a 90-day safety assurance study with rats fed grain from corn borer-protected corn. *Food and Chemical Toxicology*, 44(7), pp.1092–1099.
- Hansey, C.N. et al., 2012. Maize (*zea mays* L.) genome diversity as revealed by rna-sequencing. *PLoS ONE*, 7(3), pp.1–10.
- Harmer, S.L., Panda, S. & Kay, S.A., 2001. Molecular bases of circadian rhythms. *Annual review of cell and developmental biology*, 17, pp.215–53.
- Hellemans, J. et al., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome biology*, 8(2), p.R19.
- Hernández, M. et al., 2003. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic research*, 12(2), pp.179–89.
- Herrera-Estrella, L. et al., 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *The EMBO journal*, 2(6), pp.987–95.
- Hoekema, A. et al., 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303, pp.179–180.
- Hoepflinger, M.C. et al., 2013. The effect of translationally controlled tumour protein (TCTP) on programmed cell death in plants. *BMC plant biology*, 13(1), p.135.
- Holck, A. et al., 2002. 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. *European Food Research and Technology*, 214(5), pp.449–453.
- Huang, H., Møller, I.M. & Song, S.Q., 2012. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. *Journal of Proteomics*, 75(4), pp.1247–1262.
- Hwang, W.Y. et al., 2013. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature biotechnology*, 31(3), pp.227–9.
- ILSI Research Foundation, 2011. A Review of the Environmental Safety of the Cry1Ab Protein. , pp.1–17.
- Imadi, S.R. et al., 2015. Plant transcriptomics and responses to environmental stress: an overview. *Journal of genetics*, 94(3), pp.525–37.
- Irar, S. et al., 2006. Towards the identification of late-embryogenic-abundant phosphoproteome in Arabidopsis by 2-DE and MS. *Proteomics*, 6 Suppl 1(1615-9861 (Electronic)), pp.S175–S185.
- Irizarry, R.A. et al., 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics (Oxford, England)*, 4(2), pp.249–64.
- ISAAA, 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops in 2014.
- Jaenisch, R. & Mintz, B., 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(4), pp.1250–4.
- James, E.L. & Parkinson, E.K., 2015. Serum metabolomics in animal models and human disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 18(5), pp.478–83.
- Jiang, W. et al., 2013. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, 31(3), pp.233–9.
- Jorrín-Novo, J. V et al., 2015. Fourteen years of plant proteomics reflected in Proteomics: moving from model species and 2DE-based approaches to orphan species and gel-free platforms. *Proteomics*, 15(5-6), pp.1089–112.
- Jozefczuk, J. et al., 2012. A Systems Biology Approach to Deciphering the Etiology of Steatosis Employing Patient-Derived Dermal Fibroblasts and iPS Cells. *Frontiers in physiology*, 3, p.339.
- JRC, Compendium of reference methods for GMO analysis. *JRC Reference Reports*. A
- Kanehisa, M. & Goto, S., 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), pp.27–30.
- Kim, H. & Kim, J.-S., 2014. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature reviews. Genetics*, 15(5), pp.321–34.
- Klein, T.M. et al., 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327, pp.70–73.
- Koch, M.S. et al., 2015. The food and environmental safety of Bt crops. *Frontiers in plant science*, 6, p.283.
- Kok, E.J. et al., 2008. Comparative safety assessment of plant-derived foods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50(1), pp.98–113.
- Kok, E.J. et al., 2014. Plants with stacked genetically modified events: to assess or not to assess? *Trends in Biotechnology*, 32(2), pp.70–73.
- Kok, E.J. & Kuiper, H.A., 2003. Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends in biotechnology*, 21(10), pp.439–44.
- Koncz, C. et al., 1992. T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, pp.963–976.
- König, A. et al., 2004. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food and chemical toxicology*, 42(7), pp.1047–88.
- Kuiper, H.A., Kok, E.J. & Davies, H. V, 2013. New EU legislation for risk assessment of GM food: no scientific justification for mandatory animal feeding trials. *Plant biotechnology journal*, 11(7), pp.781–4.
- Latham, J.R., Wilson, A.K. & Steinbrecher, R.A., 2006. The mutational consequences of plant transformation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2006(2), p.25376.
- Lee, H.J. et al., 2015. Lack of globulin synthesis during seed development alters accumulation of seed storage proteins in rice. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), pp.14717–14736.

- Lehesranta, S.J. et al., 2005. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. *Plant physiology*, 138(3), pp.1690–1699.
- Leimani, S. et al., 2008. Validation of the performance of a GMO multiplex screening assay based on microarray detection. *European Food Research and Technology*, 227(6), pp.1621–1632.
- Li, Q. et al., 2015. Transposable elements, mRNA expression level and strand-specificity of small RNAs are associated with non-additive inheritance of gene expression in hybrid plants. *BMC Plant Biology*, 15(1), p.168.
- Liang, C. et al., 2014. Detecting authorized and unauthorized genetically modified organisms containing vip3A by real-time PCR and next-generation sequencing. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(11), pp.2603–11.
- Lin, F. et al., 2014. Genome-wide identification of housekeeping genes in maize. *Plant Molecular Biology*, 86(4-5), pp.543–554.
- Liu, L. et al., 2016. Down-regulation of ABCG2 and ABCB4 transporters in the placenta of rats exposed to cadmium. *Oncotarget*.
- Liu, X. et al., 2015. RNA-Seq Transcriptome Analysis of Maize Inbred Carrying Nicosulfuron-Tolerant and Nicosulfuron-Susceptible Alleles. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), pp.5975–5989.
- Liu, Z. et al., 2012. Non-Uniform Distribution Pattern for Differentially Expressed Genes of Transgenic Rice Huahui 1 at Different Developmental Stages and Environments S. Park, ed. *PLoS ONE*, 7(5), p.e37078.
- Ljunggren, S.A. et al., 2016. Altered heart proteome in fructose-fed Fisher 344 rats exposed to bisphenol A. *Toxicology*, 347-349, pp.6–16.
- Louis, B. et al., 2014. Invasion of *Solanum tuberosum* L. by *Aspergillus terreus*: a microscopic and proteomics insight on pathogenicity. *BMC research notes*, 7, p.350.
- Lusser, M. et al., 2012. Deployment of new biotechnologies in plant breeding. *Nature Biotechnology*, 30(3), pp.231–239.
- Lusser, M. et al., 2011. *New plant breeding techniques. State-of-the-art and prospects for commercial development*, de Maagd, R. et al., 2003. Activity of wild-type and hybrid *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against *Agrotis ipsilon*. *Archives of Toxicology*, 179(5), pp.363–7.
- de Maagd, R.A. et al., 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA(b) results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Applied and environmental microbiology*, 62(5), pp.1537–43.
- De Maesschalck, R. et al., 1999. Decision criteria for soft independent modelling of class analogy applied to near infrared data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 47(1), pp.65–77.
- Makarevitch, I. et al., 2015. Transposable Elements Contribute to Activation of Maize Genes in Response to Abiotic Stress. *PLoS Genetics*, 11(1).
- Martyniuk, C.J., Alvarez, S. & Denslow, N.D., 2012. DIGE and iTRAQ as biomarker discovery tools in aquatic toxicology. *Ecotoxicology and environmental safety*, 76(2), pp.3–10.
- Masuda, H., Aung, M.S. & Nishizawa, N.K., 2013. Iron biofortification of rice using different transgenic approaches. *Rice (New York, N.Y.)*, 6(1), p.40.
- McClintock, B., 1950. THE ORIGIN AND BEHAVIOR OF MUTABLE LOCI IN MAIZE. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- McClintock, J.T., Schaffer, C.R. & Sjoblad, R.D., 1995. A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticide Science*, 45(2), pp.95–105.
- Méchin, V. et al., 2004. A two-dimensional proteome map of maize endosperm. *Phytochemistry*, 65(11), pp.1609–1618.
- Melé, E. et al., 2014. GIMI 2: A tool for fast estimation and prediction of GMO maize contents in real coexistence situations. *AgBioForum*, 17(2-3), pp.172–182.
- Melé, E. et al., 2015. Modeling gene flow distribution within conventional fields and development of a simplified sampling method to quantify adventitious GM contents in maize. *Scientific Reports*, 5(October), p.17106.
- Merril, C.R., 1990. Silver staining of proteins and DNA. *Nature*, 343(6260), pp.779–780.
- Messeguer, J. et al., 2006. Pollen-mediated gene flow in maize in real situations of coexistence. *Plant Biotechnology Journal*, 4(6), pp.633–645.
- Miki, B. et al., 2009. Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. *Plant Biotechnology Journal*, 7(3), pp.211–218.
- Milavec, M. et al., 2014. GMO quantification: valuable experience and insights for the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(26), pp.6485–97.
- Miller, I. et al., 2016. Dataset of liver proteins changed in eu- and hypothyroid female rats upon in vivo exposure to hexabromocyclododecane (HBCD). *Data in brief*, 7, pp.386–92.
- Millstone, E., Brunner, E. & Mayer, S., 1999. Beyond “substantial equivalence.” *Nature*, 401(6753), pp.525–526.
- Monica Gandhi et al., 2004. SEX DIFFERENCES IN PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS.
- Monsanto, 2007. Seguridad del maíz MON810 (Yieldgard) genéticamente protegido contra taladros.
- Nadal, A. et al., 2006. A new PCR-CGE (size and color) method for simultaneous detection of genetically modified maize events. *Electrophoresis*, 27(19), pp.3879–88.
- Nadal, A. et al., 2016. Asynchronous Flowering or Buffer Zones: Technical Solutions for Small-scale Farming. *EuroChoices*, 15(1), pp.24–30.
- Nature Publishing Group, 2012. Method of the Year 2011. *Nature Methods*, 9(1), p.1.
- Nester, E.W., 2015. Agrobacterium: nature’s genetic engineer. *Frontiers in plant science*, 5(730), pp.1–16.
- Netter, F., 2012. *ATLAS DE ANATOMÍA HUMANA* J. Hansen et al., eds., Elsevier.
- O’Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of biological chemistry*, 250(10), pp.4007–21.
- OECD, 2006. AN INTRODUCTION TO THE FOOD/FEED SAFETY CONSENSUS DOCUMENTS OF THE TASK FORCE, N° 14.
- OECD, 1993. *Safety evaluation of foods derived by modern biotechnology*,

- OECD, 1998. Test 408: Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents.
- OECD, 2009a. Test 451: Carcinogenicity Studies. ,
- OECD, 2009b. Test 452: Chronic Toxicity Studies. *Draft consultant's proposal*.
- OECD, 2009c. Test 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies.
- Oliveira, B.M., Coorssen, J.R. & Martins-de-Souza, D., 2014. 2DE: the phoenix of proteomics. *Journal of proteomics*, 104, pp.140–50.
- Palauelmàs, M. et al., 2012. Assessment of the influence of field size on maize gene flow using SSR analysis. *Transgenic Research*, 21(3), pp.471–483.
- Palauelmàs, M. et al., 2009. Effect of volunteers on maize gene flow. *Transgenic research*, 18(4), pp.583–94.
- Palauelmàs, M., 2009. *Flux de gens entre blat de moro transgènic i convencional*.
- Palmiter, R.D. et al., 1982. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*.
- Park, T.-H. et al., 2005. The late blight resistance locus Rpi-bib3 from Solanum bulbocastanum belongs to a major late blight R gene cluster on chromosome 4 of potato. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 18(7), pp.722–729.
- Parlamento Europeo, 2001. Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de marzo de 2001 sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente y por la que se deroga la Directiva 90/220/CEE del Consejo. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*.
- Parlamento Europeo, 2015. Directiva 2015/412 por la que se modifica la Directiva 2001/18/CE en lo que respecta a la posibilidad de que los Estados miembros restrinjan o prohíban el cultivo de organismos modificados genéticamente (OMG) en su territorio. *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- Parlamento Europeo, 2014. Reglamento N° 120/2014. *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- Parlamento Europeo, 2003. Reglamento N° 1829/2003. *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- Parlamento Europeo, 2013. Reglamento N° 503/2013. *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- Parlamento Europeo, 2011. Reglamento N° 619/2011. *Diario Oficial de la Unión Europea*.
- Pauwels, K. et al., 2015. Next-generation sequencing as a tool for the molecular characterisation and risk assessment of genetically modified plants: Added value or not? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), pp.319–326.
- La Paz, J.L., Vicient, C., et al., 2010. Characterization of polyadenylated cryIA(b) transcripts in maize MON810 commercial varieties. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(6), pp.2125–2133.
- La Paz, J.L., 2011. *Detección, variabilidad y efectos no intencionados derivados de la inserción y expresión del transgén cry1A(b) en el maíz MON810*.
- La Paz, J.L., Pla, M., et al., 2010. Stability of the MON 810 transgene in maize. *Plant Molecular Biology*, 74(6), pp.563–571.
- La Paz, J.L. et al., 2014. The use of massive sequencing to detect differences between immature embryos of MON810 and a comparable non-GM maize variety. *PLoS ONE*, 9(6).
- Pechanova, O. & Pechan, T., 2015. Maize-pathogen interactions: An ongoing combat from a proteomics perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), pp.28429–28448.
- Pla, M. et al., 2008. New Multiplexing Tools for Reliable GMO Detection. In *Genetically Modified and Non-Genetically Modified Food Supply Chains: Co-Existence and Traceability*.
- Pla, M., La Paz, J.L. & Vicient, C., 2012. Insert Stability and Transgenic Plant Risk. In *Encyclopedia of Biotechnology in Agriculture and Food*. pp. 1–4.
- Poulsen, M. et al., 2007. A 90-day safety study in Wistar rats fed genetically modified rice expressing snowdrop lectin Galanthus nivalis (GNA). *Food and Chemical Toxicology*, 45(3), pp.350–363.
- Project, I.R.G.S., 2005. The map-based sequence of the rice genome. *Nature*.
- Puigdomènech, P. & Caparrós, D., 2011. *La energía de los vegetales*, Fundación Gas Natural.
- Pulice, G., Pelaz, S. & Matías-Hernández, L., 2016. Molecular Farming in Artemisia annua, a Promising Approach to Improve Anti-malarial Drug Production. *Frontiers in plant science*, 7, p.329.
- Rahmatallah, Y., Emmert-Streib, F. & Glazko, G., 2014. Comparative evaluation of gene set analysis approaches for RNA-Seq data. *BMC bioinformatics*.
- Ramessar, K. et al., 2010. Going to ridiculous lengths--European coexistence regulations for GM crops. *Nature biotechnology*, 28(2), pp.133–136.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J.P. & Garcia-Casal, M.N., 2014. Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312(1), pp.105–112.
- Rapaport, F. et al., 2013. Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. *Genome biology*, 14(9), p.R95.
- Reznick, J. et al., 2013. Altered feeding differentially regulates circadian rhythms and energy metabolism in liver and muscle of rats. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(1), pp.228–38.
- Ricroch, A.E., 2013. Assessment of GE food safety using “-omics” techniques and long-term animal feeding studies. *New Biotechnology*, 30(4), pp.349–354.
- Ricroch, A.E., Bergé, J.B. & Kuntz, M., 2011. Evaluation of genetically engineered crops using transcriptomic, proteomic, and metabolomic profiling techniques. *Plant physiology*, 155(4), pp.1752–61.
- Roberts, J.K. et al., 1993. Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two Lea proteins in cotton embryos. *The Plant Cell*, 5(7), pp.769–780.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. & Smyth, G.K., 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(1), pp.139–40.
- Roessner, U., Willmitzer, L. & Fernie, A.R., 2001. High-resolution metabolic phenotyping of genetically and environmentally diverse potato tuber systems. Identification of phenocopies. *Plant physiology*, 127(3), pp.749–64.

- Romani, I. et al., 2012. Versatile roles of Arabidopsis plastid ribosomal proteins in plant growth and development. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 72(6), pp.922–34.
- Rosati, A. et al., 2008. Characterisation of 3' transgene insertion site and derived mRNAs in MON810 YieldGard® maize. *Plant Molecular Biology*, 67(3), pp.271–281.
- Ruiz, O.N. & Daniell, H., 2009. Genetic engineering to enhance mercury phyto remediation. *Current opinion in biotechnology*, 20(2), pp.213–9.
- Sahini, N., Selvaraj, S. & Borlak, J., 2014. Whole genome transcript profiling of drug induced steatosis in rats reveals a gene signature predictive of outcome. *PLoS one*, 9(12), p.e114085.
- Salvo, S. a. G.D. et al., 2014. Whole Transcriptome Profiling of Maize during Early Somatic Embryogenesis Reveals Altered Expression of Stress Factors and Embryogenesis-Related Genes. *PLoS ONE*, 9(10), p.e111407.
- Sambrook, J. & Russell, D., 2001. *Molecular Cloning. A laboratory manual.*
- Sander, J.D. & Joung, J.K., 2014. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), pp.347–55.
- Sanford, J.C., Smith, F.D. & Russell, J.A., 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in Enzymology*, 217, pp.483–509.
- Sauka, D.H. & Benintende, G.B., 2008. Bacillus thuringiensis: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas.
- Schiemann, J., Steinberg, P. & Salles, B., 2014. Facilitating a transparent and tailored scientific discussion about the added value of animal feeding trials as well as in vitro and in silico approaches with whole food/feed for the risk assessment of genetically modified plants. *Archives of toxicology*, 88(12), pp.2067–9.
- Schmidt, K. et al., *Proposed criteria for the evaluation of the scientific quality of rat and mouse feeding trials with whole food/feed derived from genetically modified plants*,
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, Liang C, Zhang J, Fulton L, Graves TA, Minx P, Reily AD, Courtney L, Kruchowski SS, Tomlinson C, Strong C, Delehaunty K, Fronick C, Courtney B, Rock SM, Belter E, Du F, Kim K, Abbott RM, Cotton, W.R., 2009. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science (New York, N.Y.)*.
- Schouten, H.J., Krens, F.A. & Jacobsen, E., 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants: international regulations for genetically modified organisms should be altered to exempt cisgenesis. *EMBO reports*, 7(8), pp.750–3.
- Schroeder, A. et al., 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 7(1), p.3. A
- Scigelova, M. & Makarov, A., 2006. Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics. *PROTEOMICS*, 6(S2), pp.16–21.
- Séralini, G.-E. et al., 2013. Answers to critics: Why there is a long term toxicity due to a Roundup-tolerant genetically modified maize and to a Roundup herbicide. *Food and chemical toxicology*, 53, pp.476–83.
- Serra-Soriano, M. et al., 2015. Comparative proteomic analysis of melon phloem exudates in response to viral infection. *Journal of Proteomics*, 124, pp.11–24.
- Seyednasrollah, F., Laiho, A. & Elo, L.L., 2013. Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. , 16(1).
- Shindo, Y. et al., 2002. Validation of Real-Time PCR Analyses for Line-Specific Quantitation of Genetically Modified Maize and Soybean Using New Reference Molecules. *Journal of AOAC International*, 85(5).
- Siegel, J.P., 2001. The mammalian safety of Bacillus thuringiensis-based insecticides. *Journal of invertebrate pathology*, 77(1), pp.13–21.
- Singh, S. et al., 2005. Influence of sex on toxicity and treatment outcome in small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(4), pp.850–6.
- Smith, E.F. & Townsend, C.O., 1907. A plant tumor of bacterial origin. *Science*, 25, pp.671–673.
- Smyth, G.K., 2004. Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. , 3(1), pp.1–26.
- Snell, C. et al., 2012. Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3), pp.1134–1148.
- Soneson, C. & Delorenzi, M., 2013. A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC bioinformatics*, 14(1), p.91.
- Sorek, R., Lawrence, C.M. & Wiedenheft, B., 2013. CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annual review of biochemistry*, 82, pp.237–66.
- Stachel, S.E., Nester, E.W. & Zambryski, P.C., 1986. A plant cell factor induces Agrobacterium tumefaciens vir gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp.379–383.
- Steinke, K. et al., 2010. Effects of long-term feeding of genetically modified corn (event MON810) on the performance of lactating dairy cows. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 94(5), pp.e185–93.
- Subramoni, S. et al., 2014. Agrobacterium tumefaciens responses to plant-derived signaling molecules. *Frontiers in plant science*, 5(322), pp.1–12.
- Switzer, R.C., Merrill, C.R. & Shifrin, S., 1979. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 98(1), pp.231–237.
- Tahara, Y. & Shibata, S., 2016. Circadian rhythms of liver physiology and disease: experimental and clinical evidence. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 13(4), pp.217–226.
- Thelen, J.J. et al., 2012. The proteomic future: where mass spectrometry should be taking us. *The Biochemical journal*, 444(2), pp.169–81.

- Thompson, G.A. & Goggin, F.L., 2006. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects. *Journal of experimental botany*, 57(4), pp.755–66.
- Trapnell, C. et al., 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and cufflinks. *Nature Protocols*, 29(6), pp.997–1003.
- Trapnell, C. et al., 2010. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nature Biotechnology*, 28(5), pp.511–515.
- Tzfira, T. & Citovsky, V., 2006. Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, pp.147–154.
- Usui, Y. et al., 2001. A 33-kDa allergen from rice (*Oryza sativa* L. Japonica). cDNA cloning, expression, and identification as a novel glyoxalase I. *The Journal of biological chemistry*, 276(14), pp.11376–81.
- Vasil, V. et al., 1992. Herbicide Resistant Fertile Transgenic Wheat Plants Obtained by Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus. *Nature Biotechnology*, 10(6), pp.667–674.
- Veluthambi, K., Gupta, A.K. & Sharma, A., 2003. The current status of plant transformation technologies. *Current Science*, 84(3), pp.368–380.
- Vidal, N. et al., 2015. Comparative study of transgenic and non-transgenic maize (*Zea mays*) flours commercialized in Brazil, focussing on proteomic analyses. *Food Chemistry*, 180, pp.288–294.
- Van Der Vossen, E. et al., 2003. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant Journal*, 36(6), pp.867–882.
- Wakasa, K. et al., 2006. High-level tryptophan accumulation in seeds of transgenic rice and its limited effects on agronomic traits and seed metabolite profile. *Journal of experimental botany*, 57(12), pp.3069–78.
- Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1), pp.57–63.
- Want, E.J. et al., 2013. Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS. *Nature protocols*, 8(1), pp.17–32.
- Waxman, D.J. & Holloway, M.G., 2009. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Molecular pharmacology*, 76(2), pp.215–28.
- Weckwerth, W., 2011. Green systems biology - From single genomes, proteomes and metabolomes to ecosystems research and biotechnology. *Journal of Proteomics*, 75(1), pp.284–305.
- Weingartner, U., Camp, K.-H. & Stamp, P., 2004. Impact of male sterility and xenia on grain quality traits of maize. *European Journal of Agronomy*, 21(2), pp.239–247.
- Willems, S. et al., 2016. Statistical framework for detection of genetically modified organisms based on Next Generation Sequencing. *Food chemistry*, 192, pp.788–98.
- Wold, S. & Sjöström, M., 1977. SIMCA: A Method for Analyzing Chemical Data in Terms of Similarity and Analogy. In pp. 243–282.
- World Health Organization, 2000. Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology.
- Wu, L. et al., 2013. Comparative proteomic analysis of the plant–virus interaction in resistant and susceptible ecotypes of maize infected with sugarcane mosaic virus. *Journal of Proteomics*, 89, pp.124–140.
- Wu, X. et al., 2015. Proteomic analysis reveals differential accumulation of small heat shock proteins and late embryogenesis abundant proteins between ABA-deficient mutant vp5 seeds and wild-type Vp5 seeds in maize. *Frontiers in Plant Science*, 5(January), pp.1–18.
- Yadava, P. et al., 2015. Extraction of proteins for two-dimensional gel electrophoresis and proteomic analysis from an endophytic fungus. *Protocol Exchange*.
- Yau, Y.-Y. & C Neal, S.J., 2013. Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants. *BMC Biotechnology*, 13, p.36.
- Yoshitane, H. et al., 2014. CLOCK-controlled polyphonic regulation of circadian rhythms through canonical and noncanonical E-boxes. *Molecular and cellular biology*, 34(10), pp.1776–87.
- Zanger, U.M. & Schwab, M., 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & therapeutics*, 138(1), pp.103–41.
- Zeljenková, D. et al., 2016. 1-Year oral toxicity study on a genetically modified maize MON810 variety in Wistar Han RCC rats. *Archives of Toxicology*.
- Zeljenková, D. et al., 2014. Ninety-day oral toxicity studies on two genetically modified maize MON810 varieties in Wistar Han RCC rats (EU 7th Framework Programme project GRACE). *Archives of toxicology*, 88(12), pp.2289–314.
- Zeng, W. et al., 2014. Analytical method evaluation and discovery of variation within maize varieties in the context of food safety: Transcript profiling and metabolomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(13), pp.2997–3009.
- Zhu, Y. et al., 2004. Nutritional assessment and fate of DNA of soybean meal from roundup ready or conventional soybeans using rats. *Archives of animal nutrition*, 58(4), pp.295–310.
- Zou, W. et al., 2010. Oxidative stress is important in the pathogenesis of liver injury induced by sulindac and lipopolysaccharide cotreatment. *Toxicology*, 272(1-3), pp.32–8.

Referencias páginas web

AgriGO	bioinfo.cau.edu.cn/agriGO
ANOVE	web.anove.es
ANTAMA	fundacion-antama.org
Aquabounty	www.aquabounty.com
Atlas de Histología Vegetal y Animal	mmegias.webs.uvigo.es
BiomartGramene	ensembl.gramene.org/biomart
Bt Nomenclature	www.btnomenclature.info
CERA	cera-gmc.org
EFSA	www.efsa.europa.eu
EFSA Panel on Genetically Modified Organisms	www.efsa.europa.eu/en/panels/gmo
Ensembl	www.ensembl.org/index.html
EnsemblPlants	plants.ensembl.org
EU Register of authorised GMOs	ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
European Statistics	ec.europa.eu/eurostat
European Union Law	eur-lex.europa.eu/homepage.html
FAO	www.fao.org
FAO GM Food Platform	www.fao.org/food/food-safety-quality/gm-foods-platform
FAOSTAT	faostat3.fao.org
Gene Ontology	geneontology.org
Genetic Science Learning Centre University of Utah	learn.genetics.utah.edu/content/selection/corn/
GeneVisible	genevisible.com
GMO Compass	www.gmo-compass.org
GRACE	www.grace-fp7.eu
International Grains Council	www.igc.int
ISAAA	www.isaaa.org
ISAAA Approval Database	www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/default.asp
Joint Research Centre	gmo-crl.jrc.ec.europa.eu
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	genome.jp/kegg
Ludesi	www.ludesi.com
Maize GDB	www.maizegdb.org
Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente	www.magrama.gob.es/es
NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov
OECD	www.oecd.org
Omics	omics.org
Panther DataBase	www.pantherdb.org
Protien Human Atlas	www.proteinatlas.org
String DataBase	www.string-db.org
Trapnell lab	cole-trapnell-lab.github.io
Uniprot.org	www.uniprot.org
University of Minnesota	www.extension.umn.edu
World of Corn	www.worldofcorn.com

Anexo I: Abreviaturas

AECOSAN: Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición	OECD: <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
ANOVA: Análisis de la Varianza	OMG: Organismo Modificado Genéticamente
CE: Comisión Europea	ON: <i>Overnight</i>
CI: Intervalo de Confianza	P: Fosforo
CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo	p/v: relación peso/volumen
cm: centímetro	pb: pares de bases
DNA: Ácido desoxirribonucleico	PCA: <i>Principal Component Analysis</i>
DNAsa: Desoxirribonucleasa	PCR: <i>Polimerase Chain Reaction</i>
DO: Densidad Óptica	pl: punto Isoelectrico
DTT: 1,4-Dithiothreitol	PM: Peso Molecular
EEMM: Estados Miembros	PMG: Planta Modificada Genéticamente
EFSA: <i>European Food Safety Agency</i>	ppb: partes por billón
FAO: <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>	ppm: partes por millón
FC: <i>Fold Change</i>	PVPP: <i>Polyvinylpolypyrrolidone</i>
FDR: <i>False Discovery Rate</i>	qPCR: PCR cuantitativa
g: gramo	RMA: <i>Robust Multi-Array Average</i>
GRACE: <i>GMO Risk Assessment and Communication of Evidence</i>	RNA: Ácido Ribonucleico
h: horas	RNAsa: Ribonucleasa
ha: hectárea	rpm: Revoluciones por minuto
HSD: <i>Honestly Significant Difference</i>	RT: Retrotranscripción
IEF: <i>Isoelectric Focusing</i>	s: segundos
IPG: <i>Immobilized pH gradient</i>	SDS-PAGE: <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
JRC: <i>Joint Research Center</i>	TA: Temperatura Ambiente
K: potasio	TCA: Ácido Tricloracético
kDa: kiloDaltons	Tm: <i>melting Temperature</i>
kg: kilogramo	U: Unidad
L: Litro	UE: Unión Europea
M: Molar	UPGMA: <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
mg: miligramo	USDA: <i>United States Department of Agriculture</i>
MG: Modificado Genéticamente	V: Voltios
min: minutos	v/v: relación volumen/volumen
mL: mililitro	W: Vatios
mM: milimolar	µg: microgramo
MS: <i>Mass Spectrometry</i>	µL: microlitro
N: Nitrógeno	°C: Grados centígrados
N₂: Nitrógeno molecular	♂♂: machos
ng: nanogramos	♀♀: hembras
nm: nanómetros	

Anexo II: Tecnologías emergentes de obtención de plantas mejoradas

Modificado de Lusser, Parisi, Plan, & Rodríguez-Cerezo, 2011

Agro-infiltration: *Plant tissues, mostly leaves, are infiltrated with a liquid suspension of Agrobacterium sp. containing a genetic construct. The genetic construct is locally expressed at high level, without being integrated into the plant genome.*

Cell fusion/Protoplast fusion: *Protoplasts are produced by removing the cell wall from plant cells using either mechanical or enzymatic means. Protoplasts from two different species can be fused to create a hybrid. The fusion can be accomplished by an electrical process or by chemical agents.*

Cisgenesis and intragenesis: *A DNA fragment from the species itself or from a cross-compatible species is inserted into the plant genome. In the case of cisgenesis, the inserted gene is unchanged with its own introns and regulatory sequences. In the case of intragenesis, the inserted DNA can be a new combination of DNA fragments from the species itself or from a cross-compatible species.*

CRISPR/Cas (CRISPR associated) systems: *Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats are loci that contain multiple short direct repeats, and provide acquired immunity to bacteria and archaea. CRISPR systems rely on crRNA and tracrRNA for sequence-specific silencing of invading foreign DNA. Three types of CRISPR/Cas systems exist: in type II systems, Cas9 serves as an RNA-guided DNA endonuclease that cleaves DNA upon crRNA–tracrRNA target recognition.*

Dihaploid breeding: *Dihaploids are used for breeding crops that are natural polyploids (e.g. potato with four basic sets of chromosomes, 4n). A dihaploid plant (in this case 2n) is generated and is used for any type of breeding (conventional or biotechnology) since breeding and crossings with polyploids are extremely complex. At the end of the breeding process the polyploidy is restored.*

Double haploid breeding: *A haploid plant is generated out of pollen grains with one set of chromosomes (n) followed by duplicating the chromosomes to generate a 2n plant. This is a way to obtain 100% homozygous individuals which can be used as parental lines for hybrid production.*

Embryo Rescue: *In the case of wide crosses, the embryo formed after fertilisation frequently fails to develop. When applying the technique of embryo rescue, the ovary is excised within several days after fertilisation to avoid abortion. The embryo is then nurtured into a full plant by using the tissue culture technology.*

Genomic-Assisted Breeding: *Genomic-assisted breeding developed from marker-assisted breeding. It aims at rapidly investigating the genetic makeup of individual plants and selecting desirable genotypes by using diverse molecular- based tools.*

Grafting (on GM rootstock): *A chimeric plant is produced by grafting a non-genetically modified scion on a genetically modified rootstock.*

In vitro fertilization: *Plant reproductive structures such as flower explants, ovaries, ovules and mature pollen, are isolated. Fusion of gametes is achieved in suitable solutions in-vitro and can be facilitated by the presence of chemicals such as calcium ions or polyethylene glycol (PEG) or an electrical process. This allows the production of hybrids even between only remotely related species.*

Meganuclease delivered as DNA; meganuclease delivered as RNA; meganuclease delivered as protein: *Meganucleases are proteins that specifically recognize target DNA sequences of 12 to over 30 base pairs and create a double strand break (DSB) that activates repair mechanisms and DNA recombination. Similarly, to ZFNs, the technique can be used for site-specific mutagenesis or for targeted gene insertion by homologous recombination. Newly designed meganucleases can be produced in order to induce site- specific DNA recombination at a chosen locus in plant cell.*

Mutagenesis: *Chemicals such as ethyl methane sulfonate (EMS) or ionising radiations are used to cause random mutation in the DNA of crops. The treated plants are screened for interesting properties.*

Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM): *Also known as Targeted Gene Repair, oligonucleotide-directed Gene Targeting, Genoplasty, Chimeroplasty, etc. Oligonucleotides target homologous DNA and induce site-specific nucleotide substitutions, insertions or deletions through repair mechanisms. The*

following types of oligonucleotides are used: Single stranded DNA oligonucleotides, chimeric oligonucleotides, triple helix-forming oligonucleotides (TFOs) and RNA oligonucleotides.

Polyploidy induction: Polyploidy occurs in cells when there are more than two paired sets of chromosomes. It can be induced in cell culture by some chemicals e.g. colchicine.

Reverse Breeding: Homozygous parental lines are produced from selected heterozygous plants by suppressing meiotic recombination. This suppression is obtained through RNA interference-mediated downregulation of genes involved in the meiotic recombination process. Subsequently, the obtained homozygous lines are hybridised, in order to reconstitute the original genetic composition of the selected heterozygous plants.

RNA-dependent DNA methylation (RdDM): Genes encoding RNAs which are homologous to plant sequences, like promoter regions, are delivered to the plant cells. These genes, once transcribed, give rise to the formation of small double stranded RNAs. They induce methylation of the homologous sequences and consequently inhibit their transcription.

TALENs: Transcription activator-like effector nucleases are fusions of the Fok I cleavage domain and DNA-binding domains derived from TALE proteins. TALEs contain multiple 33–35-amino-acid repeat domains that each recognizes a single base pair. Like ZFNs, TALENs induce targeted DSBs that activate DNA damage response pathways and enable custom alterations

Transgenesis: A DNA fragment from a non-cross compatible species is inserted into the plant genome.

Transgenic inducer construct-driven breeding tools: A transgene encoding an RNAi construct or a dominant-negative protein is present in (e.g. inserted into the genome of) an inducer line. The expression of the transgene leads to the inhibition of gene expression or the inhibition of a protein function, respectively, thereby interfering with processes underlying to relevant biology. Interference with plant biology leads to the induction of the formation of materials enhancing breeding (e.g. biodiversity, recombination, haploids). The inducer transgene is segregated out during further breeding and therefore not present in the final product.

Zinc finger nuclease technology 1: Genes encoding Zinc Finger Nucleases (ZFN) are delivered to plant cells without a repair template. The ZFN binds to the DNA and generates a site-specific double strand break (DSB). The natural DNA-repair process through non-homologous end-joining (NHEJ) leads to site-specific random mutations, which consist of changes of single or few base pairs, short deletions or insertions.

Zinc finger nuclease technology 2: Genes encoding Zinc Finger Nucleases (ZFN) are delivered to plant cells along with a short repair template. The ZFN binds to the DNA and generates a site-specific double strand break (DSB). Gene repair mechanisms generate site-specific point mutations like changes of single or few base pairs through homologous recombination.

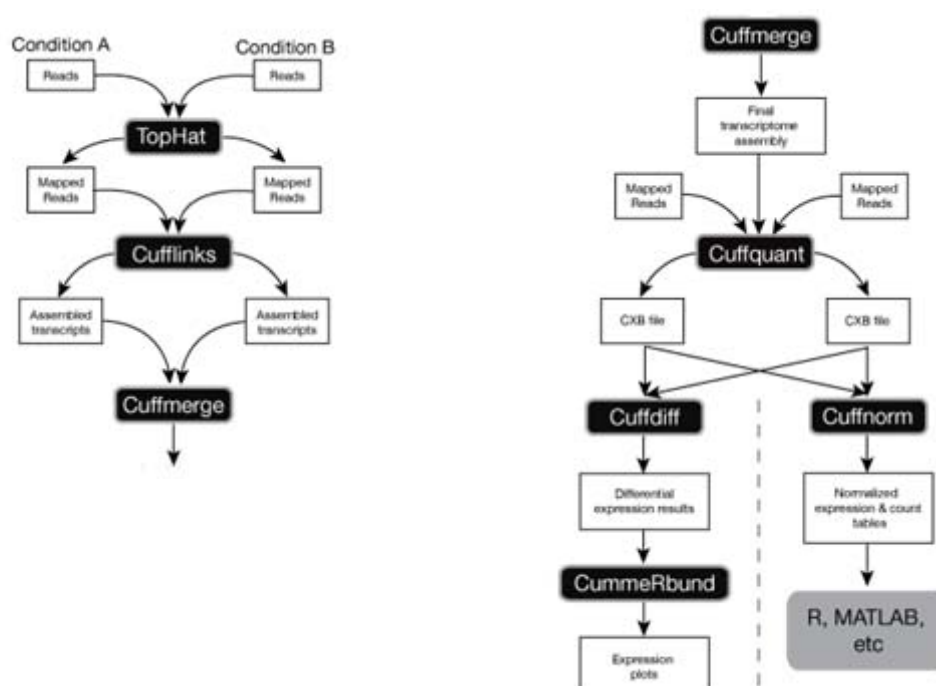
Zinc finger nuclease technology 3: Genes encoding Zinc Finger Nucleases (ZFN) are delivered to plant cells along with a large stretch of DNA, whose ends are homologous to the DNA sequences flanking the cleavage site. As a result, the DNA stretch is site-specifically inserted into the plant genome.

Anexo III

Resumen de los resultados del mapeo de lecturas de RNA-Seq sobre el genoma de maíz (TopHat v 2.0.9)

Variedad	Lecturas limpias	Lecturas mapeadas	% mapeo	% alineamientos múltiples	% más de 20 alineamientos
48mg_12 rep1	44529012	36761485	82.60	32.70	0.03
48mg_12 rep2	44397991	31876947	71.80	41.70	0.03
48mg_13 rep1	44481372	35159766	79.00	35.20	0.03
48mg_13 rep2	44099802	34691571	78.70	36.00	0.03
16_12 rep1	44486063	36853858	82.80	31.90	0.03
16_12 rep2	44544937	40494657	90.90	32.00	0.03
16_13 rep1	44478911	36295865	81.60	30.80	0.03
16_13 rep2	42109686	35285681	83.80	32.20	0.04
67mg_12 rep1	44553743	37873020	85.00	35.10	0.03
67mg_12 rep2	44450794	36677899	82.50	37.70	0.03
66_12 rep1	44471566	35611025	80.10	38.20	0.03
66_12 rep2	44586024	38962981	87.40	38.40	0.03
15_12 rep1	44532.194	37823476	84.90	31.90	0.03
15_12 rep2	44577.245	40854651	91.60	29.70	0.03
15_13 rep1	44514009	37425302	84.10	27.10	0.02
15_13 rep2	42119801	34960590	83, 0	31.90	0.04
AL_12 rep1	44406120	35659638	80.30	41.30	0.03
AL_12 rep2	44384302	33991089	76.60	39.50	0.04
82_12 rep1	44397466	33771914	76.10	39.50	0.04
82_12 rep2	44396381	32222526	72.60	42.70	0.04
83_12 rep1	44479629	39914890	89.70	31.90	0.02
83_12 rep2	44501303	39343616	88.40	31.80	0.03

Resumen del proceso bioinformático Cufflinks v 2.2.0 seguido para el análisis del RNA-Seq. [Fuente: Trapnell Lab]



Anexo IV: Spots diferenciales en los proteomas 2D de variedades de maíz contaminadas respecto a las variedades adecuadas para el consumo.

Spot #	No contaminadas									Contaminadas		log2(FC)	q valor
	67mg_12	66_12	48mg_12	16_12	82_12	83_12	AL_12	15_12	17_12	17cont_12	15cont_12		
41	180.2	138.3	81.8	189.4	653.1	266.0	3120.1	105.5	90.0	23.0	1.0	-5.52	0.022
501	1547.2	1547.2	1637.6	1596.7	1392.4	1722.7	1041.4	1538.9	1110.3	232.9	131.0	-3.00	0.004
407	416.5	416.5	248.2	105.9	182.5	249.0	163.8	74.8	213.1	15.6	51.1	-2.71	0.005
16	2463.3	2463.3	2393.4	2311.7	3501.2	2019.7	181.3	958.1	1187.4	396.1	307.5	-2.53	0.009
85	13.1	13.1	905.2	1.0	71.8	16.5	202.4	693.1	38.5	6.2	77.8	-2.44	0.014
632	331.7	331.7	474.0	133.0	703.8	485.9	711.7	376.7	294.0	28.1	158.0	-2.35	0.020
1141	96.5	96.5	64.4	406.9	249.0	202.2	113.6	465.7	583.4	18.3	82.2	-2.33	0.020
480	246.7	246.7	265.5	178.2	275.6	326.6	325.3	223.5	274.9	87.9	15.4	-2.28	0.020
1112	95.0	95.0	128.8	207.5	78.7	167.4	95.4	201.5	195.6	54.5	13.5	-2.01	0.036
91	1216.4	1216.4	960.8	1418.9	1505.0	1280.0	1553.1	893.4	911.7	305.4	347.9	-1.89	0.002
540	492.6	492.6	229.7	691.5	281.6	380.8	293.9	255.9	460.1	61.1	148.7	-1.80	0.014
80	87.6	87.6	102.2	171.9	521.8	154.0	2071.4	124.3	91.8	105.5	118.6	-1.79	0.018
724	237.4	237.4	395.0	374.7	376.5	391.9	322.7	353.9	132.7	81.7	106.9	-1.77	0.042
1325	519.4	519.4	220.5	174.0	376.6	449.3	268.3	316.4	392.9	91.1	117.3	-1.72	0.034
187	93.7	93.7	255.6	65.7	356.8	221.9	327.4	122.8	61.4	79.8	37.4	-1.69	0.019
1239	394.0	394.0	536.3	282.2	121.8	362.5	170.8	162.0	123.4	46.2	120.7	-1.66	0.019
399	678.6	678.6	252.3	1011.8	779.5	580.5	733.0	919.6	1076.3	246.5	217.3	-1.66	0.048
576	779.3	779.3	1216.5	524.9	395.3	952.3	392.9	480.5	344.6	183.6	220.8	-1.63	0.023
849	773.1	773.1	1375.7	666.8	1041.8	990.5	956.2	471.8	1002.6	399.4	174.0	-1.62	0.028
800	228.2	228.2	207.9	159.4	109.6	257.6	134.8	87.6	150.3	57.7	47.5	-1.59	0.031
120	2916.4	2916.4	1126.7	179.7	2877.7	2467.4	2579.6	2640.6	942.1	507.0	873.7	-1.58	0.012
263	641.5	641.5	655.8	734.0	518.9	506.3	256.2	660.1	707.9	175.8	232.0	-1.49	0.034
1195	373.8	373.8	655.8	334.1	663.0	433.5	387.9	497.4	671.9	144.7	198.5	-1.49	0.019
459	1558.0	1558.0	976.2	461.7	1028.8	1169.5	2070.0	2723.4	806.2	528.4	473.1	-1.47	0.011
49	1907.6	1907.6	4018.9	3354.7	3270.6	2147.3	1624.9	1304.6	1625.6	1130.0	616.9	-1.44	0.002
1091	461.2	461.2	593.0	1058.8	502.6	528.6	605.3	479.0	608.1	162.9	290.4	-1.43	0.013
131	1587.7	1587.7	878.1	159.6	962.4	1486.9	1661.5	1081.7	802.1	513.3	328.3	-1.42	0.048
611	1069.9	1069.9	762.3	1224.7	914.8	1084.3	808.9	703.2	893.7	256.6	442.3	-1.42	0.011
137	1478.6	1478.6	1123.5	1462.9	1010.9	1513.4	1295.5	1285.5	1238.1	589.7	424.2	-1.37	0.034
502	532.6	532.6	581.9	1241.8	431.8	672.9	416.3	709.6	826.6	301.2	210.4	-1.37	0.029
1409	774.5	774.5	694.1	721.1	805.5	699.8	706.1	643.6	796.7	347.2	242.1	-1.36	0.037
401	1960.7	1960.7	1672.0	1528.0	2367.8	1800.2	1611.8	1636.0	520.0	612.8	725.3	-1.36	0.008
683	1092.7	1092.7	732.5	732.6	1197.5	1031.1	730.4	802.7	282.3	274.3	417.3	-1.35	0.002
23	2352.1	2352.1	1745.7	2240.9	1952.9	1635.4	497.6	1693.3	1060.6	921.2	359.0	-1.33	0.020
1388	197.2	197.2	146.8	568.7	207.6	384.7	229.0	254.4	276.7	130.8	89.1	-1.33	0.034
241	1295.0	1295.0	888.5	1290.6	887.2	863.3	618.9	626.0	1107.9	464.7	274.6	-1.33	0.026

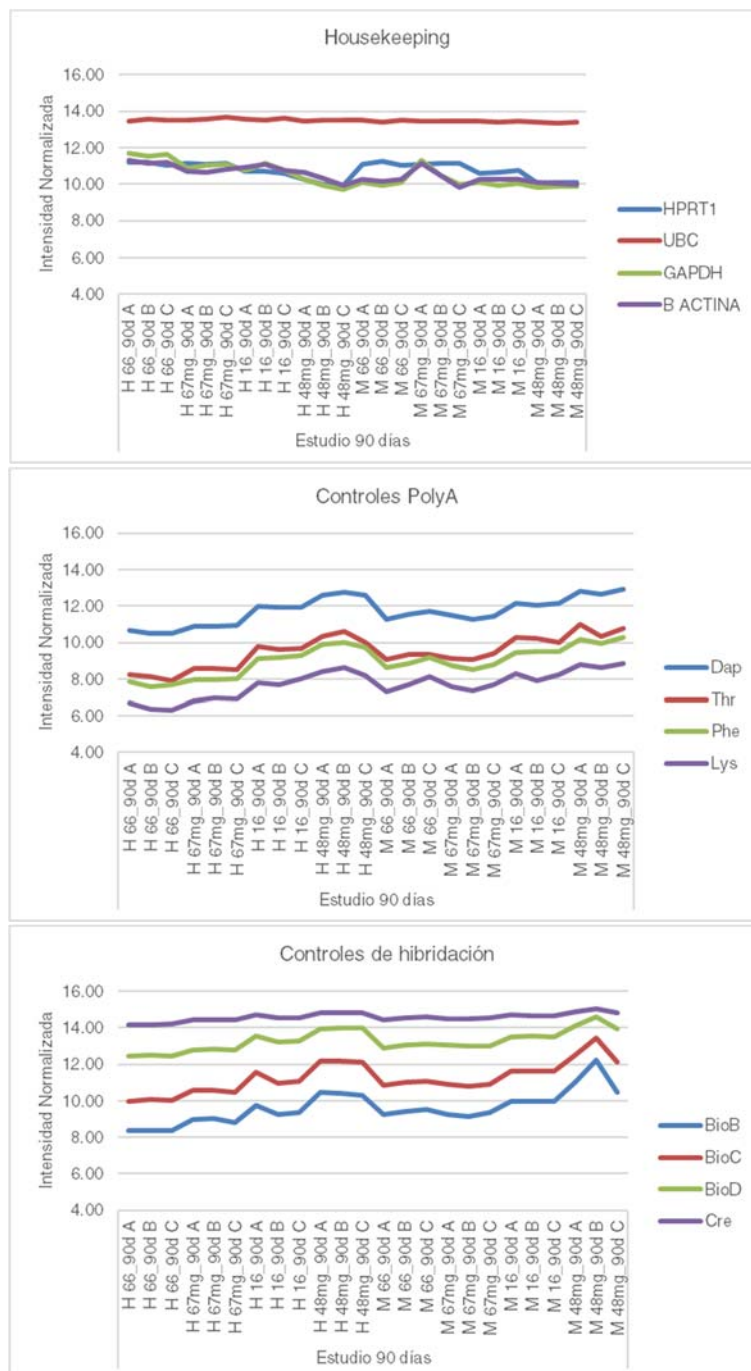
34	4604.2	4604.2	3865.6	3968.3	5580.7	4757.0	4518.8	3030.6	2417.0	1794.0	1573.2	-1.31	0.019
185	1555.3	1555.3	705.7	2185.6	1439.8	787.4	813.6	1805.3	1052.1	960.4	126.1	-1.31	0.011
781	398.7	398.7	660.8	782.2	592.0	649.4	631.3	464.1	436.3	318.7	141.2	-1.29	0.038
505	1061.7	1061.7	851.3	1050.9	1225.3	1162.2	766.1	727.5	284.3	241.0	518.5	-1.29	0.010
1226	531.4	531.4	401.7	720.1	338.5	504.4	445.6	197.7	504.4	182.4	181.8	-1.28	0.011
118	2807.0	2807.0	1473.7	1548.8	1703.0	2350.6	2137.3	1039.7	1852.8	1160.8	489.8	-1.27	0.017
442	448.4	448.4	546.8	362.3	406.5	509.0	268.9	242.1	312.2	158.4	169.4	-1.25	0.028
179	69.3	69.3	489.8	92.6	142.4	55.8	98.0	1267.6	63.0	135.8	92.8	-1.25	0.048
347	1507.5	1507.5	1292.0	1678.5	1136.5	1324.0	1028.6	904.8	1095.9	619.7	446.3	-1.24	0.020
971	319.1	319.1	535.5	247.6	638.8	533.2	405.1	324.5	650.0	287.4	90.2	-1.24	0.006
1301	348.7	348.7	365.3	614.5	504.7	617.9	477.0	756.5	400.7	248.9	174.4	-1.23	0.026
30	1687.5	1687.5	923.1	232.2	424.2	422.4	779.8	187.1	158.3	318.2	241.0	-1.23	0.014
337	407.3	407.3	483.9	67.2	516.9	470.5	630.6	811.8	183.8	147.4	246.3	-1.21	0.029
291	412.4	412.4	1204.8	1017.9	953.2	1181.3	773.6	660.8	975.2	371.2	389.6	-1.20	0.014
343	766.7	766.7	1119.5	1263.7	1185.6	953.8	1228.7	622.6	639.5	435.9	401.6	-1.20	0.005
67	211.8	211.8	128.7	103.6	252.0	49.2	1607.6	315.2	112.5	211.4	91.0	-1.20	0.018
627	830.0	830.0	478.9	708.3	139.6	463.8	408.8	349.3	494.5	219.2	195.8	-1.19	0.011
1341	70.0	70.0	204.1	248.7	67.2	200.8	92.0	108.1	103.4	78.3	40.0	-1.19	0.027
167	1886.0	1886.0	2018.9	2282.7	1457.2	1822.2	1087.1	1463.4	1613.5	860.2	699.6	-1.13	0.010
42	227.7	227.7	134.9	47.5	65.0	137.9	1242.0	240.2	168.2	95.1	157.2	-1.13	0.023
250	2190.1	2190.1	1467.2	1335.8	1804.0	1701.9	1180.5	1530.0	1370.0	1047.9	374.2	-1.12	0.046
1121	300.3	300.3	466.9	395.1	254.7	237.7	398.6	396.3	451.1	214.2	123.8	-1.11	0.020
385	776.6	776.6	608.3	933.5	768.1	592.8	1276.9	542.3	720.9	375.5	339.9	-1.11	0.014
56	2295.7	2295.7	1394.8	596.4	1176.1	874.0	1733.8	865.8	902.8	769.1	467.8	-1.10	0.004
482	1503.7	1503.7	1049.8	893.1	1610.2	1386.8	2056.7	1034.0	568.6	510.4	740.7	-1.08	0.048
227	1362.9	1362.9	1456.9	1408.3	1355.9	1385.3	793.5	1196.7	1293.9	470.9	765.5	-1.07	0.037
1177	571.0	571.0	410.0	936.6	636.8	728.0	950.0	648.2	678.6	365.8	277.5	-1.07	0.024
1146	987.4	987.4	773.8	929.3	1104.5	946.2	917.7	900.7	878.7	528.7	393.5	-1.07	0.038
124	1164.9	1164.9	1560.9	1409.4	1288.9	1387.2	1489.1	946.6	1059.8	625.0	599.5	-1.05	0.014
826	804.5	804.5	529.3	1250.8	758.1	898.8	865.1	900.2	983.3	486.9	378.2	-1.05	0.020
1052	650.8	650.8	531.1	415.1	851.7	448.2	442.3	546.5	301.7	248.8	298.6	-1.04	0.027
84	1027.5	1027.5	1432.2	1444.5	971.3	1366.1	1335.6	1200.6	1517.7	759.9	488.0	-1.04	0.002
380	337.0	337.0	878.9	237.3	250.2	870.8	451.9	277.9	397.2	258.6	186.9	-1.02	0.039
96	1412.7	1412.7	998.2	1477.4	364.6	1309.0	1121.5	879.6	1337.5	823.5	276.2	-1.01	0.004
935	325.4	325.4	679.2	102.5	395.6	520.5	195.8	397.8	321.9	893.6	633.8	1.01	0.027
70	1063.4	1063.4	1266.3	501.9	2038.6	1686.8	2298.8	760.7	2279.5	3460.5	2468.5	1.06	0.018
882	240.7	240.7	327.8	17.5	335.2	284.2	212.7	208.0	142.4	563.4	430.2	1.12	0.019
165	1511.8	1511.8	1596.2	1388.7	1643.6	942.9	1109.9	1984.0	1109.4	1799.6	4149.6	1.13	0.014
412	510.5	510.5	668.1	93.7	91.7	774.8	700.4	258.5	488.0	815.1	1069.0	1.13	0.003
890	418.4	418.4	290.7	362.8	324.1	372.0	524.7	799.9	524.3	662.4	1343.4	1.17	0.012
19	222.5	222.5	434.6	126.2	329.1	242.7	135.9	2580.9	2048.6	1998.9	1357.9	1.20	0.021
1046	402.8	402.8	261.7	415.0	319.3	398.5	597.4	908.2	475.2	730.9	1414.5	1.23	0.048

190	500.3	500.3	47.9	68.7	64.4	70.1	37.2	936.9	215.9	768.1	527.5	1.24	0.013
871	162.2	162.2	124.6	138.6	113.9	186.0	137.9	107.7	199.6	390.8	279.8	1.25	0.037
392	77.7	77.7	216.7	80.9	142.5	48.7	79.8	206.6	162.3	495.9	112.3	1.30	0.045
123	921.7	921.7	64.8	90.9	78.8	86.9	61.5	919.3	246.0	1222.2	745.6	1.31	0.027
891	531.5	531.5	258.8	388.6	403.2	187.1	392.4	332.3	842.3	922.3	1180.3	1.31	0.036
1218	121.0	121.0	348.5	94.5	126.0	80.2	76.6	197.1	127.3	436.3	321.8	1.33	0.032
256	760.2	760.2	436.4	347.0	463.1	790.5	626.8	241.3	634.9	1349.3	1332.9	1.34	0.018
650	122.5	122.5	491.0	303.1	144.3	317.5	362.9	734.9	643.6	1091.2	928.3	1.38	0.020
1386	161.4	161.4	101.9	150.4	147.9	78.1	157.1	304.7	278.2	480.1	411.3	1.40	0.029
883	161.1	161.1	238.1	168.0	201.8	162.3	228.7	218.8	345.1	627.3	520.1	1.46	0.009
160	519.4	519.4	207.9	202.6	198.9	329.5	237.2	225.5	354.8	789.7	934.7	1.62	0.017
676	351.2	351.2	88.3	86.3	109.4	86.2	71.0	345.2	153.3	719.7	476.0	1.70	0.036
1076	381.1	381.1	124.0	126.2	132.7	122.8	149.6	262.5	130.7	595.3	920.1	1.84	0.007
588	108.1	108.1	124.1	21.8	62.2	89.3	246.9	502.2	341.2	516.3	933.3	1.91	0.005
1364	35.9	35.9	45.2	48.8	28.1	37.0	40.5	359.0	94.6	471.6	264.0	2.09	0.036
281	143.8	143.8	278.6	92.8	167.1	163.9	294.3	313.1	266.5	770.1	1128.3	2.22	0.012
315	65.5	65.5	123.4	111.1	30.7	1.0	39.4	93.7	47.1	201.1	391.9	2.27	0.012
217	90.6	90.6	313.1	270.7	73.1	10.9	113.9	80.4	287.1	771.4	979.9	2.47	0.029
289	44.1	44.1	108.3	76.1	90.3	104.5	346.3	304.0	275.9	861.3	1156.6	2.53	0.032
885	71.0	71.0	69.1	84.7	58.4	126.3	87.8	190.7	41.0	506.0	575.4	2.59	0.002
992	159.3	159.3	202.5	328.5	253.5	250.3	294.9	252.9	371.5	1230.0	1948.0	2.59	0.022
215	41.8	41.8	25.6	40.8	64.5	8.8	5.2	39.2	85.3	589.0	789.0	4.19	0.017

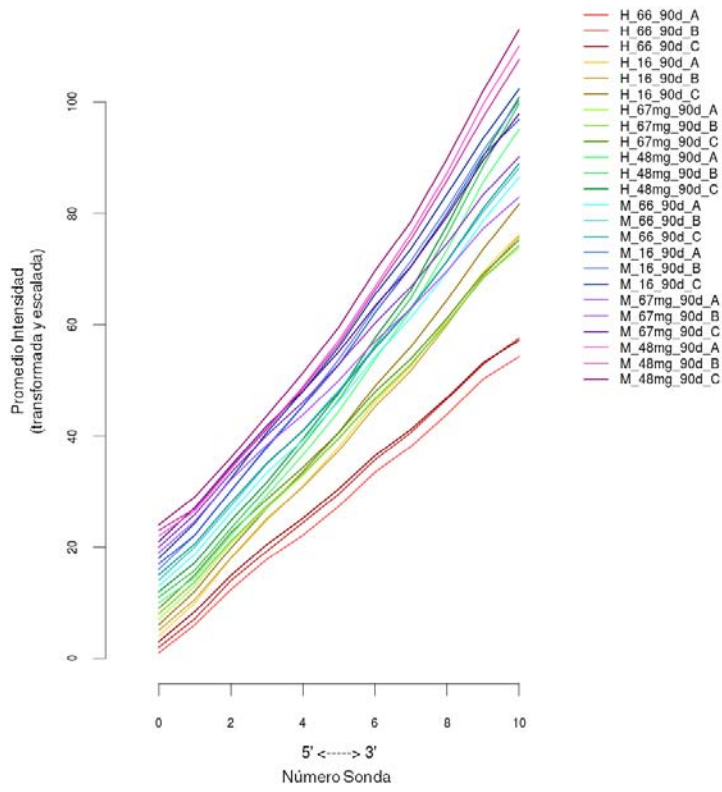
Anexo V: Test de calidad de los Genechip Rat Genome 230 2.0 de Affymetrix

(Valores normalizados por el método RMA)

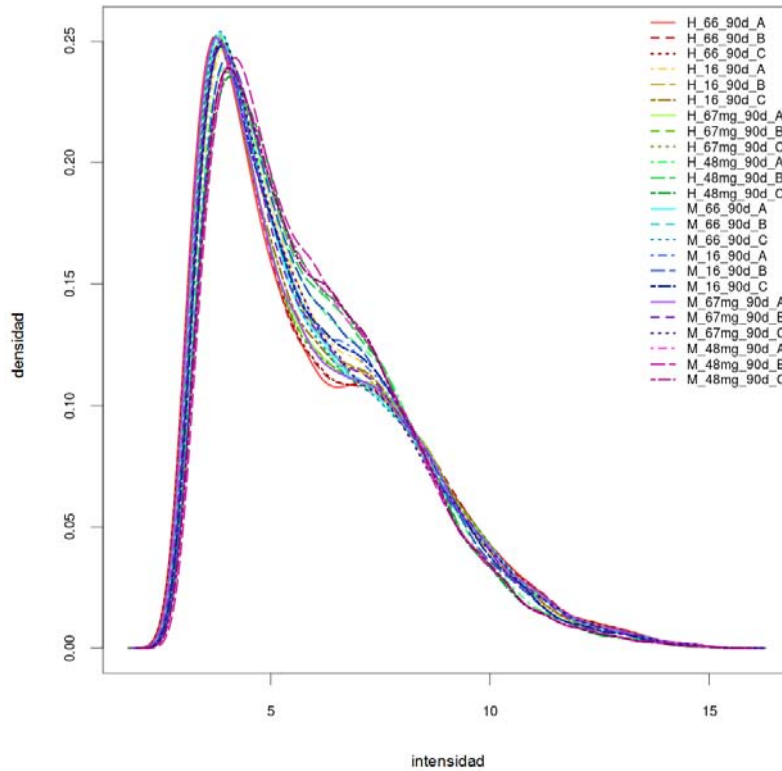
Ensayo 90 días - Genes Control



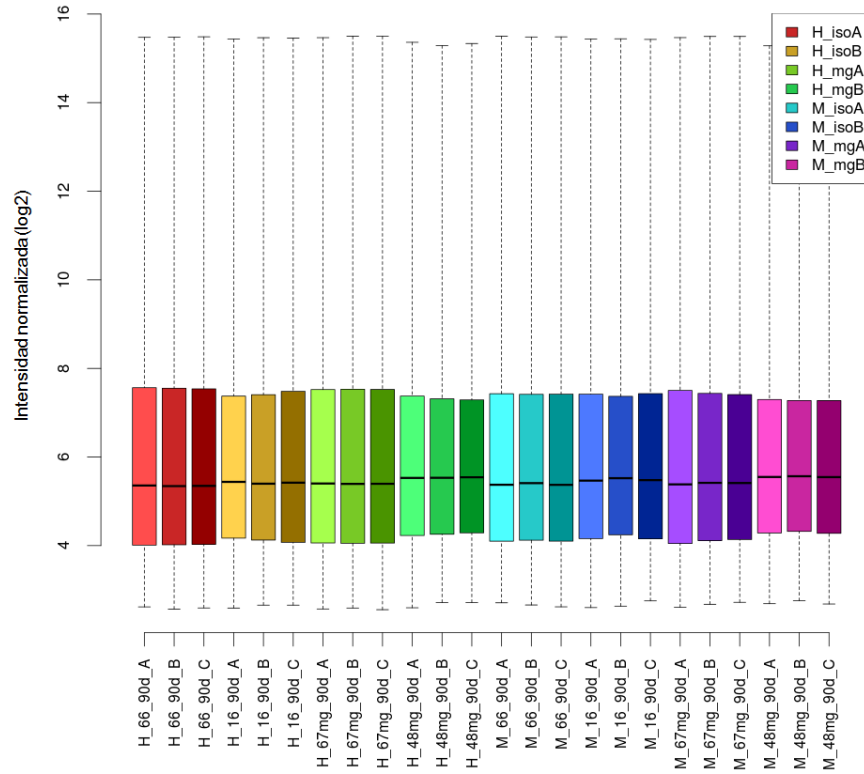
Ensayo 90 días – Degradación del RNA



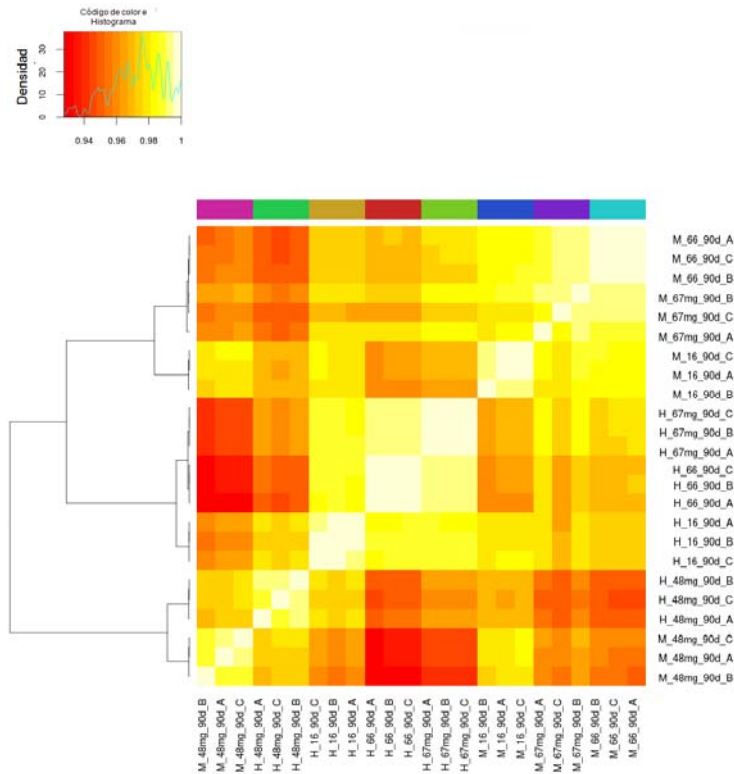
Ensayo 90 días – Histograma



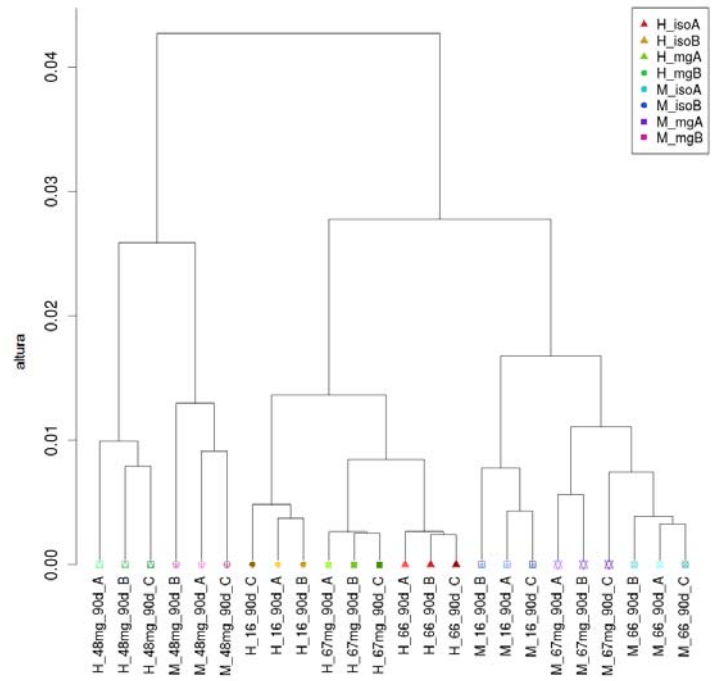
Ensayo 90 días - BoxPlot



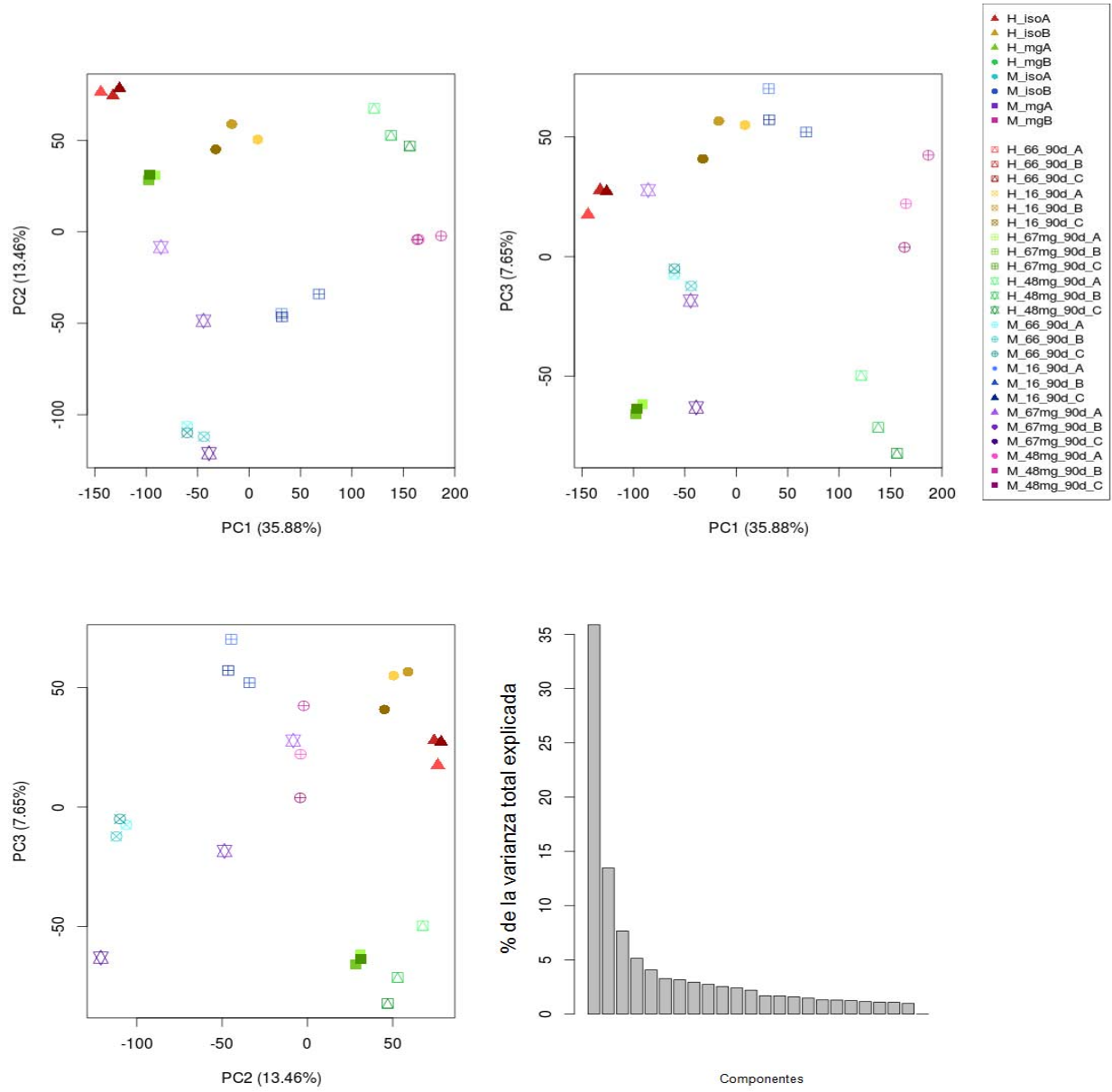
Ensayo 90 días - Matriz de correlación (distancia Pearson; método de clúster: UPGMA)



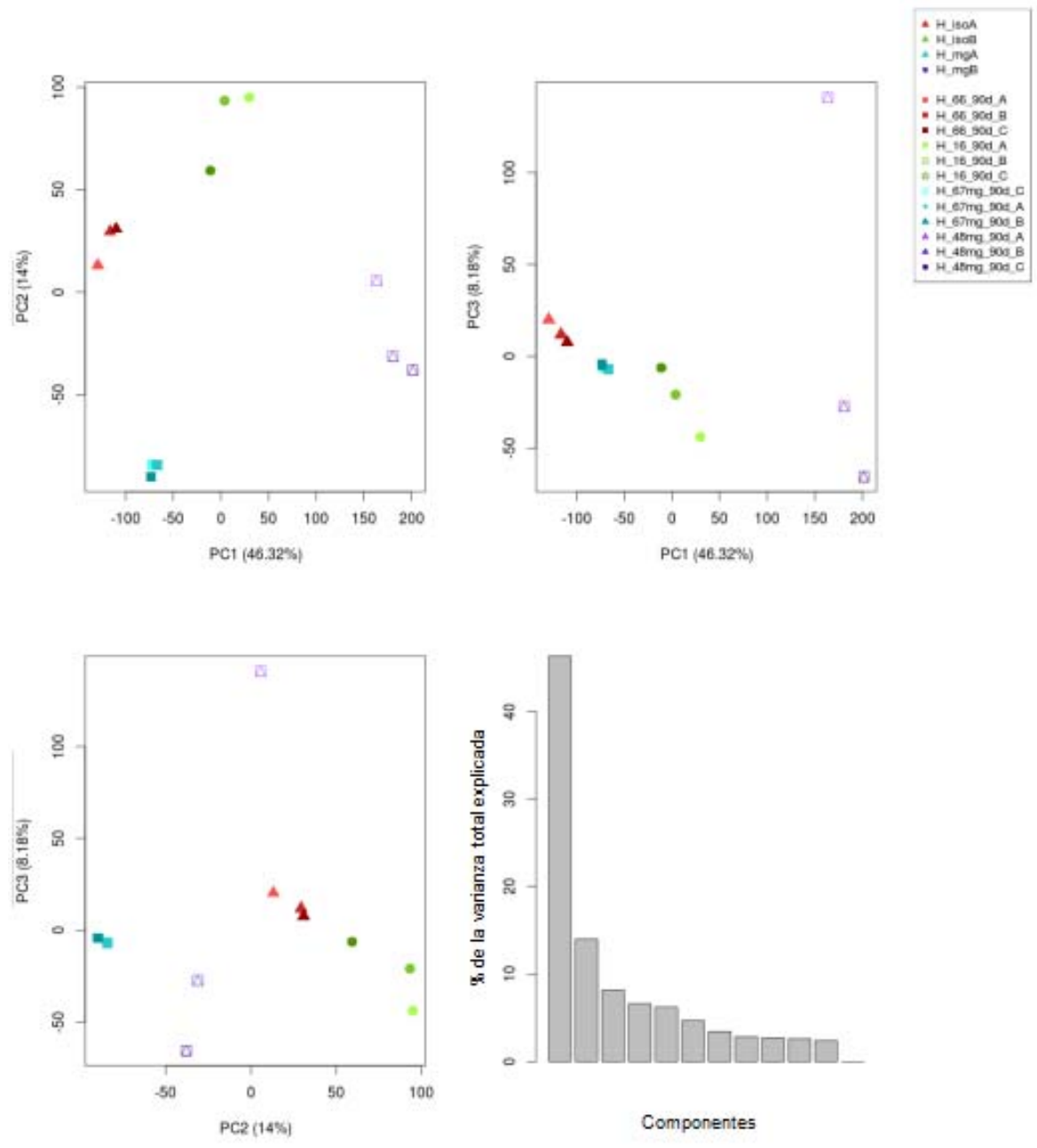
Ensayo 90 días - Dendrograma (distancia Pearson; método de clúster: UPGMA)



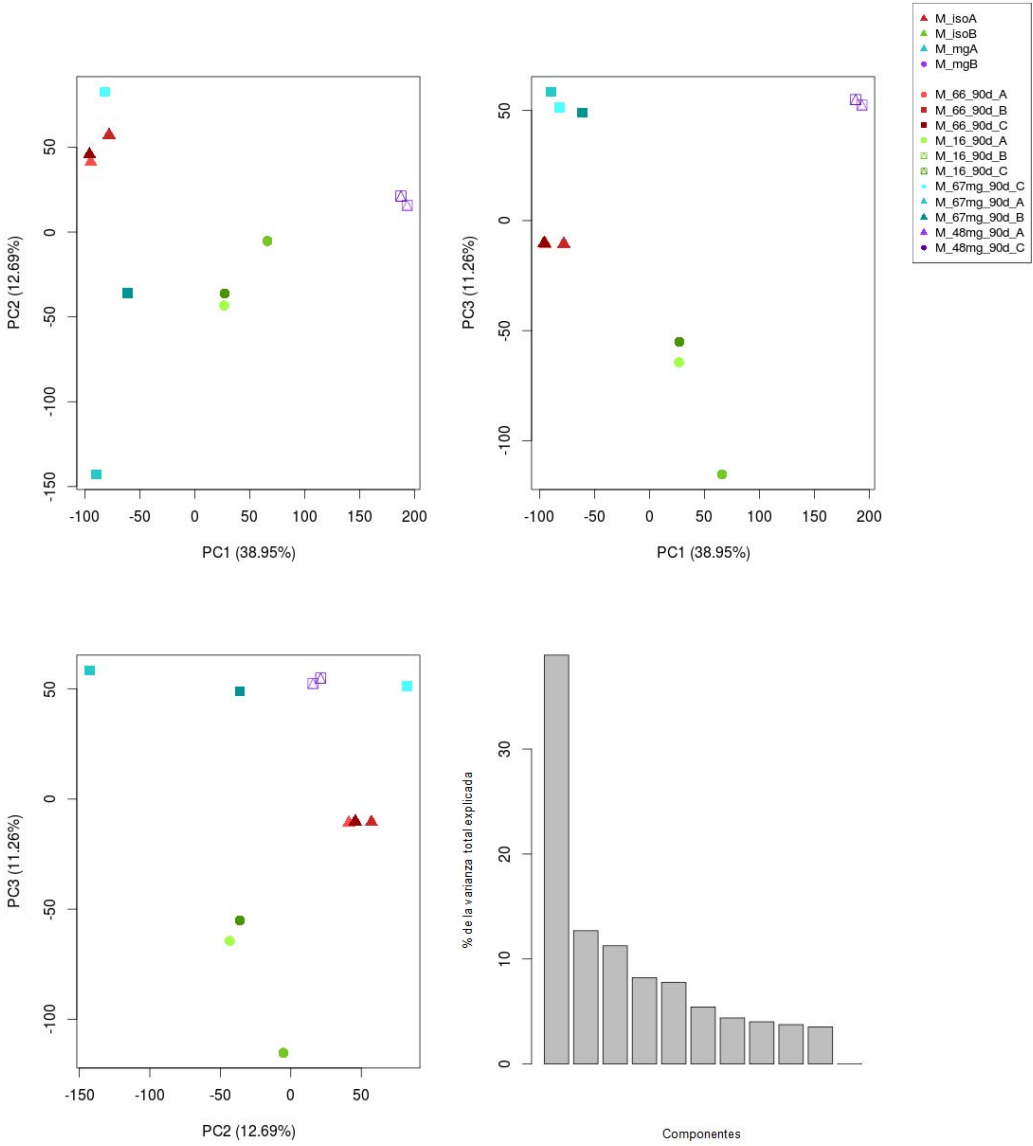
Ensayo 90 días - PCA



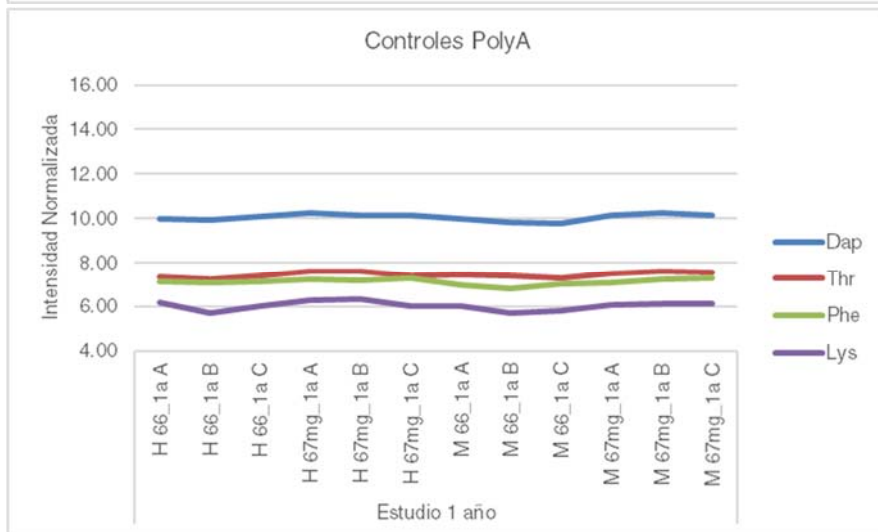
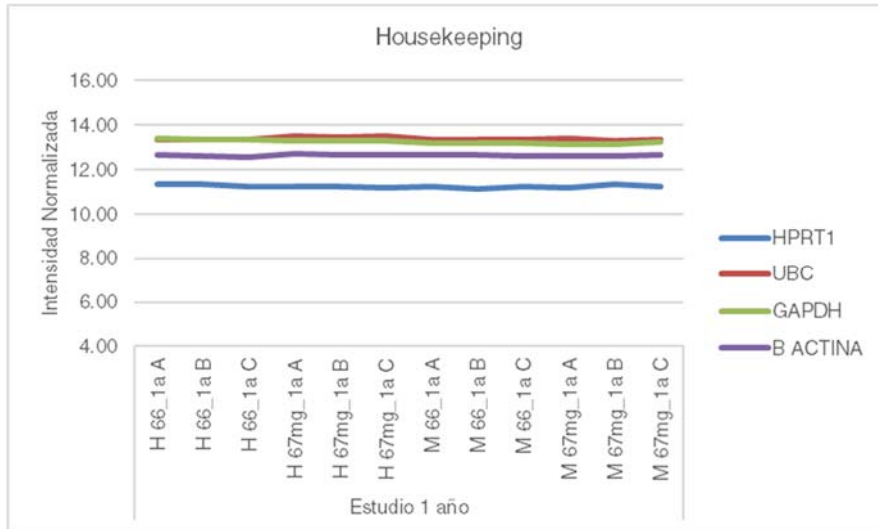
Ensayo 90 días, Hembras - PCA



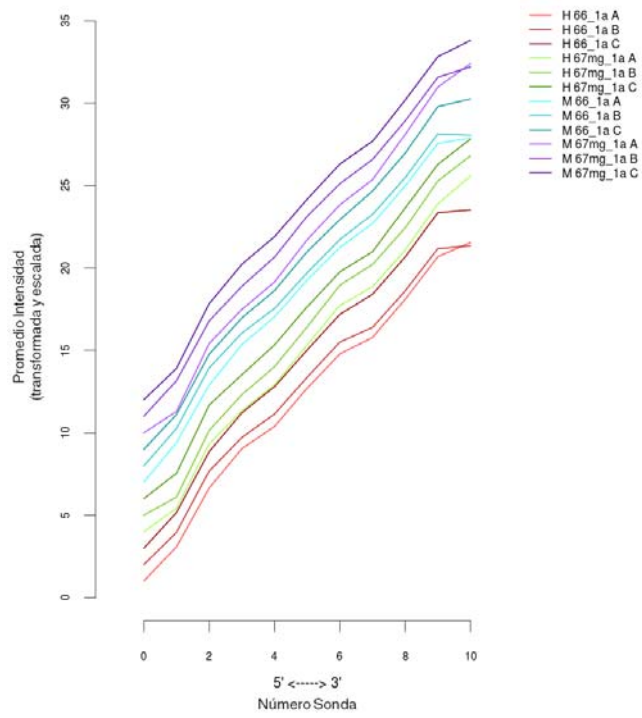
Ensayo 90 días, Machos - PCA



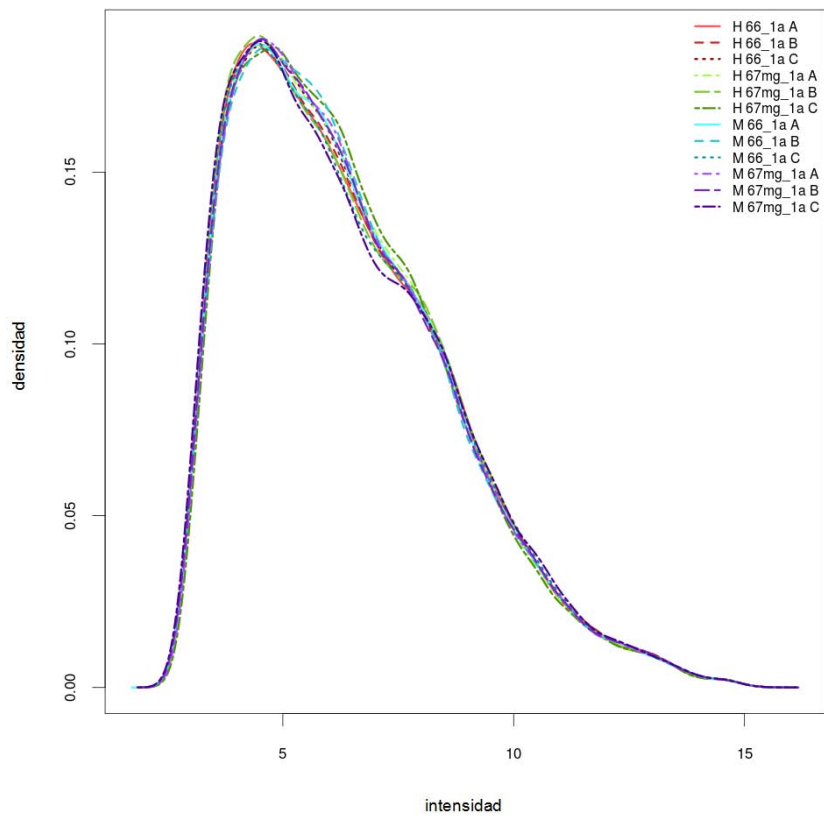
Ensayo 1 año - Genes Control



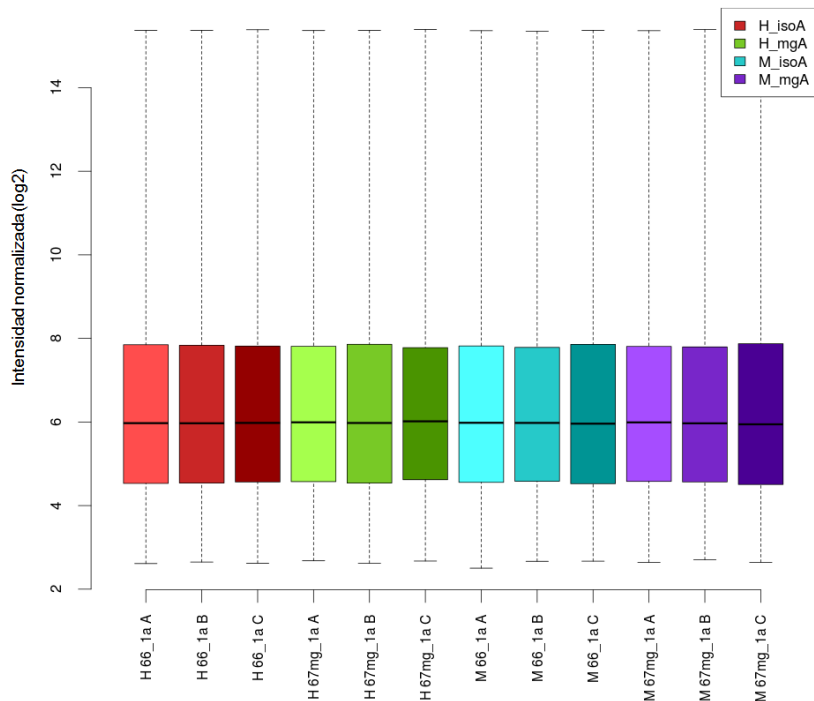
Ensayo 1 año – Degradación RNA



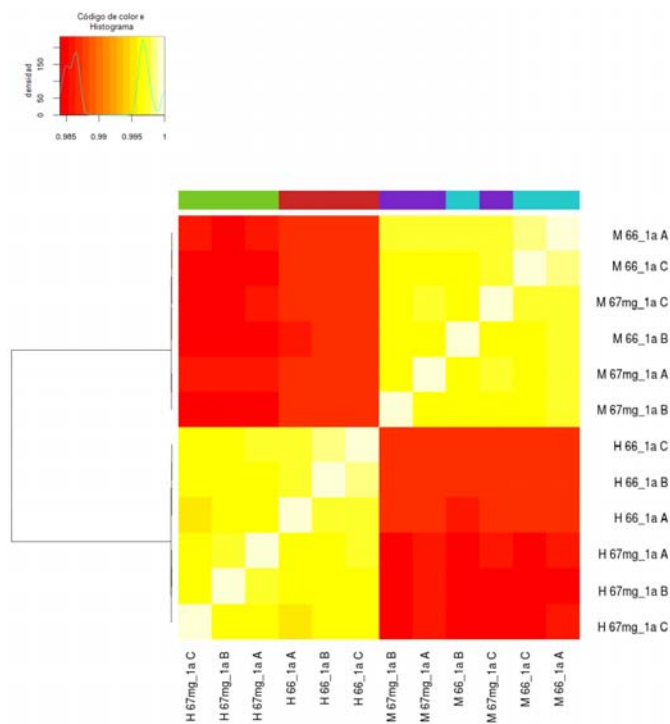
Ensayo 1 año - Histograma



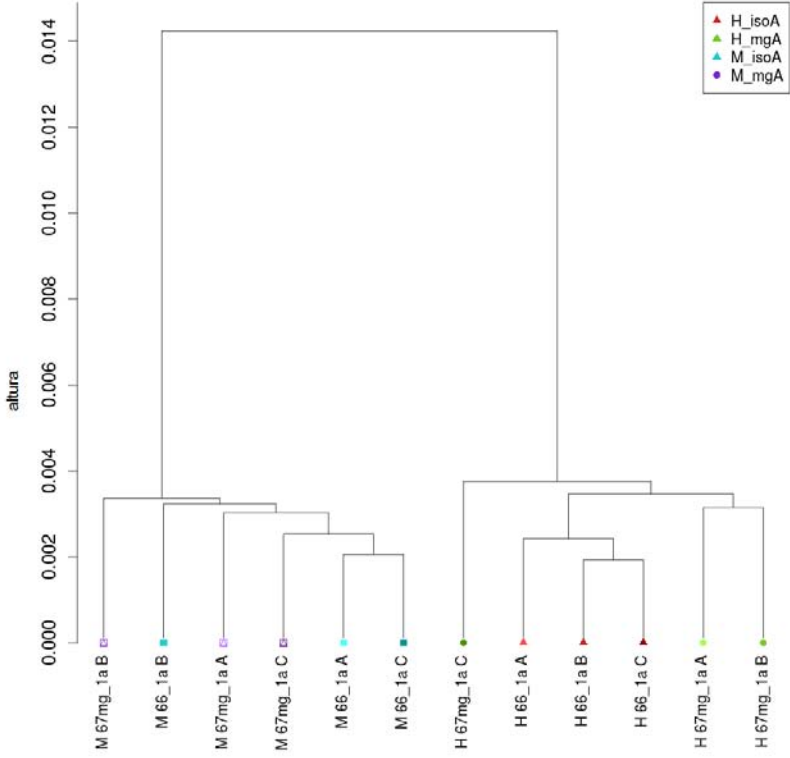
Ensayo 1 año - BoxPlot



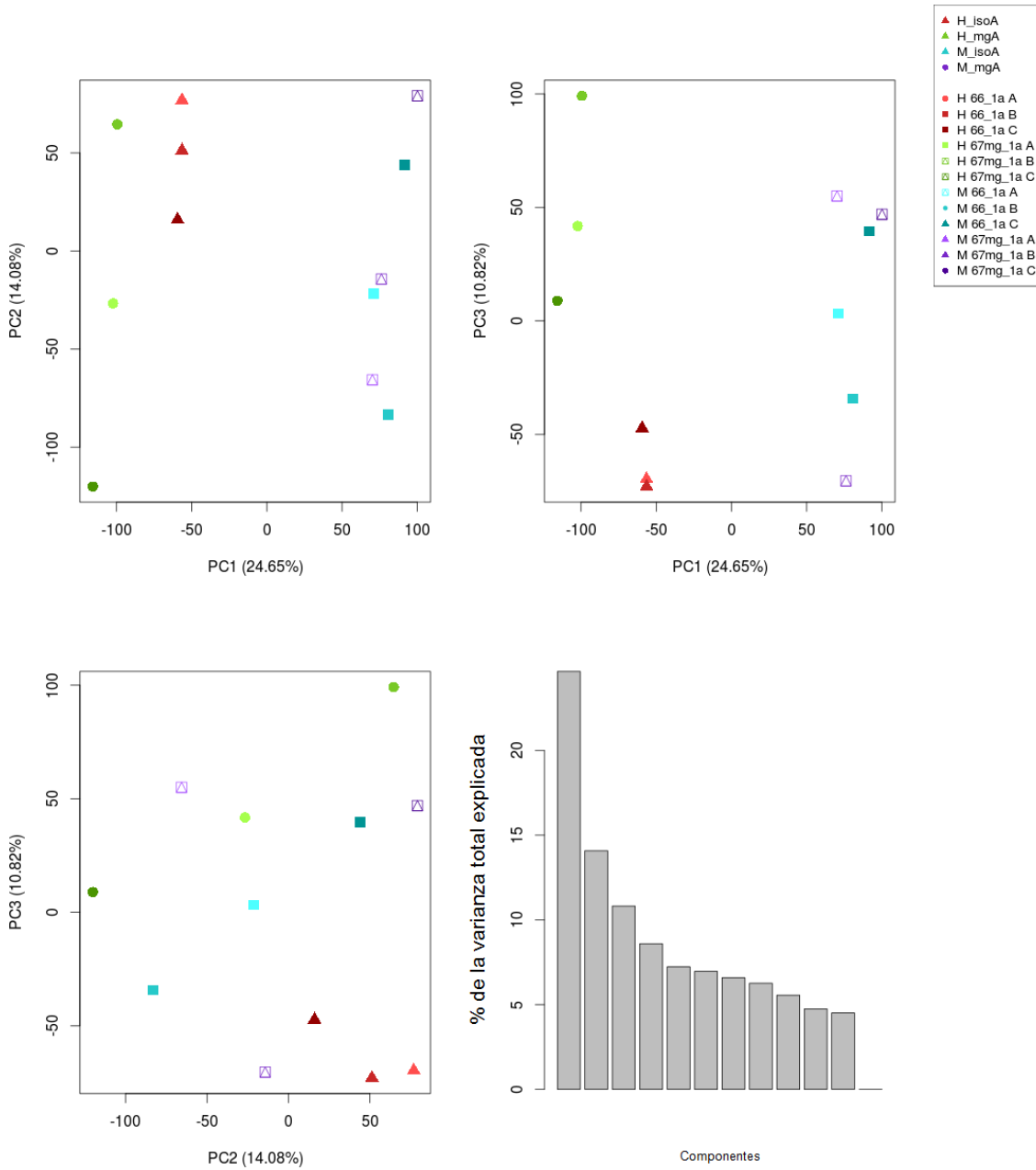
Ensayo 1 año - Matriz de correlación (distancia Pearson; método de clúster: UPGMA)



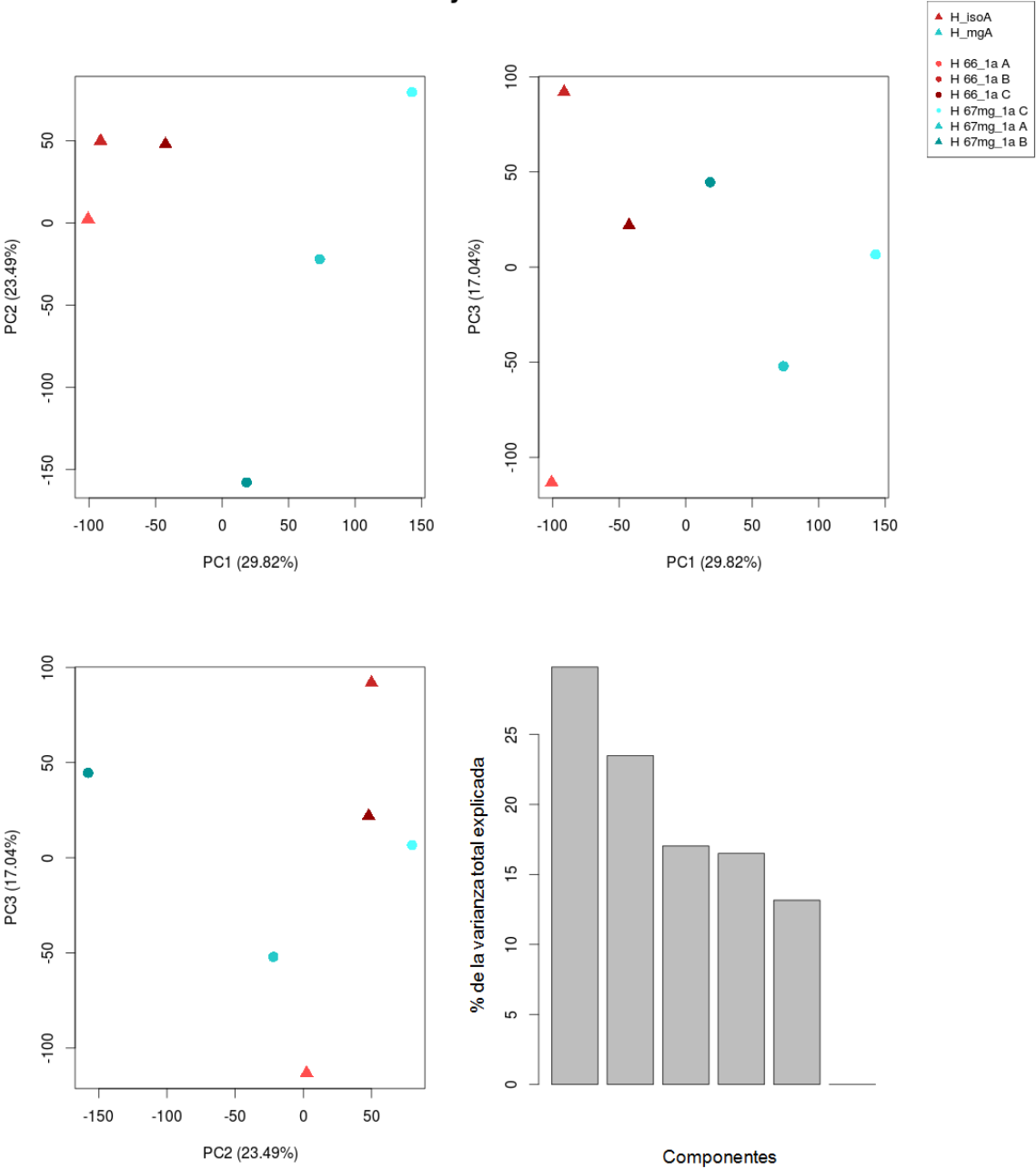
Ensayo 1 año - Dendrograma (distancia Pearson; método de clúster: UPGMA)



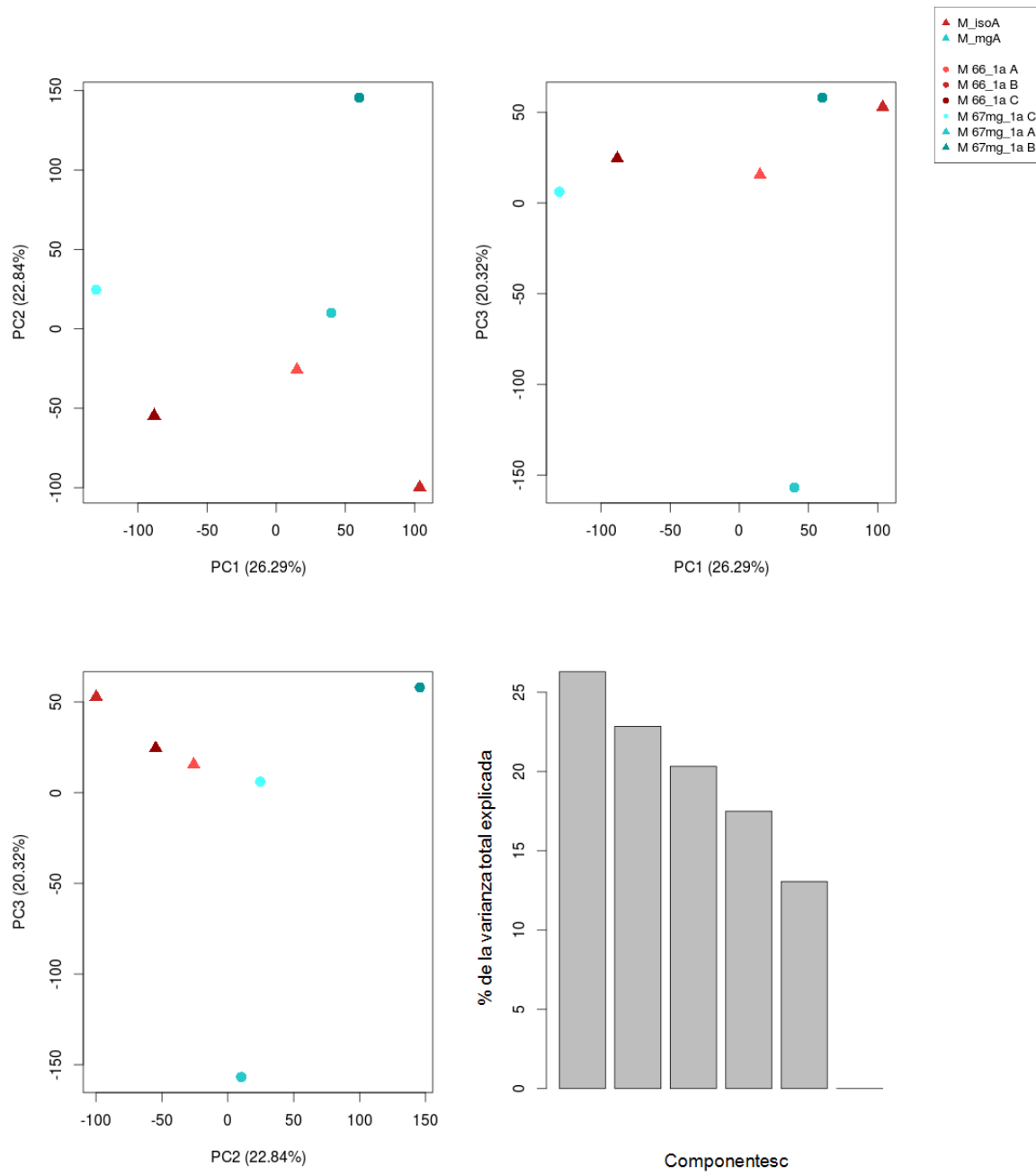
Ensayo 1 año - PCA



Ensayo 1 año, Hembras - PCA



Ensayo 1 año, Machos - PCA



Anexo VI: Genes diferenciales en los transcriptomas de hígado de rata correspondientes a los grupos con dietas 33% MON810 respecto a 33% *near-isogenic*.

Genes diferenciales en las hembras 67mg_90d del estudio A de toxicidad aguda de 90 días (se ordenan según la tasa de cambio, FC).

Transcript ID	FC	FDR	Gene Symbol	Description
1387874_at	-16.34	0.002188	Dbp	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein
1387156_at	-14.29	0.00121	Hsd17b2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
1370816_at	-13.17	0.003526	Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
1368458_at	-4.03	0.002227	Cyp7a1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1
1369864_a_at	-3.74	0.004306	Sds	serine dehydratase
1390430_at	-3.39	0.002935	Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1387669_a_at	-3.26	0.002531	Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)
1370541_at	-3.25	0.003924	Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1368511_at	-2.98	0.000276	Bhlhe41	basic helix-loop-helix family, member e41
1397245_at	-2.74	0.008878	Rad23a	RAD23 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
1387852_at	-2.69	0.003924	Thrsp	thyroid hormone responsive
1367633_at	-2.67	0.007904	Glul	glutamate-ammonia ligase
1369657_at	-2.66	0.004306	Cpa1	carboxypeptidase A1 (pancreatic)
1383472_at	-2.54	0.003526	Aldh1b1	aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1
1377900_at	-2.53	0.009253	Abhd14b	abhydrolase domain containing 14b
1369922_at	-2.5	0.010929	Plbd2	phospholipase B domain containing 2
1384639_at	-2.47	0.030868	Reep6	receptor accessory protein 6
1395719_at	-2.42	0.008408	Tufm	Tu translation elongation factor, mitochondrial
1384243_at	-2.4	0.011632	Spsb4	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 4
1368814_at	-2.37	0.014785	Aldh6a1	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1
1387521_at	-2.36	0.010115	Pdcd4	programmed cell death 4
1389573_at	-2.33	0.005231	Chac1	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (<i>E. coli</i>)
1370150_a_at	-2.32	0.015586	Thrsp	thyroid hormone responsive
1374251_at	-2.31	0.008871	Kcnj15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15
1374625_at	-2.3	0.003082	Hes6	hes family bHLH transcription factor 6
1368916_at	-2.29	0.003288	Asl	argininosuccinate lyase
1381396_s_at	-2.26	0.027806	Klf15	Kruppel-like factor 15
1381030_at	-2.26	0.016156	Slu7	SLU7 splicing factor homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
1370181_at	-2.24	0.032222	Rab4a	RAB4A, member RAS oncogene family
1387573_a_at	-2.24	0.012184	Nr5a2	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2
1395346_at	-2.23	0.011269	Aamp	angio-associated, migratory cell protein
1370372_at	-2.23	0.004306	Rasd2	RASD family, member 2
1384381_at	-2.21	0.020954	Abca1	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 1
1395274_at	-2.2	0.037442	Dst	dystonin

1388229_a_at	-2.19	0.005105	Mug1	murinoglobulin-1-like; murinoglobulin-2-like; murinoglobulin 1
1383037_at	-2.18	0.021768	Poldip2	polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2
1375560_at	-2.17	0.006963	Hoga1	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1
1370851_a_at	-2.17	0.006688	Kalm	kalirin, RhoGEF kinase
1369275_s_at	-2.16	0.008961	Cyp2a1; Cyp2a2	cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 1; polypeptide 2
1378745_at	-2.16	0.008412	Per3	period circadian clock 3
1382809_at	-2.15	0.010018	Perbp	cold inducible RNA binding protein
1396167_at	-2.15	0.013342	Acp6	acid phosphatase 6, lysophosphatidic
1377869_at	-2.15	0.009318	Ccrn4l	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae)
1369790_at	-2.13	0.003924	Tat	tyrosine aminotransferase
1387053_at	-2.12	0.00889	Fmo1	flavin containing monooxygenase 1
1395411_at	-2.12	0.02335	Naprt1	nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1
1369941_at	-2.12	0.005547	Dap	death-associated protein
1370950_at	-2.11	0.003642	Ppap2b	phosphatidic acid phosphatase type 2B
1389694_at	-2.11	0.003337	Ky	kyphoscoliosis peptidase
1374903_at	-2.09	0.00504	Gcnt2	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme
1372841_at	-2.09	0.003523	Reep6	receptor accessory protein 6
1368121_at	-2.08	0.00597	Akr7a3	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)
1382266_at	-2.08	0.009779	Gpr146	G protein-coupled receptor 146
1380854_at	-2.08	0.004234	Vegfb	vascular endothelial growth factor B
1370952_at	-2.07	0.004616	Gstm2	glutathione S-transferase mu 2
1368213_at	-2.07	0.013077	Por	P450 (cytochrome) oxidoreductase
1390480_at	-2.07	0.016597	Kif13a	kinesin family member 13A
1370020_at	-2.06	0.005427	Slc25a10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10
1390880_at	-2.06	0.017563	Eif3l	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L
1378860_at	-2.06	0.007329	Dpy19l3	dpy-19-like 3 (C. elegans)
1368621_at	-2.06	0.004306	Aqp9	aquaporin 9
1398273_at	-2.05	0.017504	Efna1	ephrin A1
1367855_at	-2.03	0.004196	Scarb1	scavenger receptor class B, member 1
1379238_at	-2.03	0.019643	Ctdspl	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like
1380865_at	-2.03	0.00725		
1370583_s_at	-2.02	0.014282	Abcb1a; Abcb1b	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A; member 1B
1386985_at	-2.02	0.002227	Gstm1	glutathione S-transferase mu 1
1382280_at	-2.02	0.019171	Uqcrc2	ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2
1387295_at	-2.02	0.010466	Slc6a12	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 12
1375423_at	-2.01	0.00724	LOC689959	hypothetical protein LOC689959
1374027_at	2.01	0.01314	Zfp187	zinc finger protein 187
1384071_at	2.01	0.006843		
1369072_at	2.02	0.006989	Adh7	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide
1383002_at	2.02	0.028822	Phf20l1	PHD finger protein 20-like 1
1373053_at	2.02	0.010671		
1384882_at	2.03	0.029286	Hectd2	HECT domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2

1385098_at	2.03	0.00862		
1372760_at	2.03	0.019143	LOC100912411	uncharacterized LOC100912411
1395207_at	2.03	0.020204		
1384254_at	2.04	0.002531	Otud1	OTU deubiquitinase 1
1372823_at	2.04	0.033295	Hnrnpu	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
1377037_at	2.04	0.002324	Acot4	acyl-CoA thioesterase 4
1368247_at	2.04	0.003526	Hspa1a; Hspa1b	heat shock 70kD protein 1A; heat shock 70kD protein 1B (mapped)
1391006_at	2.05	0.01438		
1388395_at	2.07	0.002666	G0s2	G0/G1switch 2
1372928_at	2.07	0.013091	LOC100911652	uncharacterized LOC100911652
1377064_at	2.08	0.001982	Dusp6	dual specificity phosphatase 6
1371595_at	2.08	0.006827	LOC100912446	uncharacterized LOC100912446
1383913_at	2.08	0.022893	LOC100911719	uncharacterized LOC100911719
1377192_a_at	2.09	0.003924	Clpx	caseinolytic mitochondrial matrix peptidase chaperone subunit
1397779_at	2.09	0.009304		
1375388_at	2.1	0.02962		
1390145_at	2.1	0.035102		
1375951_at	2.11	0.0097	Thbd	thrombomodulin
1380763_at	2.11	0.009883	Strbp	spermatid perinuclear RNA binding protein
1391770_at	2.11	0.016426		
1383129_at	2.12	0.012983		
1390699_at	2.13	0.007329	RGD1311595	similar to KIAA2026 protein
1398597_at	2.13	0.007908	Rnf144a	ring finger protein 144A
1398595_at	2.13	0.01645		
1393086_at	2.14	0.009318	Uba6	ubiquitin-like modifier activating enzyme 6
1393159_at	2.16	0.013891		
1385533_at	2.17	0.020257	Prpf4b	pre-mRNA processing factor 4B
1373210_at	2.18	0.006587	Lamb1	laminin, beta 1
1397676_at	2.18	0.00724		
1388758_at	2.2	0.017428	Ogt	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase
1379815_at	2.2	0.005052		
1392846_at	2.22	0.008951		
1390801_at	2.23	0.002555	Tmem252	transmembrane protein 252
1387643_at	2.24	0.006496	Fgf21	fibroblast growth factor 21
1393766_at	2.24	0.003526		
1375823_at	2.26	0.009289		
1383629_a_at	2.27	0.005734	Rnpc3	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 3
1390628_at	2.27	0.005052		
1378998_at	2.27	0.005734		
1384815_at	2.27	0.006688		
1393135_at	2.29	0.035816		
1379834_at	2.3	0.009546		

1398698_at	2.3	0.015397		
1384146_at	2.32	0.004478		
1378595_at	2.32	0.009302	LOC100912093	uncharacterized LOC100912093
1378074_at	2.33	0.0025	Pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
1393075_at	2.33	0.018277		
1377950_at	2.34	0.003924	LOC100910934	interferon-inducible GTPase 1-like; similar to interferon-inducible GTPase
1398691_at	2.34	0.003337		
1395776_at	2.34	0.015405		
1378347_at	2.35	0.018576		
1380807_at	2.36	0.011053		
1384392_at	2.37	0.011787	Cyp26b1	cytochrome P450, family 26, subfamily b, polypeptide 1
1389199_at	2.37	0.006568	RGD1309079	similar to Ab2-095
1395221_at	2.38	0.033582		
1385164_at	2.39	0.005734		
1398440_at	2.4	0.010476	Pnir	PNN-interacting serine/arginine-rich protein
1380769_at	2.4	0.00725		
1372868_at	2.48	0.003924	Tor3a	torsin family 3, member A
1393051_at	2.53	0.020595	Armxc1	armadillo repeat containing, X-linked 1
1394756_at	2.54	0.003924	Rbm26	RNA binding motif protein 26
1381732_at	2.54	0.009289		
1381714_at	2.56	0.019584		
1377133_at	2.64	0.008569	LOC100912622	uncharacterized LOC100912622
1381556_at	2.66	0.00724	Ddx60	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60
1383486_at	2.68	0.006671	Inhba	inhibin beta-A
1374142_at	2.68	0.007995	Prr15	proline rich 15
1388924_at	2.7	0.002022	Angptl4	angiopoietin-like 4
1383439_at	2.71	0.00519	Npas2	neuronal PAS domain protein 2
1394729_at	2.71	0.010402		
1373718_at	2.72	0.005231	Tubb2a	tubulin, beta 2A class IIa
1396225_at	2.72	0.009883		
1397624_at	2.75	0.0025		
1373777_at	2.79	0.003082	Rgs16	regulator of G-protein signaling 16
1376867_at	2.85	0.010152	Lgalsl	lectin, galactoside-binding-like
1376744_at	2.85	0.012486		
1395896_at	2.86	0.00464	Zfp295	zinc finger protein 295
1387312_a_at	2.87	0.007513	Gck	glucokinase
1388674_at	2.87	0.00121	Cdkn1a	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
1380464_at	2.96	0.010421		
1370510_a_at	3.02	0.002632	Arntl	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
1368692_a_at	3.25	0.002647	Chka	choline kinase alpha
1393852_at	3.3	0.010476	Vps37b	vacuolar protein sorting 37 homolog B (S. cerevisiae)
1380669_at	3.38	0.005105		

1398566_at	3.38	0.012072		
1373515_at	3.48	0.002754	Lgalsl	lectin, galactoside-binding-like
1392640_at	4.46	0.004992	Cry1	cryptochrome circadian clock 1
1398250_at	4.67	0.008289	Acot1	acyl-CoA thioesterase 1

Genes diferenciales en las hembras 48mg_90d del estudio B de toxicidad aguda de 90 días (se ordenan según la tasa de cambio, FC).

Transcript ID	FC	FDR	Gene Symbol	Description
1387156_at	-44.24	0.004045	Hsd17b2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
1387874_at	-16.43	0.004045	Dbp	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein
1370816_at	-9.05	0.002702	Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
1371098_a_at	-6.02	0.022549	Masp2	mannan-binding lectin serine peptidase 2
1368621_at	-5.99	0.003624	Aqp9	aquaporin 9
1385707_at	-5.56	0.005276	Lect2	leukocyte cell-derived chemotaxin 2
1390430_at	-5.23	0.002388	Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1387669_a_at	-5.19	0.00798	Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)
1368458_at	-5.19	0.002702	Cyp7a1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1
1370950_at	-5.19	0.019253	Ppap2b	phosphatidic acid phosphatase type 2B
1367904_at	-4.94	0.004392	Resp18	regulated endocrine-specific protein 18
1373512_at	-4.9	0.007725	Ilvbl	ilvB (bacterial acetolactate synthase)-like
1370541_at	-4.75	0.004124	Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1384126_a_at	-4.64	0.005493	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
1378745_at	-4.64	0.019049	Per3	period circadian clock 3
1368435_at	-4.6	0.004837	Cyp8b1	cytochrome P450, family 8, subfamily b, polypeptide 1
1398307_at	-4.58	0.0116	Cyp3a18	cytochrome P450, family 3, subfamily a, polypeptide 18
1369581_at	-4.55	0.004289	Pemt	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
1368121_at	-4.54	0.009796	Akr7a3	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)
1380447_a_at	-4.45	0.026461	Mrps18c	mitochondrial ribosomal protein S18C
1368943_at	-4.31	0.009705	Rnase4	ribonuclease, RNase A family 4
1372841_at	-4.2	0.013944	Reep6	receptor accessory protein 6
1368224_at	-4.18	0.004216	Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N
1383242_a_at	-4.13	0.007994	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
1387759_s_at	-4.06	0.01937	Ugt1a1 - Ugt1a9	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1; A2; A3; A5; A6; A7C; A8; A9
1377933_at	-4.02	0.03318	Slc39a3	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 3
1369837_at	-4	0.007756	Gulo	gulonolactone (L-) oxidase
1371147_at	-4	0.004567	Serpina3m	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3M
1368316_at	-3.9	0.003461	Aqp8	aquaporin 8
1373890_at	-3.87	0.011256	Chchd5	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 5
1388300_at	-3.86	0.005109	Mgst3	microsomal glutathione S-transferase 3
1368731_at	-3.85	0.003826	Orm1	orosomucoid 1
1369693_a_at	-3.82	0.008475	Slc1a2	solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2
1378075_at	-3.82	0.01506	Tm9sf4	transmembrane 9 superfamily protein member 4

1393061_at	-3.8	0.009295	Ttc36	tetratricopeptide repeat domain 36
1377869_at	-3.8	0.005748	Ccrn4l	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (<i>S. cerevisiae</i>)
1375345_at	-3.79	0.006157	Cnpy2	canopy FGF signaling regulator 2
1369864_a_at	-3.78	0.012315	Sds	serine dehydratase
1370359_at	-3.76	0.005203	Amy1a	amylase, alpha 1A (salivary)
1387053_at	-3.76	0.002702	Fmo1	flavin containing monooxygenase 1
1386280_at	-3.76	0.007357	Mettl7b	methyltransferase like 7B
1372254_at	-3.75	0.002658	Serp1g1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1
1367550_a_at	-3.75	0.026367	Tm2d1	TM2 domain containing 1
1374876_at	-3.73	0.004488	Leprotl1	leptin receptor overlapping transcript-like 1
1374303_at	-3.69	0.00713	Alkbh2	alkB, alkylation repair homolog 2 (<i>E. coli</i>)
1386538_at	-3.67	0.035133	RGD1310495	similar to KIAA1919 protein
1387259_at	-3.67	0.007248	Cdh2	cadherin 2
1385839_x_at	-3.64	0.03771	Tm2d1	TM2 domain containing 1
1370007_at	-3.63	0.010831	Pdia4	protein disulfide isomerase family A, member 4
1391538_at	-3.63	0.021425	Cideb	cell death-inducing DFFA-like effector b
1368863_at	-3.6	0.00814	Nme3	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 3
1387145_at	-3.59	0.011735	Gjb1	gap junction protein, beta 1
1387816_at	-3.58	0.011802	Igfals	insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit
1374558_at	-3.58	0.006484	Icoslg	inducible T-cell co-stimulator ligand
1387221_at	-3.55	0.008225	Gch1	GTP cyclohydrolase 1
1370806_at	-3.52	0.005305	Retsat	retinol saturase (all trans retinol 13,14 reductase)
1370821_at	-3.52	0.011175	Tpmt	thiopurine S-methyltransferase
1368428_at	-3.52	0.00442	Xpnpep2	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 2, membrane-bound
1369225_at	-3.49	0.005957	Kng2	kininogen 2
1387017_at	-3.49	0.005823	Sqle	squalene epoxidase
1368520_at	-3.48	0.005305	Apoa4	apolipoprotein A-IV
1388316_at	-3.47	0.004362	RGD1566320	RGD1566320
1367765_at	-3.42	0.016199	Tcn2	transcobalamin 2
1367784_a_at	-3.42	0.015947	Clu	clusterin
1368490_at	-3.41	0.002702	Cd14	CD14 molecule
1370134_at	-3.41	0.002702	Slc33a1	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1
1368360_at	-3.38	0.007519	Plg	plasminogen
1372599_at	-3.37	0.00442	Mgst2	microsomal glutathione S-transferase 2
1385374_at	-3.37	0.019824	Tef	thyrotrophic embryonic factor
1376733_at	-3.37	0.012474	Igsf11	immunoglobulin superfamily, member 11
1367927_at	-3.36	0.01143	Phb	similar to prohibitin; prohibitin
1369664_at	-3.35	0.027034	Avpr1a	arginine vasopressin receptor 1A
1387852_at	-3.34	0.008225	Thrsp	thyroid hormone responsive
1368400_at	-3.33	0.012506	Timm8a1	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A1 (yeast)
1370583_s_at	-3.32	0.006813	Abcb1a; Abcb1b	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A; member 1B
1370952_at	-3.32	0.016877	Gstm2	glutathione S-transferase mu 2

1371400_at	-3.32	0.002702	Thrsp	thyroid hormone responsive
1379437_at	-3.31	0.014514		
1387511_at	-3.3	0.005231	Cyp2a1	cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 1
1373676_at	-3.3	0.015381		
1370428_x_at	-3.29	0.00951	RT1-A2;RT1-EC2	RT1 class Ia, locus A2; RT1 class I, locus A3; RT1 class Ib, locus EC2
1388103_at	-3.29	0.00284	Tmem37	transmembrane protein 37
1385838_a_at	-3.28	0.022724	Tm2d1	TM2 domain containing 1
1394304_at	-3.28	0.006138		
1390455_at	-3.27	0.002702	Abhd2	abhydrolase domain containing 2
1374625_at	-3.27	0.00379	Hes6	hes family bHLH transcription factor 6
1374254_a_at	-3.26	0.006418	Tmem205	transmembrane protein 205
1369963_at	-3.25	0.040992	Pafah1b3	platelet-activating factor acetylhydrolase 1b, catalytic subunit 3
1387891_at	-3.25	0.009235	Prdx4	peroxiredoxin 4
1370433_at	-3.24	0.008836	Hsd3b7	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7
1375669_at	-3.24	0.011125	Fkbp2	FK506 binding protein 2
1383852_at	-3.24	0.014023		
1371016_at	-3.21	0.046807	LOC290071	similar to RIKEN cDNA A430107P09 gene
1389140_at	-3.2	0.001953	Spcs2	signal peptidase complex subunit 2 homolog (S. cerevisiae)
1374393_at	-3.19	0.008225	Ptplb	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member b
1372613_at	-3.17	0.006721	Bdh2	3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 2
1387396_at	-3.17	0.002702	Hamp	hepcidin antimicrobial peptide
1368328_at	-3.15	0.01819	Gys2	glycogen synthase 2
1373175_at	-3.14	0.008118	Plbd1	phospholipase B domain containing 1
1389430_at	-3.13	0.002702	Hsd17b7	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 7
1394327_at	-3.13	0.010845	RGD1564804	similar to chromosome 1 open reading frame 50
1388534_at	-3.12	0.022261	Slc31a1	solute carrier family 31 (copper transporter), member 1
1384145_at	-3.1	0.034121	RGD1310495	similar to KIAA1919 protein
1372286_at	-3.09	0.012598	Tspan6	tetraspanin 6
1371050_at	-3.09	0.004392	Pon1	paraoxonase 1
1383960_at	-3.08	0.007897	Pex16	peroxisomal biogenesis factor 16
1381574_at	-3.08	0.005231	Agmo	alkylglycerol monooxygenase
1387725_at	-3.08	0.011294	Gulo	gulonolactone (L-) oxidase
1387599_a_at	-3.06	0.009206	Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
1378092_at	-3.06	0.012119	Mdp1	magnesium-dependent phosphatase 1
1383664_a_at	-3.05	0.006312	Vps51	vacuolar protein sorting 51 homolog (S. cerevisiae)
1368368_a_at	-3.05	0.007018	Lsr	lipolysis stimulated lipoprotein receptor
1398780_at	-3.05	0.011443	Rabac1	Rab acceptor 1 (prenylated)
1370807_at	-3.04	0.012119	Vmp1	vacuole membrane protein 1
1386985_at	-3.04	0.009447	Gstm1	glutathione S-transferase mu 1
1369790_at	-3.04	0.010238	Tat	tyrosine aminotransferase
1384388_at	-3.04	0.018415	Tmed9	transmembrane emp24 protein transport domain containing 9
1370355_at	-3.03	0.012028	Scd1	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1

1379250_at	-3.03	0.02823	Galm	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)
1368916_at	-3.03	0.009637	Asl	argininosuccinate lyase
1383050_at	-3.02	0.013449	Cenpv	centromere protein V
1371691_at	-3.02	0.005938	Rarres2	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2
1399094_at	-3.01	0.007415	Churc1	churchill domain containing 1
1372746_at	-3	0.013449	RGD1566239	similar to RIKEN cDNA 2810428115
1369971_a_at	-3	0.00952	Hnrpd	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D
1369491_at	-2.99	0.007725	Dao	D-amino-acid oxidase
1373150_at	-2.99	0.006243	Comtd1	catechol-O-methyltransferase domain containing 1
1389980_at	-2.98	0.007145	Cnih4	cornichon family AMPA receptor auxiliary protein 4
1389487_at	-2.98	0.009637	Dnajb12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 12
1373500_at	-2.98	0.004636	Lrpprc	leucine-rich pentatricopeptide repeat containing
1398260_a_at	-2.98	0.001593	Serpind1	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1
1377739_at	-2.97	0.034882	Gng12	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12
1387868_at	-2.97	0.013522	Lbp	lipopolysaccharide binding protein
1373810_at	-2.96	0.00971	Pla2g12a	phospholipase A2, group XIIA
1398874_at	-2.95	0.006243	Atxn10	ataxin 10
1368191_a_at	-2.95	0.005812	Slc22a1	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1
1370377_at	-2.95	0.011443	Cyp2d1; Cyp2d5	cytochrome P450, family 2, subfamily d, polypeptide 1; polypeptide 5
1379329_at	-2.94	0.020578	Pcbd2	pterin 4 a carbinolamine dehydratase/dimerization cofactor of hepatocyte nuclear factor 1 alpha
1371358_at	-2.94	0.018246	RGD1560015; Tecr	similar to glycoprotein, synaptic 2; trans-2,3-enoyl-CoA reductase
1368497_at	-2.94	0.002702	Abcc2	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 2
1372306_at	-2.94	0.006808	Ethe1	ethylmalonic encephalopathy 1
1388146_at	-2.94	0.015125	LOC100912222	uncharacterized LOC100912222
1374366_at	-2.93	0.020966	Slc39a4	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4
1378605_at	-2.93	0.006981	Sigirr	single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain
1371590_s_at	-2.93	0.014728	Ubl5	ubiquitin-like 5
1369509_a_at	-2.92	0.004056	A1bg	alpha-1-B glycoprotein
1370885_at	-2.92	0.048699	Ctsz	cathepsin Z
1370149_at	-2.91	0.006138	Asgr1	asialoglycoprotein receptor 1
1367849_at	-2.91	0.004121	Sdc1	syndecan 1
1387240_at	-2.91	0.003242	Rdh7	retinol dehydrogenase 7
1370881_at	-2.9	0.01084	Tst	thiosulfate sulfurtransferase
1370859_at	-2.9	0.004232	Pdia6	protein disulfide isomerase family A, member 6
1389481_at	-2.9	0.00442	RGD735065	similar to GI:13385412-like protein splice form I
1374657_at	-2.9	0.007084	Anks4b	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 4B
1367670_at	-2.89	0.008042	Fh	fumarate hydratase
1384103_at	-2.89	0.010154	Hyi	hydroxypyruvate isomerase
1385862_at	-2.89	0.016036	Armc9	armadillo repeat containing 9
1369286_at	-2.89	0.01273	Proc	protein C
1392888_at	-2.89	0.00659	Gpc4	glypican 4
1398776_at	-2.89	0.015901	Rpn2	ribophorin II

1373963_at	-2.89	0.006808	Hdhd3	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 3
1389111_at	-2.89	0.004669		
1398378_at	-2.88	0.002702	Gstk1	glutathione S-transferase kappa 1
1373204_at	-2.88	0.008291	Tmem176a	transmembrane protein 176A
1393826_at	-2.88	0.011177	Apon	apolipoprotein N
1369698_at	-2.87	0.003639	Abcc3	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 3
1369011_at	-2.85	0.011056	Apoa5	apolipoprotein A-V
1393219_at	-2.85	0.011361	C2; Cfb	complement component 2; complement factor B
1380865_at	-2.85	0.006243		
1369206_at	-2.84	0.004124	Cpb2	carboxypeptidase B2 (plasma)
1367843_at	-2.84	0.036609	Akr7a2	aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase)
1368431_at	-2.84	0.00798	Hpn	hepsin
1390125_at	-2.84	0.009266	Tm9sf1	transmembrane 9 superfamily member 1
1374478_at	-2.84	0.009587	RGD1305347	similar to RIKEN cDNA 2610528J11
1378225_at	-2.84	0.03688		
1368695_at	-2.83	0.005231	C4bpb	complement component 4 binding protein, beta
1380555_at	-2.83	0.013786	Faf2	Fas associated factor family member 2
1388463_at	-2.83	0.012119	Tex264	testis expressed 264
1370946_at	-2.83	0.010024	Nfix	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)
1376437_at	-2.83	0.00652	LOC100910823	derlin-2-like
1370020_at	-2.82	0.01092	Slc25a10	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10
1372210_at	-2.82	0.011824	Mospd3	motile sperm domain containing 3
1378138_at	-2.82	0.014923	Kif16b	kinesin family member 16B
1373790_at	-2.82	0.008726	Car14	carbonic anhydrase 14
1376062_at	-2.81	0.012452	Sdc1	syndecan 1
1367513_at	-2.81	0.015701	Tm9sf4	transmembrane 9 superfamily protein member 4
1390587_x_at	-2.81	0.010459	LOC102549923	zinc finger protein 120-like; zinc finger protein 91-like
1377666_at	-2.8	0.006449	Chdh	choline dehydrogenase
1392498_at	-2.8	0.006334	Ppp2r5c	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', gamma
1388985_at	-2.8	0.013157		
1369941_at	-2.79	0.011177	Dap	death-associated protein
1368059_at	-2.78	0.005195	Crym	crystallin, mu
1374251_at	-2.78	0.006813	Kcnj15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15
1375516_at	-2.78	0.007487	Ndufc2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2
1373387_at	-2.78	0.00748	Slirp	SRA stem-loop interacting RNA binding protein
1375120_at	-2.76	0.009996	Id4	inhibitor of DNA binding 4
1379240_at	-2.76	0.006604	Mbl2	mannose-binding protein C-like; mannose-binding lectin (protein C) 2
1369074_at	-2.76	0.008161	Slc38a4	solute carrier family 38, member 4
1370150_a_at	-2.76	0.01804	Thrsp	thyroid hormone responsive
1398933_at	-2.75	0.011177	Higd2a	HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2A
1371030_at	-2.75	0.007725	Spp2	secreted phosphoprotein 2
1371668_at	-2.75	0.025159		

1371346_at	-2.74	0.007977	Ndufb6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6
1372156_at	-2.74	0.008787	Tmem97	transmembrane protein 97
1369922_at	-2.73	0.031241	Plbd2	phospholipase B domain containing 2
1373011_at	-2.73	0.010891	Fam134b	family with sequence similarity 134, member B
1382431_at	-2.72	0.017468	Abca1	ATP-binding cassette, subfamily A (ABC1), member 1
1368335_at	-2.72	0.008267	Apoa1	apolipoprotein A-I
1387658_at	-2.72	0.01699	Eef2k	eukaryotic elongation factor-2 kinase
1398962_at	-2.72	0.014923	Abhd17a	abhydrolase domain containing 17A
1370151_at	-2.72	0.018391	Cps1	carbamoyl-phosphate synthetase 1
1388569_at	-2.71	0.010443	Serpinf1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), 1
1387636_a_at	-2.7	0.011494	Tmem14c	transmembrane protein 14C
1367465_at	-2.7	0.007248	Dad1	defender against cell death 1
1387936_at	-2.7	0.01273	Sult2a2	sulfotransferase family 2A, dehydroepiandrosterone (DHEA)-preferring, member 2
1370305_at	-2.69	0.007226	Yif1a	Yip1 interacting factor homolog A (S. cerevisiae)
1368280_at	-2.69	0.009306	Ctsc	cathepsin C
1372706_at	-2.69	0.012504	Hexb	hexosaminidase B
1374222_at	-2.69	0.001953	Slc22a18	solute carrier family 22, member 18
1367786_at	-2.68	0.011177	Psmb8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8
1367999_at	-2.68	0.011557	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)
1371548_at	-2.68	0.008787	Mrps25	mitochondrial ribosomal protein S25
1373420_at	-2.68	0.003277	Ecsit	ECSIT signalling integrator
1379118_at	-2.68	0.007519	LOC102550246	uncharacterized LOC102550246
1389445_at	-2.67	0.009024	LOC102554302	zinc finger protein 688-like
1381768_at	-2.67	0.013508	Mthfs	5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase)
1384582_at	-2.67	0.040788	Traf6	TNF receptor-associated factor 6, E3 ubiquitin protein ligase
1374475_at	-2.67	0.019562	Abhd1	abhydrolase domain containing 1
1388361_at	-2.67	0.007018	Ndufb10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10
1387243_at	-2.66	0.005748	Cyp1a2	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2
1386877_at	-2.66	0.007744	Ap2s1	adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit
1373372_at	-2.65	0.001953	LOC501282	similar to lymphocyte antigen 6 complex, locus E ligand
1369226_at	-2.65	0.010154	Kng2	kininogen 2
1368583_a_at	-2.65	0.010961	Hrg; LOC681544	histidine-rich glycoprotein; similar to histidine-rich glycoprotein
1396142_at	-2.65	0.016982	Mrps9	mitochondrial ribosomal protein S9
1368653_a_at	-2.64	0.018766	Park7	parkinson protein 7
1371355_at	-2.64	0.006395	Ndufa8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8
1398308_at	-2.64	0.005407	Rpa3	replication protein A3
1372688_at	-2.64	0.021911	Exosc7	exosome component 7
1374455_at	-2.63	0.006766	Rnaseh2c	ribonuclease H2, subunit C
1387819_at	-2.63	0.006312	Cela1	chymotrypsin-like elastase family, member 1
1370086_at	-2.63	0.008073	Fgg	fibrinogen gamma chain
1399047_at	-2.63	0.014728	Mrpl27	mitochondrial ribosomal protein L27
1392535_at	-2.63	0.016388	Pycrl	pyrroline-5-carboxylate reductase-like

1373866_at	-2.63	0.008327	Coq10b	coenzyme Q10 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
1372762_at	-2.63	0.017574	Hddc3	HD domain containing 3
1383348_at	-2.63	0.002658		
1388731_at	-2.62	0.017807	Zadh2	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 2
1371335_at	-2.62	0.013048	Atp5l	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit G
1372704_at	-2.62	0.006813	Ostc	oligosaccharyltransferase complex subunit (non-catalytic)
1376174_at	-2.62	0.011842	Serpina11	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 11
1371680_at	-2.62	0.009998	Gabarapl1	GABA(A) receptor-associated protein like 1
1367991_at	-2.62	0.00952	Gcs1	glucosidase 1
1389615_at	-2.61	0.002702	Derl1; LOC501445	derlin 1; derlin-1-like
1388202_at	-2.61	0.02616	RT1-EC2	RT1 class Ib, locus EC2
1388626_at	-2.61	0.007248	Ddrk1	DDRK domain containing 1
1393831_at	-2.61	0.006243	Hykk	hydroxylysine kinase
1367662_at	-2.61	0.009547	Hsd17b10	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 10
1383328_x_at	-2.61	0.032795	Pdcd4	programmed cell death 4
1373834_at	-2.61	0.009558	Mef2bnb	MEF2B neighbor
1373121_at	-2.61	0.024166	Mrps28	mitochondrial ribosomal protein S28
1389734_x_at	-2.6	0.006449	RT1-T24-4	RT1 class I, locus T24, gene 4
1398923_at	-2.6	0.016658	Rnasek	ribonuclease, RNase K
1376727_at	-2.6	0.036683	Yipf4	Yip1 domain family, member 4
1387609_at	-2.6	0.006439	Car5a	carbonic anhydrase 5a, mitochondrial
1383497_at	-2.6	0.01766	Glyctk	glycerate kinase
1382975_at	-2.6	0.005748	Ceacam1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (biliary glycoprotein)
1368055_a_at	-2.59	0.007897	Lmna	lamin A/C
1369986_at	-2.59	0.022642	Hagh	hydroxyacyl glutathione hydrolase
1388315_at	-2.59	0.006157	Ndufb11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11
1388680_at	-2.59	0.019891	C1galt1c1	C1GALT1-specific chaperone 1
1387038_at	-2.59	0.009033	Ccs; LOC100911589	copper chaperone for superoxide dismutase; copper chaperone for superoxide dismutase-like
1385585_at	-2.59	0.020752	LOC690286	similar to hepatic leukemia factor
1371536_at	-2.58	0.015329	Carhsp1	calcium regulated heat stable protein 1
1370397_at	-2.58	0.011232	Cyp4a3	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 3
1399011_at	-2.58	0.031474	Cops6	COP9 signalosome subunit 6
1368399_a_at	-2.58	0.004232	Cpq	carboxypeptidase Q
1371266_at	-2.57	0.007725	Afm	afamin
1371807_at	-2.57	0.022878	Atraid	all-trans retinoic acid-induced differentiation factor
1383587_at	-2.57	0.029159	Ptplad1	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1
1371619_at	-2.57	0.015725	RGD1310352	similar to HTGN29 protein; keratinocytes associated transmembrane protein 2
1383241_at	-2.57	0.029431	C1r	complement component 1, r subcomponent
1371688_at	-2.57	0.006157	Tram1	translocation associated membrane protein 1
1367988_at	-2.56	0.003499	Cyp2c23	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 23
1377730_at	-2.56	0.0116	RGD1310769	similar to HSPC288
1397304_at	-2.56	0.012437	Igtp	interferon gamma induced GTPase

1386773_at	-2.56	0.018235	Btd	biotinidase
1373442_at	-2.56	0.012183	Os9	osteosarcoma amplified 9
1389062_at	-2.55	0.020231	Ik	IK cytokine
1390031_at	-2.55	0.004521	Orai1	ORAI calcium release-activated calcium modulator 1
1373513_at	-2.55	0.002844		
1368442_at	-2.54	0.006666	F2	coagulation factor II
1373947_at	-2.54	0.008519	Dpt	dermatopontin
1371309_at	-2.54	0.008957	Tmbim6	transmembrane BAX inhibitor motif containing 6
1393361_at	-2.54	0.01346	Snmp25	small nuclear ribonucleoprotein 25 (U11/U12)
1373668_at	-2.54	0.007786	LOC100911822 Polr2i	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB9-like; polymerase II (DNA directed) I
1381709_at	-2.54	0.011824	Rnf19b	ring finger protein 19B
1381939_at	-2.54	0.019948		
1373625_at	-2.53	0.007505	Shmt1	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)
1387782_at	-2.53	0.004045	Dynll2	dynein light chain LC8-type 2
1382179_at	-2.53	0.026163	Rdh14	retinol dehydrogenase 14 (all-trans/9-cis/11-cis)
1378842_at	-2.53	0.010712	Gabarapl1	GABA(A) receptor-associated protein like 1
1370108_a_at	-2.53	0.016658	Lin7a	lin-7 homolog a (C. elegans)
1370925_at	-2.52	0.00855	Atp9a	ATPase, class II, type 9A
1367648_at	-2.52	0.006781	Igfbp2	insulin-like growth factor binding protein 2
1379322_at	-2.52	0.027919	Psmc7	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 7
1387280_a_at	-2.52	0.007804	Slc7a5	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5
1375423_at	-2.52	0.008161	LOC689959	hypothetical protein LOC689959
1371905_at	-2.51	0.009238	Tmem248	transmembrane protein 248
1380060_at	-2.51	0.01766	Top1mt	topoisomerase (DNA) I, mitochondrial
1378860_at	-2.51	0.007725	Dpy19l3	dpy-19-like 3 (C. elegans)
1384271_at	-2.51	0.013618		
1386571_at	-2.5	0.011142	Tom1l1	target of myb1 (chicken)-like 1
1375362_at	-2.5	0.014021	Sppl2a	signal peptide peptidase-like 2A
1369960_at	-2.5	0.018662	Fxyd1	FXYD domain-containing ion transport regulator 1
1371258_at	-2.5	0.024063	Fga	fibrinogen alpha chain
1371319_at	-2.5	0.020953	Itn2b	integral membrane protein 2B
1398984_at	-2.5	0.009743	Tm2d2	TM2 domain containing 2
1398786_at	-2.5	0.001953	Psmc2	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 2
1387120_at	-2.5	0.009078	Psmc3	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3
1381937_at	-2.5	0.009559		
1388851_at	-2.49	0.009206	Hspa9; LOC100912578	heat shock protein 9; stress-70 protein, mitochondrial-like
1368940_at	-2.49	0.007638	P2ry2	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2
1374892_at	-2.49	0.01238	Sat2	spermidine/spermine N1-acetyltransferase family member 2
1369992_at	-2.49	0.008726	Psmc1	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 1
1388246_at	-2.48	0.007234	Clu	clusterin
1387283_at	-2.48	0.009503	Mx2	myxovirus (influenza virus) resistance 2
1386899_at	-2.48	0.002658	Ctsh	cathepsin H

1373391_at	-2.48	0.029401	Tmco1	transmembrane and coiled-coil domains 1
1367795_at	-2.48	0.007543	lfrd1	interferon-related developmental regulator 1
1375220_at	-2.48	0.005305	Ndufa11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11
1377758_at	-2.48	0.00951	Hsd17b13	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13
1371782_at	-2.48	0.007788	Nipsnap3b	nipsnap homolog 3B (<i>C. elegans</i>)
1376702_at	-2.48	0.010062	Mlc1	megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1
1384112_at	-2.48	0.001768		
1398879_at	-2.47	0.008128	Tmem66	transmembrane protein 66
1371634_at	-2.47	0.007638	Tmem126a	transmembrane protein 126A
1388213_a_at	-2.47	0.017077	RT1-S3	RT1 class Ib, locus S3
1367839_at	-2.47	0.019724	Fdft1	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1
1398853_at	-2.47	0.009558	Psmb3	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 3
1384841_at	-2.47	0.049869		
1373080_at	-2.46	0.028723	Papola	poly (A) polymerase alpha
1388271_at	-2.46	0.002702	Mt2A	metallothionein 2A
1368379_at	-2.46	0.018882	Scarb2	scavenger receptor class B, member 2
1373815_at	-2.46	0.009949	Lman2	lectin, mannose-binding 2
1381982_at	-2.46	0.006243	Uap111	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1-like 1
1384602_at	-2.46	0.015719	Gpr107	G protein-coupled receptor 107
1372247_at	-2.46	0.008208	Ddost	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase
1373198_at	-2.46	0.027714	Dnajc22	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 22
1372012_at	-2.46	0.007415		
1388983_at	-2.45	0.010831	RGD1305045	similar to hypothetical protein
1370563_at	-2.45	0.008161	Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14
1375933_at	-2.45	0.011885	Cldn2	claudin 2
1372462_at	-2.45	0.015329	Acat2	acetyl-CoA acetyltransferase 2
1391483_at	-2.45	0.019897	Creb3l3	cAMP responsive element binding protein 3-like 3
1376807_at	-2.45	0.007897	Rabl3	RAB, member of RAS oncogene family-like 3
1389573_at	-2.45	0.007357	Chac1	ChaC, cation transport regulator homolog 1 (<i>E. coli</i>)
1371912_at	-2.45	0.007357	Ndufs7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7
1367982_at	-2.45	0.005748	Alas1	aminolevulinic acid, delta-, synthase 1
1367892_at	-2.45	0.011177	Pdk2	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2
1368314_at	-2.45	0.00442	Ggcx	gamma-glutamyl carboxylase
1380351_at	-2.45	0.007318	LOC102554026	uncharacterized LOC102554026
1369701_at	-2.44	0.00143	Lipc	lipase, hepatic
1379587_at	-2.44	0.020297	Rdh5	retinol dehydrogenase 5 (11-cis/9-cis)
1399004_at	-2.44	0.005276	LOC100910944 Romo1	reactive oxygen species modulator 1-like; reactive oxygen species modulator 1
1367677_at	-2.44	0.00442	Prdx5	peroxiredoxin 5
1374279_at	-2.44	0.009033	Aimp1	aminoacyl tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1
1368085_at	-2.44	0.0116	Gchfr	GTP cyclohydrolase I feedback regulator
1396933_s_at	-2.44	0.029764	Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14
1384580_at	-2.44	0.019954	C6	complement component 6

1381394_at	-2.44	0.048501	Snx27	sorting nexin family member 27
1388497_at	-2.44	0.01016	Acot13	acyl-CoA thioesterase 13
1376501_at	-2.44	0.004045	Arhgap8	Rho GTPase activating protein 8
1388552_at	-2.44	0.017347	Smpd1	sphingomyelin phosphodiesterase 1, acid lysosomal
1371513_at	-2.44	0.015958		
1370363_at	-2.43	0.007897	Ces1d	carboxylesterase 1D
1387279_at	-2.43	0.007725	F11r	F11 receptor
1370964_at	-2.43	0.018049	Ass1	argininosuccinate synthase 1
1372421_at	-2.43	0.017602	Aga	aspartylglucosaminidase
1388326_at	-2.43	0.017759	Ndufs8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8
1399073_at	-2.43	0.003009	Otub1; RGD1565010	OTU deubiquitinase, ubiquitin aldehyde binding 1; similar to HSPC263
1388330_at	-2.43	0.006083	Vkorc1	vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1
1394577_at	-2.43	0.009503	Esrrg	estrogen-related receptor gamma
1387108_at	-2.43	0.011926	Csnk2b	casein kinase 2, beta polypeptide
1370321_at	-2.43	0.010382	Aifm1	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1
1377084_at	-2.43	0.001953		
1373874_at	-2.43	0.010599		
1368226_at	-2.42	0.005116	Dnph1	2'-deoxynucleoside 5'-phosphate N-hydrolase 1
1391463_at	-2.42	0.010154	Ddx58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
1373002_at	-2.42	0.014662	Mrps9	mitochondrial ribosomal protein S9
1368790_at	-2.41	0.009238	LOC100909524 Serpina10	protein Z-dependent protease inhibitor-like; serpin peptidase inhibitor, clade A member 10
1368275_at	-2.41	0.009251	Msmo1	methylsterol monooxygenase 1
1370295_at	-2.41	0.007082	Nme1	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 1
1374569_at	-2.41	0.014536	Grwd1	glutamate-rich WD repeat containing 1
1375247_at	-2.4	0.009317	Mgll	monoglyceride lipase
1367885_at	-2.4	0.013077	Pxmp2	peroxisomal membrane protein 2
1373686_at	-2.4	0.00976	Serpina6	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 6
1375529_at	-2.4	0.011735	Cbr4	carbonyl reductase 4
1375924_at	-2.4	0.011675	Fabp12	fatty acid binding protein 12
1375856_at	-2.4	0.010965		
1388148_a_at	-2.39	0.009976	Lrpap1	low density lipoprotein receptor-related protein associated protein 1
1371594_at	-2.39	0.021549	Fis1	fission 1 (mitochondrial outer membrane) homolog (S. cerevisiae)
1375428_at	-2.39	0.009069	Creg1	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1
1373745_at	-2.39	0.007267	Gtf2h4	general transcription factor II H, polypeptide 4
1387064_at	-2.39	0.011477	Pex2	peroxisomal biogenesis factor 2
1372401_at	-2.39	0.004007	Nans	N-acetylneuraminic acid synthase
1379353_at	-2.39	0.004837	Aasdhppt	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase-phosphopantetheinyl transferase
1368004_at	-2.39	0.006929	Mrpl23	mitochondrial ribosomal protein L23
1393192_at	-2.39	0.004229		
1387583_at	-2.38	0.018195	Cyp26a1	cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1
1369200_at	-2.38	0.028977	Nt5e	5' nucleotidase, ecto
1389588_at	-2.38	0.019933	Cant1	calcium activated nucleotidase 1

1387812_at	-2.38	0.019343	Pcsk6	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6
1371523_at	-2.38	0.046921	Commd1	copper metabolism (Murr1) domain containing 1
1376431_at	-2.38	0.015939	Sil1	SIL1 nucleotide exchange factor
1390020_at	-2.38	0.022531	Ogdh	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipamide)
1377015_at	-2.38	0.002455		
1388732_at	-2.37	0.044331	Slc35f5	solute carrier family 35, member F5
1375071_at	-2.37	0.035529	Nup133	nucleoporin 133
1388988_at	-2.37	0.010847	Abhd14b	abhydrolase domain containing 14b
1371444_at	-2.37	0.016547	Cers2	ceramide synthase 2
1398939_at	-2.37	0.014502	Ormdl3	ORMDL sphingolipid biosynthesis regulator 3
1367468_at	-2.37	0.014692	Scand1	SCAN domain-containing 1
1373025_at	-2.37	0.010613	C1qc	complement component 1, q subcomponent, C chain
1372001_at	-2.37	0.014173	Fam96b	family with sequence similarity 96, member B
1388755_at	-2.37	0.009266		
1370878_at	-2.36	0.001561	Urod	uroporphyrinogen decarboxylase
1372556_at	-2.36	0.004392	LOC100911840 Polr2l	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC5-like; polymerase II (DNA directed) L
1388583_at	-2.36	0.006808	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
1375211_at	-2.36	0.008988	Rnaset2	ribonuclease T2
1371988_at	-2.36	0.014916	Man1a1	mannosidase, alpha, class 1A, member 1
1371833_at	-2.36	0.017638	Bri3	brain protein I3
1374947_at	-2.36	0.024416	Bcar3	breast cancer anti-estrogen resistance 3
1375259_at	-2.36	0.009876	Eif4ebp2	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2
1371041_at	-2.36	0.012368	Ndufv2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2
1391806_at	-2.35	0.002702	Itih2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2
1386987_at	-2.35	0.006721	Il6r	interleukin 6 receptor
1368184_at	-2.35	0.009115	Psmc9	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 9
1370861_at	-2.35	0.007153	Cox6a1	cytochrome c oxidase, subunit VIa, polypeptide 1
1367635_at	-2.35	0.006109	P4hb	prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide
1371962_at	-2.35	0.004124	Tufm	Tu translation elongation factor, mitochondrial
1377660_at	-2.35	0.006312	LOC100911028; RGD1309350	5-hydroxyisourate hydrolase-like; similar to transthyretin (4L369)
1387109_at	-2.35	0.004189	Por	P450 (cytochrome) oxidoreductase
1390326_at	-2.35	0.00442	Ang	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5
1378634_at	-2.35	0.031486	Hdac8; LOC100911968	histone deacetylase 8; histone deacetylase 8-like
1370036_at	-2.35	0.00797	Suox	sulfite oxidase
1393218_at	-2.35	0.005319		
1380561_at	-2.35	0.00987	lars2	isoleucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial
1374676_at	-2.35	0.013744		
1370232_at	-2.34	0.005276	lvd	isovaleryl-CoA dehydrogenase
1374439_at	-2.34	0.012368	Yipf3	Yip1 domain family, member 3
1373335_at	-2.34	0.006205	Zdhhc9	zinc finger, DHHC-type containing 9
1399146_at	-2.34	0.033139	Dolk	dolichol kinase
1367482_at	-2.34	0.011443	Anapc11	anaphase promoting complex subunit 11

1368618_at	-2.34	0.024915	Grb14	growth factor receptor bound protein 14
1367796_at	-2.34	0.009637	Mgat1	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase
1382936_at	-2.34	0.019626	Zfx3	zinc finger homeobox 3
1371410_at	-2.33	0.009447	Wdr83os	WD repeat domain 83 opposite strand
1388071_x_at	-2.33	0.028535	RT1-EC2	RT1 class Ib, locus EC2
1372752_at	-2.33	0.007842	Tspan4	tetraspanin-4-like; tetraspanin 4
1369275_s_at	-2.33	0.037919	Cyp2a1; Cyp2a2	cytochrome P450, family 2, subfamily a, polypeptide 1; polypeptide 2
1398914_at	-2.33	0.00302	Polr2j	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J
1390802_at	-2.33	0.018766	Plgrkt	plasminogen receptor, C-terminal lysine transmembrane protein
1367728_at	-2.33	0.026461	Tsn	translin
1398750_at	-2.33	0.012287	Calr	calreticulin
1387336_at	-2.33	0.00143	Nat8	N-acetyltransferase 8
1369799_at	-2.33	0.01115	Abat	4-aminobutyrate aminotransferase
1387703_a_at	-2.32	0.01247	Usp2	ubiquitin specific peptidase 2
1370897_at	-2.32	0.018564	Bckdha	branched chain ketoacid dehydrogenase E1, alpha polypeptide
1369063_at	-2.32	0.028723	Anp32a	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A
1369678_a_at	-2.32	0.016193	Nfia	nuclear factor I/A
1373304_at	-2.32	0.009927	Coasy	CoA synthase
1388517_at	-2.32	0.008125	Mrpl40	mitochondrial ribosomal protein L40
1388365_at	-2.32	0.048112	Atp6v0d1	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit D1
1388364_at	-2.32	0.007011	Ndufs3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 3
1393213_at	-2.32	0.022531	Ccnl2	cyclin L2
1398516_at	-2.32	0.006813	Golt1a	golgi transport 1A
1388501_at	-2.32	0.009447	MGC125239	hypothetical protein LOC686179
1398267_at	-2.32	0.011186	Slc22a7	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7
1375879_at	-2.32	0.004301		
1372700_at	-2.32	0.027908		
1382809_at	-2.31	0.036567	Cirbp	cold inducible RNA binding protein
1388362_at	-2.31	0.007786	LOC100911483	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 13-like
1374033_at	-2.31	0.00798	Psmb10	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10
1388809_at	-2.31	0.007153	Smpd3a	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A
1371961_at	-2.31	0.020445	Pld3	phospholipase D family, member 3
1392417_s_at	-2.31	0.021569	Tp53rk	similar to TP53-regulating kinase (Nori-2); TP53 regulating kinase
1369934_at	-2.31	0.011406	Ppib	peptidylprolyl isomerase B
1388469_at	-2.31	0.002427		
1368249_at	-2.3	0.004581	Klf15	Kruppel-like factor 15
1369473_at	-2.3	0.041214	Pgm1	phosphoglucomutase 1
1367939_at	-2.3	0.010971	Rbp1	retinol binding protein 1, cellular
1372087_at	-2.3	0.004837	lah1	isoamyl acetate-hydrolyzing esterase 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
1374465_at	-2.3	0.007547	Uxt	ubiquitously-expressed, prefoldin-like chaperone
1375209_at	-2.3	0.004581	Osbpl11	oxysterol binding protein-like 11
1367514_at	-2.3	0.006028	LOC361635	similar to RIKEN cDNA 9030624J02

1376715_at	-2.3	0.035035	Micu1	mitochondrial calcium uptake 1
1371720_at	-2.3	0.006721	Mrpl20	mitochondrial ribosomal protein L20
1383737_at	-2.3	0.005664		
1372073_at	-2.29	0.006334	Gatad2a	GATA zinc finger domain containing 2A
1367613_at	-2.29	0.004488	Prdx1; Prdx11	peroxiredoxin 1; peroxiredoxin 1-like 1
1368272_at	-2.29	0.011756	Got1	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble
1371432_at	-2.29	0.011919	Vat1	vesicle amine transport 1
1376134_at	-2.29	0.002702	Mri1	methylthioribose-1-phosphate isomerase 1
1387885_at	-2.29	0.017238	Fcgrt	Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha
1379784_at	-2.29	0.027348	Pex7	peroxisomal biogenesis factor 7
1372513_at	-2.29	0.04649	Rac1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
1375346_at	-2.29	0.007564	RGD1563941	similar to hypothetical protein FLJ20010
1383652_at	-2.29	0.009389	Jagn1	jagunal homolog 1 (Drosophila)
1371699_at	-2.29	0.004151		
1382200_at	-2.29	0.007322	Cenpv	centromere protein V
1391629_at	-2.29	0.012134		
1389585_at	-2.28	0.020674	Pvrl1	poliovirus receptor-related 1
1386990_at	-2.28	0.00442	Ebp	emopamil binding protein (sterol isomerase)
1387778_at	-2.28	0.041071	Sdf4	stromal cell derived factor 4
1368311_at	-2.28	0.010413	Mgmt	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
1371851_at	-2.28	0.012743	Psmc6	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 6
1376592_at	-2.28	0.00952	Mcee	methylmalonyl CoA epimerase
1383392_at	-2.28	0.003968	C2; Cfb	complement component 2; complement factor B
1373469_at	-2.28	0.020418	Ptplad1	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1
1372170_at	-2.28	0.007329	Acy1	aminoacylase 1
1380407_at	-2.28	0.009156	RGD1310352	similar to HTGN29 protein; keratinocytes associated transmembrane protein 2
1376418_a_at	-2.28	0.011175	lars	isoleucyl-tRNA synthetase
1367510_at	-2.28	0.006808	Txndc15	thioredoxin domain containing 15
1383796_at	-2.28	0.018495	Marc1	mitochondrial amidoxime reducing component 1
1379420_at	-2.28	0.006813	RGD1565002	similar to Dehydrogenase/reductase SDR family member 7 precursor
1394207_at	-2.28	0.008091		
1388491_at	-2.28	0.024068		
1398358_a_at	-2.27	0.002702	Itgb5	integrin, beta 5
1398249_at	-2.27	0.006243	Slc25a20	solute carrier family 25 (carnitine/acylcarnitine translocase), member 20
1367651_at	-2.27	0.016193	Ctsd	cathepsin D
1388798_at	-2.27	0.024719	Ube2e2	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2
1373585_at	-2.27	0.015273	Cox16	COX16 cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae)
1368840_at	-2.27	0.014313	Tmem176b	transmembrane protein 176B
1370547_at	-2.27	0.007084	Pzp	pregnancy-zone protein
1398887_at	-2.27	0.019311	Lamtor2	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 2
1398784_at	-2.27	0.013945	C1qbp	complement component 1, q subcomponent binding protein
1372026_at	-2.27	0.034257	RGD1359310	similar to RIKEN cDNA 9430023L20

1396279_at	-2.27	0.015509	Atp6ap2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2
1383443_at	-2.27	0.013168	Aaed1	AhpC/TSA antioxidant enzyme domain containing 1
1383040_a_at	-2.27	0.003277	LOC102552818	uncharacterized LOC102552818
1377921_at	-2.27	0.00442	Etnk2	ethanolamine kinase 2
1392072_at	-2.27	0.007478		
1390421_at	-2.27	0.019026	Hoga1	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1
1384483_at	-2.27	0.048998		
1370992_a_at	-2.26	0.001953	Fga	fibrinogen alpha chain
1371137_at	-2.26	0.015625	Acox2	acyl-CoA oxidase 2, branched chain
1370164_at	-2.26	0.012504	Hadha	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase/enoyl-CoA hydratase, a
1370435_a_at	-2.26	0.007844	Nudt6	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6
1388523_at	-2.26	0.007415	Txndc12	thioredoxin domain containing 12 (endoplasmic reticulum)
1372016_at	-2.26	0.00478	Gadd45b	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
1379744_at	-2.26	0.004045	Hps5; Saa4	Hermansky-Pudlak syndrome 5; serum amyloid A4, constitutive
1394737_at	-2.26	0.014898	RGD1311345	similar to CG9752-PA
1368720_at	-2.26	0.005243	Tdo2	tryptophan 2,3-dioxygenase
1372948_at	-2.26	0.007145	Mrp63	mitochondrial ribosomal protein 63
1367656_at	-2.26	0.013077	Psmb7	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 7
1383712_at	-2.26	0.017872	LOC102556004	uncharacterized LOC102556004
1389006_at	-2.25	0.006669	Mpeg1	macrophage expressed 1
1368253_at	-2.25	0.015513	Gamt	guanidinoacetate N-methyltransferase
1368161_a_at	-2.25	0.002658	Ahsg	alpha-2-HS-glycoprotein
1389248_at	-2.25	0.009949	Galk1	galactokinase 1
1370906_at	-2.25	0.006312	Bckdhb	branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide
1376652_at	-2.25	0.001561	C1qa	complement component 1, q subcomponent, A chain
1369972_at	-2.25	0.012743	Fbxo21	F-box protein 21
1393403_at	-2.25	0.008161	Angptl3	angiopoietin-like 3
1389940_at	-2.25	0.009637	Tmed2	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2
1368079_at	-2.24	0.008319	Pdk1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1
1387214_at	-2.24	0.008955	Ces1e	carboxylesterase 1E
1393458_s_at	-2.24	0.030011	Phf14	PHD finger protein 14
1368101_at	-2.24	0.016193	Calm1; Calm2 Calm3	calmodulin 1; calmodulin 2; calmodulin 3
1383243_at	-2.24	0.005243	Cebpa	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
1369171_at	-2.24	0.009558	Mst1	Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)
1367764_at	-2.24	0.013214	Ccng1	cyclin G1
1377596_a_at	-2.24	0.024316	Med30	mediator complex subunit 30
1378902_at	-2.24	0.012119	Tyw1	tRNA-yW synthesizing protein 1 homolog (S. cerevisiae)
1372843_at	-2.24	0.011087	Smco4	single-pass membrane protein with coiled-coil domains 4
1367770_at	-2.24	0.007275	Degs1	delta(4)-desaturase, sphingolipid 1
1380389_at	-2.24	0.026532		
1372799_at	-2.23	0.04292	Dguok	deoxyguanosine kinase
1387984_at	-2.23	0.011542	Cklf	chemokine-like factor

1375173_at	-2.23	0.006813	Plbd2	phospholipase B domain containing 2
1372765_a_at	-2.23	0.002844	Eci2; Eci3	enoyl-CoA delta isomerase 2; enoyl-Coenzyme A delta isomerase 3
1388320_at	-2.23	0.022218	Spint2	serine peptidase inhibitor, Kunitz type, 2
1389177_at	-2.23	0.009281	Perp	PERP, TP53 apoptosis effector
1373624_at	-2.23	0.006312	Rassf8	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 8
1370706_a_at	-2.23	0.038013	Cyp2j3	cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 3
1374420_at	-2.23	0.004747	Apmap	adipocyte plasma membrane associated protein
1368239_at	-2.23	0.021205	Lrp3	low density lipoprotein receptor-related protein 3
1379429_at	-2.23	0.00442		
1383056_a_at	-2.23	0.013941	Tmem238	transmembrane protein 238
1374505_at	-2.22	0.005305	Lyrn5	LYR motif containing 5
1367463_at	-2.22	0.011299	Phb2	prohibitin 2
1396521_at	-2.22	0.045599	Stard4	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4
1369990_at	-2.22	0.010841	Ptpmt1	protein tyrosine phosphatase, mitochondrial 1
1376852_at	-2.22	0.020381	Mccc1	methylcrotonoyl-CoA carboxylase 1 (alpha)
1398862_at	-2.22	0.029979	Atp2a2	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2
1380321_at	-2.22	0.045077	Mtus1	microtubule associated tumor suppressor 1
1376468_at	-2.22	0.010654	Hars	histidyl-tRNA synthetase
1388942_at	-2.22	0.004453		
1374214_at	-2.22	0.016193		
1375056_at	-2.21	0.003968	Ociad2	O CIA domain containing 2
1368265_at	-2.21	0.040992	Cyp2t1	cytochrome P450, family 2, subfamily t, polypeptide 1
1388719_at	-2.21	0.004669	Ubqln1	ubiquilin 1
1388163_at	-2.21	0.007638	Slc25a5	ADP/ATP translocase 3-like; solute carrier family 25 (mitochondrial carrier), member 5
1367819_at	-2.21	0.007011	Got2	glutamic-oxaloacetic transaminase 2, mitochondrial
1387915_at	-2.21	0.013823	Vimp	VCP-interacting membrane protein
1367818_at	-2.21	0.00951	Coq3	coenzyme Q3 methyltransferase
1398963_at	-2.21	0.009024	Taf10	TAF10 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor
1388371_at	-2.21	0.02518	Prkcsh	protein kinase C substrate 80K-H
1398831_at	-2.2	0.004216	Psmb4	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4
1382094_at	-2.2	0.00996	Ptpnj	protein tyrosine phosphatase, receptor type, J
1369669_at	-2.2	0.022233	Nln	neurolysin (metallopeptidase M3 family)
1394842_at	-2.2	0.007564	Tmem19	transmembrane protein 19-like; transmembrane protein 19
1371770_at	-2.2	0.020445	Pfdn6	prefoldin subunit 6
1398915_at	-2.2	0.00798	Lamtor4	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 4
1392527_at	-2.2	0.009534	Dnajc19	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 19
1370065_at	-2.2	0.00652	Hpx	hemopexin
1367748_at	-2.2	0.007564	Arf5	ADP-ribosylation factor 5
1367994_at	-2.2	0.011735	Dpyd	dihydropyrimidine dehydrogenase
1386930_at	-2.2	0.026443	Psmd4	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4
1376089_at	-2.2	0.004045		
1371894_at	-2.2	0.005748	Gns	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase

1368289_at	-2.19	0.005506	Gc	group specific component
1370880_at	-2.19	0.022171	Rnh1	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1
1371958_at	-2.19	0.01976	Pabpn1	poly(A) binding protein, nuclear 1
1387994_at	-2.19	0.001953	Hsd17b6	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 6
1399107_at	-2.19	0.013649	Smim8	small integral membrane protein 8
1367997_at	-2.19	0.00976	Cipb	CipB caseinolytic peptidase B homolog (E. coli)
1367500_at	-2.19	0.002658	Shfm1	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1
1377964_at	-2.19	0.009949		
1376079_at	-2.19	0.010599	LOC100360412	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 1-like
1378110_at	-2.19	0.01232		
1378134_at	-2.18	0.005243	Atp8b1	ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8B, member 1
1399072_at	-2.18	0.007357	Fibp	fibroblast growth factor (acidic) intracellular binding protein
1388350_at	-2.18	0.009705	Pex19	peroxisomal biogenesis factor 19-like;
1368330_at	-2.18	0.011177	Aatf	apoptosis antagonizing transcription factor
1370708_a_at	-2.18	0.035713	Akr1c14	aldo-keto reductase family 1, member C14
1371100_at	-2.18	0.008118	Ces1c	carboxylesterase 1C
1368077_at	-2.18	0.017991	Fbp1	fructose-1,6-bisphosphatase 1
1387672_at	-2.18	0.015725	Gnmt	glycine N-methyltransferase
1372697_at	-2.18	0.01779	Mrps15	mitochondrial ribosomal protein S15
1382813_at	-2.18	0.038166	Pomk	protein-O-mannose kinase
1383920_at	-2.18	0.002702	Amt	aminomethyltransferase
1371589_at	-2.18	0.00987	Ubl5	ubiquitin-like 5
1368794_at	-2.18	0.007564	Haa0	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase
1368566_a_at	-2.18	0.03442	Ndufv3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3
1371090_at	-2.18	0.016139	Scamp2	secretory carrier membrane protein 2
1388634_at	-2.17	0.005305	Pgm1	phosphoglucomutase 1
1371944_at	-2.17	0.020645	Ube2l3	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3
1367642_at	-2.17	0.005535	Suclg1	succinate-CoA ligase, alpha subunit
1367585_a_at	-2.17	0.029869	Atp1a1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide
1398868_at	-2.17	0.009777	Timm13	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)
1367942_at	-2.17	0.008738	Acp5	acid phosphatase 5, tartrate resistant
1368762_at	-2.17	0.007786	Ubd	ubiquitin D
1388587_at	-2.17	0.009674	Ier3	immediate early response 3
1372747_at	-2.17	0.019292	Slc20a2	solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 2
1398359_at	-2.17	0.005986	Rnf181	ring finger protein 181
1389791_at	-2.17	0.006864	Cln8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 (epilepsy, progressive with mental retardation)
1388784_at	-2.17	0.007415	Csf1r	colony stimulating factor 1 receptor
1375369_at	-2.17	0.005305	Wbp1l	WW domain binding protein 1-like
1389654_at	-2.17	0.002702	Pls1	plastin 1
1389903_at	-2.17	0.014316	Pttg1ip	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein
1367695_at	-2.17	0.006553	Qdpr	quinoid dihydropteridine reductase
1399067_at	-2.17	0.022272	Gnl3l	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)-like

1397004_at	-2.17	0.048475		
1389967_at	-2.16	0.012838	Arl6ip1	ADP-ribosylation factor-like 6 interacting protein 1
1370830_at	-2.16	0.0138	Egfr	epidermal growth factor receptor
1389179_at	-2.16	0.028535	Cidea	cell death-inducing DFFA-like effector a
1387926_at	-2.16	0.012121	Sc5d	sterol-C5-desaturase
1367721_at	-2.16	0.01142	Sdc4	syndecan 4
1367503_at	-2.16	0.005664	Bcap31	B-cell receptor-associated protein 31
1399003_at	-2.16	0.021979	Ccdc47	coiled-coil domain containing 47
1382446_at	-2.16	0.015513	Atp5s	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit s (factor B)
1373901_at	-2.16	0.019724	Cdk2ap2	cyclin-dependent kinase 2 associated protein 2
1389678_at	-2.16	0.015414	Slc25a48	solute carrier family 25, member 48
1373281_at	-2.16	0.016154	Lmf1	lipase maturation factor 1
1388743_at	-2.16	0.017502		
1374915_at	-2.16	0.019438		
1369764_at	-2.15	0.007248	C4bpa	complement component 4 binding protein, alpha
1369081_at	-2.15	0.042668	Neu1	neuraminidase 1
1367909_at	-2.15	0.006157	Dcxr	dicarbonyl L-xylulose reductase
1368308_at	-2.15	0.02204	Myc	myelocytomatosis oncogene
1370817_at	-2.15	0.006449	Sec11c	SEC11 homolog C (S. cerevisiae)
1371605_at	-2.15	0.02204	Ndufa12	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 apha subcomplex subunit 12-like
1371745_at	-2.15	0.020042	Cwc15	CWC15 spliceosome-associated protein homolog (S. cerevisiae)
1398588_at	-2.15	0.008572	Slu7	SLU7 splicing factor homolog (S. cerevisiae)
1386755_at	-2.15	0.028358	Ccdc91	coiled-coil domain containing 91
1382434_at	-2.15	0.009876	Entpd5	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
1367622_at	-2.15	0.013591	Atp5h	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit d
1398966_at	-2.15	0.009024	LOC687029	similar to differentially expressed in B16F10 1
1377027_at	-2.15	0.009094		
1376275_at	-2.15	0.013825		
1370245_at	-2.14	0.006099	Ctsl	cathepsin L
1398983_at	-2.14	0.008161	Mrpl30	39S ribosomal protein L30, mitochondrial-like; mitochondrial ribosomal protein L30
1370605_s_at	-2.14	0.014609	Lepr	leptin receptor
1388683_at	-2.14	0.007543	Naa38	N(alpha)-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit
1373229_at	-2.14	0.006243	Lsm12	LSM12 homolog (S. cerevisiae)
1389125_at	-2.14	0.002702	Mrpl1	mitochondrial ribosomal protein L1
1367793_at	-2.14	0.009886	Ddt	D-dopachrome tautomerase
1386878_at	-2.14	0.020381	Lrp10	low-density lipoprotein receptor-related protein 10
1384312_at	-2.14	0.002702	Irx1	iroquois homeobox 1
1377407_at	-2.14	0.007017	Acsm5	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 5
1398296_at	-2.14	0.012172	Gde1	glycerophosphodiester phosphodiesterase 1
1398931_at	-2.14	0.01124	Tmem223	transmembrane protein 223
1367741_at	-2.14	0.017273	Herpud1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
1382032_at	-2.14	0.016658		

1374058_at	-2.13	0.006243	Tmem9b	TMEM9 domain family, member B
1368291_at	-2.13	0.006813	Birc2	baculoviral IAP repeat-containing 2
1367523_at	-2.13	0.029565	Trappc2l	trafficking protein particle complex subunit 2-like protein-like; trafficking protein particle complex 2-like
1389964_at	-2.13	0.014903	Ndufab1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, a/b subcomplex, 1
1387531_at	-2.13	0.014404	Msra	methionine sulfoxide reductase A
1373058_at	-2.13	0.019573	Tmem30a	transmembrane protein 30A
1398771_at	-2.13	0.012795	Slc3a2	solute carrier family 3 (amino acid transporter heavy chain), member 2
1387663_at	-2.13	0.018701	Gmfb	glia maturation factor, beta
1369996_at	-2.13	0.00672	Polr2f	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F
1368526_at	-2.13	0.010268	Pex3	peroxisomal biogenesis factor 3
1398928_at	-2.12	0.00458	Cuta	cutA divalent cation tolerance homolog (E. coli)
1371062_at	-2.12	0.040275	Aldh5a1	aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1
1399012_at	-2.12	0.002702	Tmem59	transmembrane protein 59
1368245_at	-2.12	0.012642	Upb1	ureidopropionase, beta
1367720_at	-2.12	0.012336	Alad	aminolevulinic acid dehydratase
1372581_at	-2.12	0.010964	Snf8	SNF8, ESCRT-II complex subunit
1372128_at	-2.12	0.016242	Mrps12	mitochondrial ribosomal protein S12
1368436_at	-2.12	0.00672	Nudc	nuclear migration protein nudC-like; nudC nuclear distribution protein
1370215_at	-2.12	0.042653	C1qb	complement component 1, q subcomponent, B chain
1372734_at	-2.12	0.004669	Smagp	small cell adhesion glycoprotein
1375444_at	-2.12	0.049105	Ap3d1	adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit
1385670_at	-2.12	0.020878	Sdsl	serine dehydratase-like
1376195_at	-2.12	0.006083	Spin1	spindlin-1-like; similar to spindlin; spindlin 1
1373918_at	-2.12	0.012668	Rdh11	retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)
1368070_at	-2.12	0.005305	Stx8	syntaxin 8
1388692_at	-2.12	0.007638	Alkbh7	alkB, alkylation repair homolog 7 (E. coli)
1398848_at	-2.12	0.004837	St13	suppression of tumorigenicity 13
1376977_at	-2.12	0.012336		
1392897_at	-2.11	0.00379		
1370537_at	-2.11	0.009069	Xrcc6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6
1394003_at	-2.11	0.006889	Pole3	DNA-directed DNA polymerase epsilon 3; polymerase (DNA directed), epsilon 3, accessory subunit
1370548_at	-2.11	0.019398	Slc16a10	solute carrier family 16 (aromatic amino acid transporter), member 10
1386927_at	-2.11	0.019727	Cpt2	carnitine palmitoyltransferase 2
1375424_at	-2.11	0.01423	Actr2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)
1388792_at	-2.11	0.028153	Gadd45g	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma
1374650_at	-2.11	0.037222	Nedd9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
1367709_at	-2.11	0.004189	Cd63	Cd63 molecule
1388528_at	-2.11	0.027124	Fbl	fibrillarlin
1373539_at	-2.11	0.030787	Tex261	testis expressed 261
1382274_at	-2.11	0.010394	Rarres1	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1
1391462_at	-2.11	0.010831	Ebpl	emopamil binding protein-like
1370298_at	-2.11	0.015947	Coa3	cytochrome C oxidase assembly factor 3

1368230_a_at	-2.11	0.006768	Ndufaf3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 3
1388742_at	-2.11	0.028655	Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
1386938_at	-2.11	0.012506	Anpep	alanyl (membrane) aminopeptidase
1372352_at	-2.1	0.013589	Manf	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
1373312_at	-2.1	0.018512	Pnkd	paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia
1367777_at	-2.1	0.00442	Decr1	2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial
1386956_at	-2.1	0.006692	Scarb1	scavenger receptor class B, member 1
1369726_at	-2.1	0.033116	Tapbp	TAP binding protein (tapasin)
1372142_at	-2.1	0.01232	Asna1	arsA arsenite transporter, ATP-binding, homolog 1 (bacterial)
1392465_at	-2.1	0.010521	Sap18	similar to SAP18; Sin3-associated polypeptide 18
1371631_at	-2.1	0.016604	Eif1ad	eukaryotic translation initiation factor 1A domain containing
1371580_at	-2.1	0.002658	Erlin1	ER lipid raft associated 1
1372134_at	-2.1	0.018688	Chchd6	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6
1371780_at	-2.1	0.010382	Kdelr2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2
1371343_at	-2.1	0.006692	Srpr	signal recognition particle receptor ('docking protein')
1393015_at	-2.1	0.006243	RGD1310587	similar to hypothetical protein FLJ14146
1368538_at	-2.1	0.049201	Exoc7	exocyst complex component 7; exocyst complex component 7-like
1386884_at	-2.1	0.005331	Htra1	HtrA serine peptidase 1
1372336_at	-2.1	0.004124		
1394960_at	-2.1	0.007084	Sdr42e1	short chain dehydrogenase/reductase family 42E, member 1
1377744_at	-2.1	0.028519		
1389896_at	-2.1	0.030394		
1388397_at	-2.09	0.00143	Ebna1bp2	EBNA1 binding protein 2; probable rRNA-processing protein EBP2-like
1372158_at	-2.09	0.018988	Macro1	MACRO domain containing 1
1370202_at	-2.09	0.005155	Pla2g16	phospholipase A2, group XVI
1387830_at	-2.09	0.013945	Crp	C-reactive protein, pentraxin-related
1375357_at	-2.09	0.00767	Tor1a	torsin family 1, member A
1372724_at	-2.09	0.007638	Grina	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1 (glutamate binding)
1384407_at	-2.09	0.006449	Nmral1	NmrA-like family domain containing 1
1370282_at	-2.09	0.031467	Csrp2	cysteine and glycine-rich protein 2
1380102_at	-2.09	0.004656	Fam50a	family with sequence similarity 50, member A; protein FAM50A-like
1379730_at	-2.09	0.014636	Atp6v1h	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit H
1393411_at	-2.09	0.008794	Cfp	complement factor properdin
1374518_at	-2.09	0.006243	Dram2	DNA-damage regulated autophagy modulator 2
1371480_at	-2.09	0.00921	Cks1b	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
1369927_at	-2.09	0.007696	Mdh2	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
1386887_at	-2.09	0.007786	Cox5b	cytochrome c oxidase subunit Vb
1378927_at	-2.09	0.005664		
1371716_at	-2.09	0.006721	LOC685179	similar to SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin c2
1371396_at	-2.09	0.009423	LOC100365504	splicing factor 3B, 14 kDa subunit-like
1376537_at	-2.09	0.015939		
1393639_at	-2.08	0.008519	Myo10	myosin X

1371495_at	-2.08	0.02264	M6pr	cation-dependent mannose-6-phosphate receptor-like; mannose-6-phosphate receptor
1369868_at	-2.08	0.023622	Magt1	magnesium transporter 1
1398865_at	-2.08	0.0448	Unc50	unc-50 homolog (C. elegans)
1371645_at	-2.08	0.01804	Sdf2	stromal cell derived factor 2
1369852_at	-2.08	0.011802	F10	coagulation factor X
1371338_at	-2.08	0.006334	Psenen	presenilin enhancer gamma secretase subunit
1387223_at	-2.08	0.018128	Aadat	aminoadipate aminotransferase
1399098_at	-2.08	0.013214	Glo1	glyoxalase 1
1389782_at	-2.08	0.009238	RGD1305587	similar to RIKEN cDNA 2010107G23
1384538_at	-2.08	0.008635	Msto1	misato 1, mitochondrial distribution and morphology regulator
1398929_at	-2.08	0.041634	Eif3l	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit L
1374491_at	-2.08	0.011735	Cmtm8	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8
1391163_at	-2.08	0.007725	Eftud1	elongation factor Tu GTP binding domain containing 1
1372370_at	-2.08	0.025693	Rpusd4	RNA pseudouridylate synthase domain containing 4
1390527_at	-2.08	0.010268	RGD1562114	RGD1562114
1387284_at	-2.08	0.002702	Dpys	dihydropyrimidinase
1370921_at	-2.08	0.007725	Scamp3	secretory carrier membrane protein 3
1370378_at	-2.08	0.012003	Atp5a1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle
1381269_at	-2.08	0.013048		
1370918_a_at	-2.07	0.007786	Atp5c1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1
1388203_x_at	-2.07	0.017799	RT1-CE10	RT1 class I, locus CE10; RT1 class Ib, locus EC2
1387271_at	-2.07	0.024217	Phyh	phytanoyl-CoA 2-hydroxylase
1373787_at	-2.07	0.024611	Slc6a9	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9
1367455_at	-2.07	0.012003	Vcp	valosin-containing protein
1370511_at	-2.07	0.005983	Fgb	fibrinogen beta chain
1372438_at	-2.07	0.008787	Nit2	nitrilase family, member 2
1388566_at	-2.07	0.01134	Lasp1	LIM and SH3 protein 1
1372123_at	-2.07	0.010836	Sdhb	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp)
1389221_at	-2.07	0.015389	Mmd2	monocyte to macrophage differentiation-associated 2
1371475_at	-2.07	0.004232	Rnase4	ribonuclease, RNase A family 4
1371791_at	-2.07	0.007248	Surf4	surfeit 4
1373923_at	-2.07	0.005276		
1389422_at	-2.07	0.007336		
1380347_at	-2.07	0.007547		
1398988_at	-2.07	0.009558	LOC100911798	nucleoporin SEH1-like
1391730_at	-2.07	0.022913	LOC102550606	serine/arginine repetitive matrix protein 1-like
1398906_at	-2.06	0.004007	LOC287274	trafficking protein particle complex subunit 2-like; sedlin-like
1367834_at	-2.06	0.00798	Srm	hypothetical LOC100364487; spermidine synthase-like; spermidine synthase
1367609_at	-2.06	0.011756	Mif	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
1367643_at	-2.06	0.039786	Bsg	basigin (Ok blood group)
1368380_at	-2.06	0.004392	Vtn	vitronectin
1372829_at	-2.06	0.012824	Rbm8a	RNA binding motif protein 8A

1388748_at	-2.06	0.035529	Laptm4a	lysosomal protein transmembrane 4 alpha
1398909_at	-2.06	0.006066	LOC301124	hypothetical LOC301124
1373840_at	-2.06	0.019634	Nudt9	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 9
1379484_at	-2.06	0.007357	Aven	apoptosis, caspase activation inhibitor
1372305_at	-2.06	0.005305	Copz2	coatomer protein complex, subunit zeta 2
1372562_at	-2.06	0.013218	MGC94207	similar to RIKEN cDNA C030006K11
1370386_at	-2.06	0.036413	Ruvbl1	RuvB-like AAA ATPase 1
1371323_at	-2.06	0.01084	Ndufa4	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 4
1381336_at	-2.06	0.004007		
1383253_at	-2.06	0.00952		
1368600_at	-2.05	0.007357	Slc26a1	solute carrier family 26 (anion exchanger), member 1
1372813_at	-2.05	0.011385	Mien1	migration and invasion enhancer 1-like; similar to chromosome 17 open reading frame 37
1374323_at	-2.05	0.041416	Bccip	BRCA2 and CDKN1A interacting protein
1370475_at	-2.05	0.012506	Cyp2b3	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 3
1367531_at	-2.05	0.022812	Eif4h	eukaryotic translation initiation factor 4H
1370699_a_at	-2.05	0.00442	Pepd	peptidase D
1367804_at	-2.05	0.007564	Apcs	amyloid P component, serum
1367710_at	-2.05	0.01173	Psme2	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2
1372405_at	-2.05	0.034735	Ppp1r37	protein phosphatase 1, regulatory subunit 37
1386078_at	-2.05	0.007084	Slc35a1	solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member A1
1371663_at	-2.05	0.006395	Mfsd5	major facilitator superfamily domain containing 5
1371799_at	-2.05	0.004007	Gaa	glucosidase, alpha, acid
1377959_at	-2.05	0.018784	Fam32a	family with sequence similarity 32, member A
1382136_at	-2.05	0.009587	Slc2a9	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 9
1387786_at	-2.05	0.046322	Mtpn	myotrophin
1371368_at	-2.05	0.010215	Sec61a1	Sec61 alpha 1 subunit (<i>S. cerevisiae</i>)
1380854_at	-2.05	0.024063	Vegfb	vascular endothelial growth factor B
1398812_at	-2.05	0.013048	Psmb1	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 1
1377422_at	-2.05	0.016287		
1378141_at	-2.05	0.048202		
1372109_at	-2.04	0.00652	Pnkd	paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia
1374996_at	-2.04	0.00458	Nploc4	nuclear protein localization 4 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
1382003_at	-2.04	0.0357	Slc16a13	solute carrier family 16, member 13
1371312_at	-2.04	0.002388	Chchd2	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2
1377079_a_at	-2.04	0.02695	Ppox	protoporphyrinogen oxidase
1376249_at	-2.04	0.009094	Fuca2	fucosidase, alpha-L- 2, plasma
1369559_a_at	-2.04	0.045123	Cd47	Cd47 molecule
1373366_at	-2.04	0.020237	Ganab	glucosidase, alpha; neutral AB
1371777_at	-2.04	0.011175	Pabpc4	poly(A) binding protein, cytoplasmic 4
1384131_at	-2.04	0.020412	Atl2	atlastin GTPase 2
1388785_at	-2.04	0.005276	Dnal4	dynein, axonemal, light chain 4; similar to Dynein, axonemal, light chain 4
1381124_at	-2.04	0.01779	Slc25a15	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; ornithine transporter) member 15

1371929_at	-2.04	0.033714	Mlx	MLX, MAX dimerization protein
1384945_at	-2.04	0.039806	Fyttd1	forty-two-three domain containing 1
1374411_at	-2.04	0.01907	Mrpl52	mitochondrial ribosomal protein L52
1385828_at	-2.04	0.039807	Pradc1	protease-associated domain containing 1
1388398_at	-2.04	0.02616	Rps4y2	ribosomal protein S4, Y-linked 2
1368205_at	-2.04	0.004056	Cfi	complement factor I
1367903_at	-2.04	0.015698	Hmox2	heme oxygenase (decycling) 2
1367857_at	-2.04	0.004939	Fads1	fatty acid desaturase 1
1379592_at	-2.04	0.012214	Slc25a13	solute carrier family 25 (aspartate/glutamate carrier), member 13
1394431_at	-2.04	0.02886	Cdadcl1	cytidine and dCMP deaminase domain containing 1
1395815_at	-2.04	0.029206		
1387354_at	-2.03	0.008475	Stat1	signal transducer and activator of transcription 1
1374570_at	-2.03	0.012506	Agpat2	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2
1370808_at	-2.03	0.012437	Cyb5r3	cytochrome b5 reductase 3
1371662_at	-2.03	0.025311	Kars	lysyl-tRNA synthetase
1371392_at	-2.03	0.047513	Gpi	glucose-6-phosphate isomerase
1373732_at	-2.03	0.040505	Acp6	acid phosphatase 6, lysophosphatidic
1398777_at	-2.03	0.003568	Psm6	proteasome subunit beta type 6-like; proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 6
1398851_at	-2.03	0.006138	Ywhae	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon
1379243_at	-2.03	0.006449	Ndufa6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6 (B14)
1383175_a_at	-2.03	0.014062	Akip1	A kinase (PRKA) interacting protein 1
1387503_at	-2.03	0.005664	Cpn1	carboxypeptidase N, polypeptide 1
1374512_at	-2.03	0.025376	Glyctk	glycerate kinase
1367667_at	-2.03	0.00379	Fdps	farnesyl diphosphate synthase
1372844_at	-2.03	0.010542	Efna1	ephrin A1
1383999_at	-2.03	0.004216		
1383041_x_at	-2.03	0.006109	LOC102552818	uncharacterized LOC102552818
1393743_at	-2.03	0.022333		
1370836_at	-2.02	0.011165	Serpina4	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 4
1370609_a_at	-2.02	0.011177	Slc16a7	solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 7
1371008_at	-2.02	0.011526	Pmpca	peptidase (mitochondrial processing) alpha
1367887_at	-2.02	0.023311	Lcat	lecithin cholesterol acyltransferase
1378987_at	-2.02	0.02249	Mcu	mitochondrial calcium uniporter
1387058_at	-2.02	0.023735	Pctp	phosphatidylcholine transfer protein
1367599_at	-2.02	0.012135	Atp5g1	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9)
1379028_at	-2.02	0.007725	Spag7	sperm associated antigen 7
1371460_at	-2.02	0.010199	Cox14	cytochrome c oxidase assembly protein 14
1368453_at	-2.02	0.007357	Fads2	fatty acid desaturase 2
1369940_at	-2.02	0.020685	Taldo1	transaldolase 1
1392460_at	-2.02	0.00143	LOC100365089	rCG50929-like
1382108_at	-2.02	0.006243		
1375268_at	-2.02	0.006449	Rps27l	ribosomal protein S27-like

1377821_at	-2.02	0.006613		
1383835_at	-2.02	0.01635		
1377672_at	-2.02	0.018107		
1381347_at	-2.02	0.020412		
1379996_at	-2.02	0.037142		
1388217_a_at	-2.01	0.01565	Calu	calumenin
1371578_at	-2.01	0.027687	Prkaca	protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha
1388980_at	-2.01	0.007226	Lamtor1	late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1; RhoA activator
1387863_at	-2.01	0.026133	Csde1	cold shock domain containing E1, RNA binding; cold shock domain
1367557_s_at	-2.01	0.041355	Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase;
1367735_at	-2.01	0.004045	Acadl	acyl-CoA dehydrogenase, long chain
1370814_at	-2.01	0.004468	Dhrs4	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4
1388860_at	-2.01	0.029897	Mrpl22	mitochondrial ribosomal protein L22
1371809_at	-2.01	0.005748	Mrps18b	mitochondrial ribosomal protein S18B
1379673_at	-2.01	0.017372	Uap111	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1-like 1
1391907_at	-2.01	0.008787	Nags	N-acetylglutamate synthase
1374962_at	-2.01	0.006669	Rtn4ip1	reticulon 4 interacting protein 1
1394082_at	-2.01	0.044758	Psmc14	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14
1393604_at	-2.01	0.027726	Gpn3	GPN-loop GTPase 3
1388723_at	-2.01	0.007804	Bre	brain and reproductive organ-expressed (TNFRSF1A modulator)
1373162_at	-2.01	0.01112	Tmem41a	transmembrane protein 41a
1371959_at	-2.01	0.008519	Hist2h2aa3	histone cluster 2, H2aa3; similar to H2A histone family, member O
1367766_at	-2.01	0.005579	Nme2	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 2
1367945_at	-2.01	0.008161	Atox1	antioxidant 1 copper chaperone
1375549_at	-2.01	0.009386		
1373520_at	-2.01	0.01346		
1371506_at	-2.01	0.014752		
1380719_at	-2.01	0.018538		
1372051_at	-2.01	0.025801		
1385503_at	-2.01	0.041514	LOC678772	similar to O-acetyltransferase
1382783_at	-2.01	0.048893	Blm	Bloom syndrome, RecQ helicase-like
1379833_at	2.01	0.008787	Lingo4; Rorc	leucine rich repeat and Ig domain containing 4; RAR-related orphan receptor C
1383162_at	2.01	0.00995		
1372897_at	2.01	0.020663	Plod2	procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
1389234_at	2.01	0.029008	Vwf	von Willebrand factor
1369628_at	2.01	0.021159	Sv2b	synaptic vesicle glycoprotein 2b
1371560_at	2.01	0.010394	Irf3	interferon regulatory factor 3
1389415_at	2.01	0.007543	Rsbm1	round spermatid basic protein 1
1388433_at	2.01	0.028519	Krt19	keratin 19
1385109_at	2.01	0.008433	Taf1d	TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, D
1368383_at	2.01	0.023625	Npff	neuropeptide FF-amide peptide precursor
1397715_at	2.01	0.015863		

1378249_x_at	2.01	0.022085	LOC102554740	uncharacterized LOC102554740
1397606_at	2.01	0.027809		
1381708_at	2.01	0.028723		
1388452_at	2.01	0.038249		
1377833_at	2.01	0.046747	Rif1	Rap1 interacting factor 1 homolog (yeast)
1384853_at	2.01	0.048818	LOC102554754	uncharacterized LOC102554754
1374658_at	2.02	0.014991		
1397589_at	2.02	0.048157		
1386009_at	2.03	0.042083	Csf3r	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
1377702_at	2.03	0.004007	Lpar6	lysophosphatidic acid receptor 6
1395776_at	2.03	0.010617		
1374579_at	2.03	0.012464	Ccdc66	coiled-coil domain containing 66
1378448_at	2.03	0.026358		
1394400_at	2.03	0.038465		
1389340_at	2.04	0.006487	Zfp318	zinc finger protein 318
1382298_at	2.04	0.024347	Zbtb40	zinc finger and BTB domain containing 40
1379538_at	2.04	0.041355	Cenpj	centromere protein J
1390801_at	2.04	0.034626	Tmem252	transmembrane protein 252
1372911_at	2.04	0.017759	Mthfr	methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)
1373425_at	2.04	0.016139	Clk2	CDC-like kinase 2
1380155_at	2.04	0.008519		
1381665_at	2.04	0.011557		
1377840_at	2.04	0.013729	RGD1305202	similar to Protein C20orf160
1396654_at	2.04	0.015299		
1381576_at	2.04	0.022162		
1378495_at	2.04	0.026702		
1393029_at	2.04	0.029463		
1376322_at	2.04	0.034689	LOC102555582	uncharacterized LOC102555582
1388169_at	2.05	0.011312	Jmjd1c	jumonji domain containing 1C
1377653_at	2.05	0.014907	Syne2	spectrin repeat containing, nuclear envelope 2
1399028_at	2.05	0.040605	Zc3h11a	zinc finger CCCH-type containing 11A
1378740_at	2.05	0.032162	Rasal2	RAS protein activator like 2
1379355_at	2.05	0.010696	Man2a2	mannosidase, alpha, class 2A, member 2
1384512_at	2.05	0.007804	LOC100363441	hypothetical protein LOC100363441
1396097_at	2.05	0.01346		
1380250_at	2.05	0.013586		
1385118_at	2.05	0.022503		
1396872_at	2.05	0.02316		
1389205_at	2.05	0.035141	Lrch3	leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 3
1391974_at	2.05	0.045593		
1390360_a_at	2.06	0.022054	Safb2	scaffold attachment factor B2
1379481_at	2.06	0.007897	Pabpn1	poly(A) binding protein, nuclear 1

1390142_at	2.06	0.0187	Morc3	MORC family CW-type zinc finger 3
1371886_at	2.06	0.006673	Crat	carnitine O-acetyltransferase
1378161_at	2.06	0.010617		
1372345_at	2.06	0.022929		
1380750_at	2.06	0.035013		
1381840_at	2.06	0.045002		
1387030_at	2.07	0.007977	Abcc5	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 5
1374139_at	2.07	0.032912	Cdr2	cerebellar degeneration-related protein 2
1373630_at	2.07	0.009483	Iffo1	intermediate filament family orphan 1
1377719_a_at	2.07	0.00442		
1391941_at	2.07	0.01381	LOC100912988	uncharacterized LOC100912988; rho GTPase-activating protein 20-like
1375793_at	2.07	0.013889	Kmt2a	lysine (K)-specific methyltransferase 2A
1397101_at	2.07	0.01804		
1381600_at	2.07	0.026096	LOC102553843	uncharacterized LOC102546821; uncharacterized LOC102553843
1381363_at	2.07	0.044473		
1378251_at	2.08	0.006808	Trem1	triggering receptor expressed on myeloid cells-like 1
1369094_a_at	2.08	0.016193	Ptprs	protein tyrosine phosphatase, receptor type, S
1385697_at	2.08	0.049359	Ccnt2	cyclin T2
1392089_at	2.08	0.011151	Hcfc2	host cell factor C2
1379064_at	2.08	0.006083		
1392813_at	2.08	0.006205		
1396834_at	2.08	0.009235		
1393746_at	2.08	0.015911		
1378678_at	2.08	0.020674		
1380953_at	2.08	0.040029		
1392480_at	2.09	0.032081	Pabpn1	poly(A) binding protein, nuclear 1
1367985_at	2.09	0.019981	Alas2	aminolevulinate, delta-, synthase 2
1374630_at	2.09	0.02104	Clic3	chloride intracellular channel 3
1383141_a_at	2.09	0.011802	Cpsf7	cleavage and polyadenylation specific factor 7
1383879_at	2.09	0.019724	Prr15l	proline rich 15-like
1390083_at	2.09	0.005305		
1389137_at	2.09	0.008006		
1392956_at	2.09	0.019252	RGD1304868	similar to RIKEN cDNA 2810443J12
1388267_a_at	2.09	0.029391		
1378595_at	2.09	0.043726	LOC100912093	uncharacterized LOC100912093
1386907_at	2.1	0.009033	Eno3	enolase 3, beta, muscle
1383486_at	2.1	0.021901	Inhba	inhibin beta-A
1377192_a_at	2.1	0.00379	Cipx	caseinolytic mitochondrial matrix peptidase chaperone subunit
1396803_at	2.1	0.025935	Thoc2	THO complex 2
1388593_at	2.1	0.014302		
1383129_at	2.1	0.021289		
1377969_at	2.1	0.024928	LOC100910650	uncharacterized LOC100910650

1377664_at	2.11	0.031119	Cep170	centrosomal protein 170
1389360_at	2.11	0.027095	Fxyd3	FXD domain-containing ion transport regulator 3
1399100_at	2.11	0.016694	Ccnt2	cyclin T2
1375453_at	2.11	0.028734	Gpatch8	G patch domain containing 8
1377551_at	2.11	0.011209		
1384080_at	2.11	0.01752	Greb11	growth regulation by estrogen in breast cancer-like
1395130_at	2.11	0.019424		
1379881_at	2.11	0.030409		
1387917_at	2.12	0.010215	Tor1aip1	torsin A interacting protein 1
1393692_at	2.12	0.029045	Pcf11	PCF11 cleavage and polyadenylation factor subunit
1370099_at	2.12	0.012506	Fbxl20	F-box and leucine-rich repeat protein 20
1396927_at	2.12	0.007759		
1395942_at	2.12	0.031719		
1390145_at	2.12	0.045913		
1395902_at	2.12	0.046673		
1389278_at	2.13	0.012506	Tspyl2	TSPY-like 2
1398401_at	2.13	0.011181	Tdrd3	tudor domain containing 3
1372495_at	2.13	0.008381	Vps9d1	VPS9 domain containing 1
1372346_at	2.13	0.027985	Zfp513	zinc finger protein 513
1393822_at	2.13	0.034121	Tmcc3	transmembrane and coiled-coil domain family 3
1377701_at	2.13	0.029764	Zmym6	zinc finger, MYM-type 6
1380763_at	2.13	0.038028	Strbp	spermatid perinuclear RNA binding protein
1394717_at	2.13	0.009206		
1385556_at	2.13	0.010617	Szt2	seizure threshold 2 homolog (mouse)
1368050_at	2.14	0.030297	Ccnl1	cyclin L1; cyclin-L1-like
1376853_at	2.14	0.019997	Rpap3	RNA polymerase II associated protein 3
1395114_at	2.14	0.007638		
1390047_at	2.14	0.011256		
1378212_at	2.14	0.021254		
1371500_at	2.15	0.008562	Ltbp4	latent transforming growth factor beta binding protein 4
1397692_at	2.15	0.02518	Tia1	TIA1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein
1379226_at	2.15	0.005154	Aim1l	absent in melanoma 1-like
1392382_at	2.15	0.02518		
1385054_at	2.16	0.044516	LOC100360772	uncharacterized LOC100360772
1370510_a_at	2.16	0.015618	Arntl	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
1372301_at	2.16	0.015961	Aebp1	AE binding protein 1
1377868_at	2.16	0.005579	Gprasp2	G protein-coupled receptor associated sorting protein 2
1384343_at	2.16	0.00198		
1379818_at	2.16	0.012332		
1380891_at	2.16	0.021549		
1384432_at	2.17	0.012437	Zscan12	zinc finger and SCAN domain containing 12
1398428_at	2.17	0.010394		

1392093_at	2.17	0.024063		
1394547_at	2.17	0.034012		
1392523_at	2.18	0.004581	Son	Son DNA binding protein
1367865_at	2.18	0.01155	Marf1	similar to limkain b1; meiosis arrest female 1
1379211_at	2.18	0.026127	Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide
1383112_at	2.18	0.00891	Trps1	trichorhinophalangeal syndrome I
1373287_at	2.18	0.017384	Atoh8	atonal homolog 8 (Drosophila)
1397053_at	2.18	0.004975		
1390303_at	2.18	0.044765		
1395771_at	2.18	0.049813		
1377940_at	2.19	0.007234	Fam101b	family with sequence similarity 101, member B
1392965_a_at	2.19	0.005748	Smoc2	SPARC-related modular calcium-binding protein 2-like
1372615_at	2.19	0.007564	Aoc3	amine oxidase, copper containing 3
1382749_at	2.19	0.037579	Rbm5	RNA binding motif protein 5
1388292_at	2.19	0.01635		
1380027_at	2.19	0.020318		
1396531_at	2.19	0.025875		
1382989_at	2.19	0.037295		
1387190_at	2.2	0.019749	Dgka	diacylglycerol kinase, alpha
1367614_at	2.2	0.005611	Anxa1	annexin A1
1376200_at	2.2	0.044473	Mettl20	methyltransferase like 20
1391819_at	2.2	0.01753	Mfsd11	major facilitator superfamily domain containing 11
1379032_at	2.2	0.006813		
1378998_at	2.2	0.016968		
1377589_at	2.2	0.021742		
1382998_at	2.2	0.045542		
1373591_at	2.21	0.018012	Arfp2	ADP-ribosylation factor interacting protein 2
1393804_at	2.22	0.033988	Cspp1	centrosome and spindle pole associated protein 1
1376281_at	2.22	0.018493	Ccdc134	coiled-coil domain containing 134
1383728_at	2.23	0.026573	Naa16	N(alpha)-acetyltransferase 16, NatA auxiliary subunit
1371414_at	2.23	0.008409	Gsn	gelsolin
1398354_at	2.23	0.02217	Ctnnal1	catenin (cadherin associated protein), alpha-like 1
1396190_x_at	2.23	0.006692		
1392278_at	2.23	0.04424		
1384508_at	2.24	0.010726		
1398183_at	2.24	0.032591		
1396502_at	2.24	0.034713		
1395207_at	2.25	0.025199		
1379342_at	2.25	0.029052	Zfp692	zinc finger protein 692
1390850_at	2.26	0.012743		
1396596_at	2.26	0.020816		
1395359_at	2.26	0.021291		

1396157_at	2.26	0.022682		
1374981_at	2.27	0.021979	Aasdh	aminoadipate-semialdehyde dehydrogenase
1390423_at	2.28	0.01232	Mycbp2	MYC binding protein 2, E3 ubiquitin protein ligase
1387112_at	2.28	0.01779	Plp1	proteolipid protein 1
1374870_at	2.28	0.012418		
1397986_at	2.28	0.0192		
1390107_at	2.29	0.011614	SytI2	synaptotagmin-like protein 2-like; synaptotagmin-like 2
1388158_at	2.29	0.04249	Ddx39b	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39B
1383058_at	2.29	0.006243		
1378701_at	2.29	0.00996		
1396791_at	2.29	0.010416		
1393766_at	2.29	0.045913		
1374109_at	2.3	0.01139	Dgkq	diacylglycerol kinase, theta
1389436_at	2.3	0.042846	Mss51	MSS51 mitochondrial translational activator
1389913_at	2.3	0.045326	Lrrfip1	leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1
1384785_at	2.3	0.008986		
1372168_s_at	2.31	0.045857	Igfbp6	insulin-like growth factor binding protein 6
1381252_at	2.31	0.046299	Eri2	ERI1 exoribonuclease family member 2
1367661_at	2.31	0.005305	S100a6	S100 calcium binding protein A6
1374159_at	2.32	0.011175	Als2cl	ALS2 C-terminal like
1390370_at	2.32	0.008279		
1374417_at	2.32	0.017843	Nrbp2	nuclear receptor binding protein 2
1396252_at	2.32	0.040063		
1391152_at	2.33	0.048202	LOC302192	similar to RIKEN cDNA 1700001E04
1389620_at	2.33	0.007011	Suv420h2	suppressor of variegation 4-20 homolog 2 (Drosophila)
1389353_at	2.33	0.010448	Sema6d	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain
1379743_at	2.33	0.005618	Tubb1	tubulin, beta 1 class VI
1376240_at	2.33	0.00767	RGD1566399	similar to MYST histone acetyltransferase monocytic leukemia 4
1372760_at	2.33	0.024334	LOC100912411	uncharacterized LOC100912411
1384433_at	2.33	0.045857		
1395753_at	2.34	0.011011	Eln	elastin
1389160_at	2.34	0.014916	Ahsp	alpha hemoglobin stabilizing protein
1391407_at	2.34	0.007248		
1394817_at	2.34	0.013306		
1376996_at	2.34	0.017384		
1398115_at	2.35	0.01112		
1386587_at	2.35	0.021007	Slx4	SLX4 structure-specific endonuclease subunit
1385177_at	2.35	0.036526		
1378361_at	2.36	0.014892	Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7
1376525_at	2.36	0.020816	Khsrp	KH-type splicing regulatory protein
1393225_at	2.37	0.009971	Adamts10	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 10
1367718_at	2.37	0.013878	Chkb	choline kinase beta

1390733_at	2.37	0.011756		
1392262_at	2.37	0.014609		
1394581_at	2.37	0.030011		
1382551_at	2.38	0.009024	Itsn2	intersectin 2
1372868_at	2.38	0.007804	Tor3a	torsin family 3, member A
1381321_at	2.38	0.020065		
1374028_at	2.39	0.018843	Msantd2	Myb/SANT-like DNA-binding domain containing 2
1390628_at	2.39	0.010605		
1394714_at	2.39	0.016366		
1397489_at	2.39	0.020297		
1375707_at	2.4	0.01256		
1371703_at	2.41	0.00143	Ahnak	AHNAK nucleoprotein
1392692_at	2.41	0.008421		
1392017_at	2.41	0.043589		
1398411_at	2.42	0.016764		
1368028_at	2.43	0.022298	Prph	peripherin
1391732_at	2.43	0.013649		
1378167_at	2.43	0.026716		
1378442_at	2.44	0.021105		
1378015_at	2.45	0.037216	Ccl21	chemokine (C-C motif) ligand 21
1397761_at	2.45	0.008635		
1393564_at	2.46	0.011842	Dzip3	DAZ interacting zinc finger protein 3
1392723_at	2.46	0.008519	Ankrd17	ankyrin repeat domain 17
1395327_at	2.46	0.004216		
1390086_at	2.46	0.014539		
1375823_at	2.46	0.032849		
1390048_at	2.47	0.030093	Srrm2	serine/arginine repetitive matrix 2
1397749_at	2.47	0.012452		
1380818_at	2.47	0.018123		
1393662_at	2.47	0.019608		
1373515_at	2.48	0.00556	Lgalsl	lectin, galactoside-binding-like
1376867_at	2.48	0.028513	Lgalsl	lectin, galactoside-binding-like
1370549_at	2.48	0.025801	Vps45	vacuolar protein sorting 45 homolog (S. cerevisiae)
1377971_at	2.48	0.019026	LOC100911498	uncharacterized LOC100911498
1390703_at	2.48	0.020578		
1392567_at	2.49	0.004625		
1396729_at	2.49	0.007564	Fer1l5	fer-1-like 5 (C. elegans)
1383841_at	2.5	0.024651	Pwwp2a	PWWP domain containing 2A
1380263_at	2.5	0.033746	Fam193a	family with sequence similarity 193, member A
1383708_at	2.51	0.011359	Itgbl1	integrin, beta-like 1
1380727_at	2.51	0.005748		
1381754_at	2.51	0.018379	LOC102556290	nipped-B-like protein B-like

1379797_at	2.51	0.021973		
1380726_at	2.51	0.040641		
1393471_at	2.52	0.011576		
1382899_at	2.52	0.011864		
1380769_at	2.52	0.02309		
1387379_at	2.53	0.008225	Rock2	Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2
1398209_at	2.54	0.026174		
1370960_at	2.55	0.009033	Igfbp5	insulin-like growth factor binding protein 5
1392806_at	2.55	0.013449		
1381207_at	2.55	0.015329		
1381424_at	2.55	0.022616		
1377588_at	2.55	0.046408		
1381291_at	2.56	0.022515		
1379175_at	2.56	0.023025		
1375813_at	2.57	0.045071	Akap8l	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like
1384282_at	2.57	0.012111	Zscan21	zinc finger and SCAN domain containing 21
1372699_at	2.57	0.009196	Zfp775	zinc finger protein 775
1396530_at	2.57	0.007786		
1368128_at	2.58	0.00855	Pla2g2a	phospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid)
1392228_at	2.58	0.018575	Lrrn4	leucine rich repeat neuronal 4
1389199_at	2.58	0.00767	RGD1309079	similar to Ab2-095
1395819_at	2.58	0.012182		
1396850_at	2.58	0.024323		
1378945_at	2.58	0.028055		
1378738_at	2.59	0.019242	Kcnab1	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta member 1
1392188_at	2.59	0.034121		
1373718_at	2.6	0.002702	Tubb2a	tubulin, beta 2A class IIa
1368614_at	2.61	0.005243	Mlxipl	MLX interacting protein-like
1398154_at	2.61	0.009266		
1384738_at	2.62	0.010215		
1396759_at	2.62	0.015375		
1388557_at	2.63	0.005947	C7; Tubb4b	complement component 7; tubulin, beta 4B class IVb
1393252_at	2.64	0.019855		
1377801_at	2.65	0.006243	Slx4	SLX4 structure-specific endonuclease subunit
1378831_at	2.65	0.018791		
1395092_at	2.66	0.012336	Rbm39	RNA binding motif protein 39
1378038_at	2.66	0.014421		
1396102_at	2.66	0.048818		
1382504_at	2.67	0.017978	Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7
1369072_at	2.67	0.045464	Adh7	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide
1392177_at	2.67	0.004625		
1379164_at	2.67	0.019954		

1377114_at	2.67	0.02249		
1394451_at	2.68	0.021047		
1376760_at	2.69	0.013426	Paxbp1	PAX3 and PAX7 binding protein 1
1376645_at	2.7	0.036683	Medag	mesenteric estrogen-dependent adipogenesis
1395443_at	2.7	0.019237		
1381728_at	2.7	0.019343		
1380777_at	2.71	0.029764		
1385944_at	2.71	0.040029		
1373527_at	2.72	0.005231	Eml3	echinoderm microtubule associated protein like 3
1376124_at	2.72	0.010268	lqub	IQ motif and ubiquitin domain containing
1395839_at	2.72	0.012387	Zfp142	zinc finger protein 142
1371458_at	2.72	0.03552		
1384125_at	2.73	0.001953	Kmt2e	lysine (K)-specific methyltransferase 2E
1367940_at	2.73	0.008118	Cxcr7	chemokine (C-X-C motif) receptor 7
1393246_at	2.74	0.012783	Zmynd10	zinc finger, MYND-type containing 10
1380489_at	2.74	0.00891		
1381625_at	2.75	0.009558		
1371558_at	2.76	0.006312	Nisch	nischarin
1384380_at	2.77	0.009971		
1370973_at	2.78	0.015329	Scn7a	sodium channel, voltage-gated, type VII, alpha subunit
1392640_at	2.78	0.014173	Cry1	cryptochrome circadian clock 1
1393510_at	2.78	0.011195	Sybu	syntabulin (syntaxin-interacting)
1373699_at	2.79	0.01063		
1390657_at	2.79	0.018235		
1375217_at	2.8	0.016381		
1382489_at	2.82	0.002388	Phip	pleckstrin homology domain interacting protein
1398394_at	2.82	0.044579		
1384815_at	2.83	0.013306		
1374621_at	2.84	0.007725	Taf1c	TATA box binding protein (Tbp)-associated factor, RNA polymerase I, C
1388039_a_at	2.86	0.010154	Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1
1394569_at	2.86	0.013048		
1377762_at	2.86	0.015712		
1397222_at	2.86	0.04394		
1396403_at	2.87	0.003639	RGD1311595	similar to KIAA2026 protein
1397378_at	2.88	0.008161		
1396470_at	2.88	0.009156		
1388502_at	2.9	0.00442	Inpp5b	inositol polyphosphate-5-phosphatase B
1382742_at	2.91	0.007901		
1387154_at	2.92	0.006109	Npy	pro-neuropeptide Y-like; neuropeptide Y
1368395_at	2.92	0.011177	Gpc3	glypican 3
1391481_at	2.92	0.011672		
1374263_at	2.92	0.014777		

1395516_at	2.93	0.006109	Arglu1	arginine and glutamate rich 1
1371250_at	2.93	0.004124	Pf4	platelet factor 4
1396559_at	2.95	0.020065		
1393335_at	2.97	0.014754	Egfl6	EGF-like-domain, multiple 6
1379936_at	2.97	0.014898		
1395278_at	2.97	0.028362		
1389564_at	2.98	0.015939	Ccnl2	cyclin L2
1397150_at	2.98	0.02596		
1390263_at	2.99	0.028262	Gnas	GNAS complex locus
1377303_at	3.01	0.01542		
1385231_at	3.02	0.004682		
1385355_at	3.02	0.01481		
1384277_at	3.03	0.005748	Plekhh1	pleckstrin homology domain containing, family H (with MyTH4 domain) member 1
1375043_at	3.03	0.010389		
1382448_at	3.03	0.024498		
1389957_at	3.06	0.005579	Ttc3	tetratricopeptide repeat domain 3
1385713_at	3.1	0.015125	Akap8l	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like
1388684_at	3.11	0.012119	Fnbp4	formin binding protein 4
1390375_at	3.11	0.004526	Akap8l	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like
1381868_at	3.11	0.03846		
1377323_at	3.12	0.006824	Pla2g4b	phospholipase A2, group IVB (cytosolic)
1383239_at	3.13	0.012452	Zcchc7	zinc finger, CCHC domain containing 7
1370912_at	3.13	0.002388	Hspa1a	heat shock 70kD protein 1A
1368247_at	3.14	0.006395	Hspa1a; Hspa1b	heat shock 70kD protein 1A; heat shock 70kD protein 1B (mapped)
1383517_at	3.14	0.016381		
1373260_at	3.16	0.006205	Caprin2	caprin family member 2
1396373_at	3.19	0.014692		
1397286_at	3.2	0.024611		
1380285_at	3.22	0.023782	Chrd	chordin
1368452_at	3.23	0.006692	Abcc6	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 6
1368441_at	3.24	0.015896	Msln	mesothelin
1371595_at	3.24	0.00981	LOC100912446	uncharacterized LOC100912446
1389690_at	3.25	0.020445	Ooep	oocyte expressed protein
1383913_at	3.26	0.015838	LOC100911719	uncharacterized LOC100911719
1378618_at	3.28	0.036727		
1394562_at	3.29	0.00755		
1386718_at	3.3	0.015508	Akr1c19	aldo-keto reductase family 1, member C19
1396397_at	3.33	0.007638		
1378062_at	3.35	0.024927		
1375263_at	3.36	0.021932		
1377377_at	3.36	0.025465		
1378825_a_at	3.37	0.009926	Dennd4b	DENN/MADD domain containing 4B

1380001_at	3.39	0.018415	Pnn	pinin, desmosome associated protein
1384967_at	3.41	0.006243		
1394330_at	3.43	0.020908		
1373773_at	3.44	0.017822	Gpm6a	glycoprotein m6a
1394557_at	3.48	0.008118		
1376313_at	3.49	0.016241	Tpcn2	two pore segment channel 2
1390112_at	3.5	0.011986	Efemp1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
1381283_at	3.52	0.01219		
1384452_at	3.52	0.020073		
1382976_at	3.53	0.027908		
1368035_a_at	3.56	0.007357	Ptpnf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
1398861_at	3.56	0.002658	Nxf1	nuclear RNA export factor 1
1378960_at	3.56	0.007725		
1394572_at	3.56	0.044719		
1383875_at	3.57	0.01048	Upk1b	uroplakin 1B
1391770_at	3.57	0.028592		
1388924_at	3.59	0.002388	Angptl4	angiopoietin-like 4
1398691_at	3.61	0.013378		
1383409_at	3.66	0.016139	LOC100911221	uncharacterized LOC100911221
1379150_at	3.69	0.012851		
1382764_at	3.69	0.042798		
1383691_at	3.71	0.02249		
1396225_at	3.77	0.009447		
1395762_at	3.78	0.009385		
1393759_at	3.83	0.012437		
1392368_at	3.83	0.012135		
1384146_at	3.87	0.011756		
1396763_at	3.89	0.025801		
1378347_at	3.9	0.009423		
1378682_at	3.9	0.014923		
1391006_at	4.03	0.015381		
1381555_at	4.08	0.006395		
1387312_a_at	4.09	0.007897	Gck	glucokinase
1390300_at	4.09	0.010011		
1392795_at	4.12	0.015712		
1381714_at	4.15	0.046315		
1396410_at	4.18	0.007725		
1395837_at	4.23	0.013157		
1381732_at	4.28	0.011802		
1387134_at	4.31	0.011177	Slfn3	schlafen 3
1397624_at	4.31	0.013055		
1382982_at	4.31	0.030076		

1387908_at	4.36	0.015117	Rasd1	RAS, dexamethasone-induced 1
1368036_at	4.38	0.006243	Ptpnf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
1374364_at	4.38	0.00971	Fam193b	family with sequence similarity 193, member B
1380837_at	4.38	0.008042		
1381420_at	4.48	0.036788		
1381620_at	4.5	0.010831		
1379957_at	4.53	0.010617	Slfn13	schlafen family member 13
1391843_at	4.54	0.010454		
1380858_at	4.57	0.00379		
1383439_at	4.67	0.004392	Npas2	neuronal PAS domain protein 2
1379834_at	4.75	0.006864		
1378434_at	4.78	0.009731		
1392846_at	4.87	0.015262		
1380807_at	5.02	0.006553		
1394729_at	5.19	0.028136		
1397722_at	5.33	0.017917		
1398566_at	5.48	0.012232		
1368692_a_at	5.55	0.00633	Chka	choline kinase alpha
1381753_at	5.73	0.016955		
1381175_at	5.77	0.016431	Sltm	SAFB-like, transcription modulator
1380464_at	6.16	0.006015		
1395845_at	6.86	0.014021		
1382681_at	7.52	0.008037		

Genes diferenciales en los machos 67mg_90d del estudio A de toxicidad aguda de 90 días (se ordenan según la tasa de cambio, FC).

Transcript ID	FC	FDR	Gene Symbol	Description
1381811_at	-6.03	0.004146		
1368303_at	-4.63	0.019434	Per2	period circadian clock 2
1371400_at	-4.28	0.018714	Thrsp	thyroid hormone responsive
1375549_at	-3.42	0.038228		
1393084_at	-3.22	0.018714	Hrasls	HRAS-like suppressor
1390430_at	-3.01	0.038228	Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1370541_at	-2.93	0.018714	Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1382232_at	-2.13	0.019434	Gpt2	glutamic pyruvate transaminase (alanine aminotransferase) 2
1382848_at	2.16	0.043286		
1374244_at	2.2	0.033882	LOC501038	Ab2-060
1390832_at	2.94	0.033581	Tmcc3	transmembrane and coiled-coil domain family 3
1377192_a_at	3.18	0.038228	Clpx	caseinolytic mitochondrial matrix peptidase chaperone subunit
1390850_at	3.56	0.038228		
1372727_at	3.6	0.019434		
1390383_at	4.15	0.033581	Plin2	perilipin 2

1374531_at	4.18	0.006635	Slc6a6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 6
1389377_at	4.27	0.00784	Insig2	insulin induced gene 2
1379411_at	4.42	0.018452	LOC100911353	uncharacterized LOC100911353
1373718_at	5.06	0.004139	Tubb2a	tubulin, beta 2A class IIa
1393690_at	5.22	0.033581	Insig2	insulin induced gene 2
1377014_at	8.16	0.013069	Nim1k	NIM1 serine/threonine protein kinase

Genes diferenciales en los machos 48mg_90d del estudio B de toxicidad aguda de 90 días (se ordenan según la tasa de cambio, FC).

Transcript ID	FC	FDR	Gene Symbol	Description
1387156_at	-22.4	0.014533	Hsd17b2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
1387874_at	-18.36	0.020325	Dbp	D site of albumin promoter (albumin D-box) binding protein
1369226_at	-7.11	0.037481	Kng2	kininogen 2
1388202_at	-6.1	0.039302	RT1-EC2	RT1 class Ib, locus EC2
1378745_at	-5.92	0.027204	Per3	period circadian clock 3
1385374_at	-5.62	0.027204	Tef	thyrotrophic embryonic factor
1370816_at	-5.43	0.023497	Nr1d1	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
1370541_at	-5.25	0.027148	Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1387336_at	-4.72	0.023497	Nat8	N-acetyltransferase 8
1371400_at	-4.56	0.020325	Thrsp	thyroid hormone responsive
1388203_x_at	-4.37	0.036387	RT1-CE10; RT1-EC2	RT1 class I, locus CE10; RT1 class Ib, locus EC2
1390430_at	-4.3	0.023497	Nr1d2	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2
1373975_at	-3.74	0.032403	Inmt	indolethylamine N-methyltransferase
1371143_at	-3.67	0.038117	Serpina7	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7
1370007_at	-3.54	0.032584	Pdia4	protein disulfide isomerase family A, member 4
1394304_at	-3.53	0.03281		
1384312_at	-3.34	0.031954	Irx1	iroquois homeobox 1
1368621_at	-3.34	0.027443	Aqp9	aquaporin 9
1370806_at	-3.32	0.031954	Retsat	retinol saturase (all trans retinol 13,14 reductase)
1389014_at	-3.31	0.033827	Nampt	nicotinamide phosphoribosyltransferase
1368458_at	-3.18	0.027204	Cyp7a1	cytochrome P450, family 7, subfamily a, polypeptide 1
1374625_at	-3.04	0.014203	Hes6	hes family bHLH transcription factor 6
1385839_x_at	-3.04	0.031887	Tm2d1	TM2 domain containing 1
1387703_a_at	-2.97	0.029917	Usp2	ubiquitin specific peptidase 2
1374303_at	-2.96	0.037953	Alkbh2	alkB, alkylation repair homolog 2 (E. coli)
1377666_at	-2.91	0.019923	Chdh	choline dehydrogenase
1385707_at	-2.89	0.038117	Lect2	leukocyte cell-derived chemotaxin 2
1372704_at	-2.84	0.037191	Ostc	oligosaccharyltransferase complex subunit (non-catalytic)
1373777_at	-2.83	0.031843	Rgs16	regulator of G-protein signaling 16
1388071_x_at	-2.77	0.030201	RT1-EC2	RT1 class Ib, locus EC2
1374176_at	-2.76	0.048334	Lurap1l	leucine rich adaptor protein 1-like
1381811_at	-2.76	0.03281		

1388587_at	-2.75	0.030456	Ier3	immediate early response 3
1373512_at	-2.74	0.042515	Ilvbl	ilvB (bacterial acetolactate synthase)-like
1388146_at	-2.74	0.034066	LOC100912222	uncharacterized LOC100912222
1368191_a_at	-2.68	0.020325	Slc22a1	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1
1393516_at	-2.68	0.027847	Slc16a12	solute carrier family 16, member 12
1388271_at	-2.65	0.02742	Mt2A	metallothionein 2A
1372026_at	-2.65	0.03281	RGD1359310	similar to RIKEN cDNA 9430023L20
1387116_at	-2.64	0.025426	Dnajb9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9
1383826_at	-2.64	0.037508	Rab40b	Rab40b, member RAS oncogene family
1387915_at	-2.63	0.049818	Vimp	VCP-interacting membrane protein
1368059_at	-2.62	0.024089	Crym	crystallin, mu
1390587_x_at	-2.62	0.023497	LOC102549923	zinc finger protein 120-like; zinc finger protein 91-like
1390802_at	-2.6	0.042442	Plgrkt	plasminogen receptor, C-terminal lysine transmembrane protein
1368303_at	-2.59	0.04173	Per2	period circadian clock 2
1367795_at	-2.58	0.030089	Ifrd1	interferon-related developmental regulator 1
1373918_at	-2.58	0.042515	Rdh11	retinol dehydrogenase 11 (all-trans/9-cis/11-cis)
1385585_at	-2.57	0.023497	LOC690286	similar to hepatic leukemia factor
1370350_x_at	-2.57	0.042515	LOC100912870; Rup2	urinary protein 2-like; urinary protein 2
1390455_at	-2.56	0.036208	Abhd2	abhydrolase domain containing 2
1368435_at	-2.55	0.022565	Cyp8b1	cytochrome P450, family 8, subfamily b, polypeptide 1
1375362_at	-2.55	0.03281	Sppl2a	signal peptide peptidase-like 2A
1387669_a_at	-2.55	0.038555	Ephx1	epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)
1373890_at	-2.53	0.024089	Chchd5	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 5
1368290_at	-2.53	0.042515	Cyr61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
1368400_at	-2.53	0.049597	Timm8a1	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog A1 (yeast)
1373207_at	-2.53	0.027466	Cers6	ceramide synthase 6
1378138_at	-2.52	0.023497	Kif16b	kinesin family member 16B
1388857_at	-2.52	0.038919	Sec23b	Sec23 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
1375879_at	-2.52	0.026206		
1393831_at	-2.51	0.037508	Hykk	hydroxylysine kinase
1377015_at	-2.51	0.022584		
1371147_at	-2.5	0.032313	Serpina3m	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 3M
1367879_at	-2.5	0.048974	Cdk5rap3	CDK5 regulatory subunit associated protein 3
1368446_at	-2.5	0.020325	Spink3	serine peptidase inhibitor, Kazal type 3
1376437_at	-2.5	0.034611	LOC100910823	derlin-2-like
1373810_at	-2.49	0.024632	Pla2g12a	phospholipase A2, group XIIA
1392498_at	-2.49	0.027148	Ppp2r5c	protein phosphatase 2, regulatory subunit B', gamma
1370359_at	-2.47	0.027204	Amy1a	amylase, alpha 1A (salivary)
1371782_at	-2.47	0.028704	Nipsnap3b	nipsnap homolog 3B (<i>C. elegans</i>)
1388904_at	-2.46	0.019923		
1381386_at	-2.44	0.029455		
1384275_at	-2.44	0.034611	Znf750	zinc finger protein 750

1367765_at	-2.43	0.03281	Tcn2	transcobalamin 2
1389034_at	-2.41	0.047588	Usp18	ubiquitin specific peptidase 18
1376537_at	-2.41	0.03541		
1398879_at	-2.4	0.020325	Tmem66	transmembrane protein 66
1373037_at	-2.39	0.039572	Ube2l6	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6
1376733_at	-2.39	0.029064	Igsf11	immunoglobulin superfamily, member 11
1388734_at	-2.39	0.015304	LOC102546572	zinc finger protein 709-like
1368695_at	-2.38	0.02609	C4bpb	complement component 4 binding protein, beta
1371355_at	-2.38	0.020325	Ndufa8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 8
1371590_s_at	-2.38	0.031954	Ubl5	ubiquitin-like 5
1373790_at	-2.38	0.029022	Car14	carbonic anhydrase 14
1392946_at	-2.37	0.020375	Il1r1	interleukin 1 receptor, type I
1367927_at	-2.36	0.037508	LOC688815; Phb	similar to prohibitin; prohibitin
1368328_at	-2.35	0.019923	Gys2	glycogen synthase 2
1388851_at	-2.35	0.027204	Hspa9; LOC100912578	heat shock protein 9; stress-70 protein, mitochondrial-like
1387868_at	-2.35	0.04173	Lbp	lipopolysaccharide binding protein
1399146_at	-2.35	0.04173	Dolk	dolichol kinase
1370191_at	-2.34	0.049818	Azin1	antizyme inhibitor 1
1388683_at	-2.34	0.019923	Naa38	N(alpha)-acetyltransferase 38, NatC auxiliary subunit
1374892_at	-2.34	0.040041	Sat2	spermidine/spermine N1-acetyltransferase family member 2
1374478_at	-2.34	0.03641	RGD1305347	similar to RIKEN cDNA 2610528J11
1368943_at	-2.33	0.027204	Rnase4	ribonuclease, RNase A family 4
1387599_a_at	-2.32	0.028148	Nqo1	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
1370881_at	-2.32	0.043411	Tst	thiosulfate sulfurtransferase
1398752_at	-2.31	0.048379	sep-15	selenoprotein 15
1388103_at	-2.31	0.041929	Tmem37	transmembrane protein 37
1371580_at	-2.31	0.030958	Erlin1	ER lipid raft associated 1
1376807_at	-2.31	0.042833	Rabl3	RAB, member of RAS oncogene family-like 3
1394020_at	-2.31	0.041334		
1369225_at	-2.3	0.040733	Kng2	kininogen 2
1398966_at	-2.3	0.02617	LOC687029	similar to differentially expressed in B16F10 1
1372948_at	-2.3	0.029022	Mrp63	mitochondrial ribosomal protein 63
1387038_at	-2.3	0.036208	Ccs; LOC100911589	copper chaperone for superoxide dismutase; copper chaperone for superoxide dismutase-like
1371579_at	-2.3	0.028704		
1398933_at	-2.29	0.029064	Higd2a	HIG1 hypoxia inducible domain family, member 2A
1373963_at	-2.29	0.041071	Hdhd3	haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 3
1387259_at	-2.29	0.040119	Cdh2	cadherin 2
1375268_at	-2.29	0.020325	Rps27l	ribosomal protein S27-like
1385110_at	-2.29	0.047588		
1368790_at	-2.28	0.036208	Serpina10	protein Z-dependent protease inhibitor-like; serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin)
1370859_at	-2.28	0.0297	Pdia6	protein disulfide isomerase family A, member 6
1372254_at	-2.28	0.035829	Serping1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1

1368447_x_at	-2.27	0.041071	Spink3	serine peptidase inhibitor, Kazal type 3
1368497_at	-2.27	0.021416	Abcc2	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 2
1388626_at	-2.27	0.036339	Ddrgrk1	DDRGK domain containing 1
1392460_at	-2.27	0.017091	LOC100365089	rCG50929-like
1376690_at	-2.27	0.039313	Med21	mediator complex subunit 21
1379853_at	-2.26	0.031925	Hspb11	heat shock protein family B (small), member 11
1388428_at	-2.25	0.027204	Dtd1	D-tyrosyl-tRNA deacylase 1
1372352_at	-2.25	0.032964	Manf	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor
1368275_at	-2.25	0.048113	Msmo1	methylsterol monooxygenase 1
1380360_at	-2.25	0.036334	Oma1	OMA1 zinc metallopeptidase
1390111_at	-2.25	0.037508	Fam91a1	family with sequence similarity 91, member A1
1376089_at	-2.25	0.020325		
1374323_at	-2.24	0.022584	Bccip	BRCA2 and CDKN1A interacting protein
1373686_at	-2.24	0.022584	Serpina6	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 6
1371720_at	-2.24	0.027204	Mrpl20	mitochondrial ribosomal protein L20
1379422_at	-2.23	0.028941	Alg13	asparagine-linked glycosylation 13
1388463_at	-2.23	0.035337	Tex264	testis expressed 264
1374662_at	-2.23	0.038018	Slc35a1	solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member A1
1383665_at	-2.23	0.043736	Lpin2	lipin 2
1370226_at	-2.22	0.027204	Cstb	cystatin B (stefin B)
1371523_at	-2.22	0.047076	Comm1d1	copper metabolism (Murr1) domain containing 1
1383587_at	-2.22	0.027204	Ptplad1	protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 1
1388983_at	-2.21	0.029865	RGD1305045	similar to hypothetical protein
1367818_at	-2.21	0.017091	Coq3	coenzyme Q3 methyltransferase
1383392_at	-2.21	0.020325	C2; Cfb	complement component 2; complement factor B
1372893_at	-2.21	0.044942	Yip1	Yip1 domain family, member 1
1370134_at	-2.21	0.035829	Slc33a1	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1
1373625_at	-2.2	0.033822	Shmt1	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)
1376868_at	-2.2	0.039572	Cobl1	cordons-bleu WH2 repeat protein-like 1
1371634_at	-2.2	0.044906	Tmem126a	transmembrane protein 126A
1389140_at	-2.2	0.042515	Spcs2	signal peptidase complex subunit 2 homolog (S. cerevisiae)
1399107_at	-2.2	0.033768	Smim8	small integral membrane protein 8
1375209_at	-2.2	0.032584	Osbpl11	oxysterol binding protein-like 11
1368121_at	-2.19	0.042442	Akr7a3	aldo-keto reductase family 7, member A3 (aflatoxin aldehyde reductase)
1398359_at	-2.19	0.047313	Rnf181	ring finger protein 181
1376581_at	-2.19	0.027204	Dtd2	D-tyrosyl-tRNA deacylase 2
1367500_at	-2.19	0.037508	Shfm1	split hand/foot malformation (ectrodactyly) type 1
1367741_at	-2.19	0.038355	Herpud1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1
1383999_at	-2.19	0.027807		
1374650_at	-2.18	0.04173	Nedd9	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
1369991_at	-2.17	0.042487	Sec11a	SEC11 homolog A (S. cerevisiae)
1367843_at	-2.17	0.039194	Akr7a2	aldo-keto reductase family 7, member A2 (aflatoxin aldehyde reductase)

1375634_at	-2.17	0.030958	Ccdc53	coiled-coil domain containing 53
1368552_at	-2.17	0.036	Grpel1	GrpE-like 1, mitochondrial
1367541_at	-2.16	0.049608	Mettl5	methyltransferase like 5
1387636_a_at	-2.15	0.019923	Tmem14c	transmembrane protein 14C
1368593_at	-2.15	0.042442	Cd1d1	CD1d1 molecule
1397205_at	-2.15	0.031954	Dhrs7; LOC100364391	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7; dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7-like
1377730_at	-2.15	0.04765	RGD1310769	similar to HSPC288
1371521_at	-2.15	0.017091	Sin3b	SIN3 transcription regulator family member B
1388777_at	-2.15	0.038375	Ssr3	signal sequence receptor, gamma
1369996_at	-2.15	0.036208	Polr2f	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F
1370321_at	-2.15	0.035989	Aifm1	apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1
1370149_at	-2.14	0.03725	Asgr1	asialoglycoprotein receptor 1
1367632_at	-2.14	0.04046	Glul	glutamate-ammonia ligase
1387221_at	-2.14	0.035829	Gch1	GTP cyclohydrolase 1
1370454_at	-2.14	0.041957	Homer1	homer homolog 1 (Drosophila)
1373058_at	-2.14	0.037454	Tmem30a	transmembrane protein 30A
1378196_at	-2.14	0.036094	Slc43a1	solute carrier family 43 (amino acid system L transporter), member 1
1386877_at	-2.14	0.023497	Ap2s1	adaptor-related protein complex 2, sigma 1 subunit
1367677_at	-2.13	0.035569	Prdx5	peroxiredoxin 5
1367769_at	-2.13	0.038919	Polr2g	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G
1368311_at	-2.13	0.048772	Mgmt	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
1377252_at	-2.13	0.043145	Smg8	SMG8 nonsense mediated mRNA decay factor
1399073_at	-2.13	0.03541	Otub1; RGD1565010	OTU deubiquitinase, ubiquitin aldehyde binding 1; similar to HSPC263
1372455_at	-2.13	0.032782	Tspan12	tetraspanin 12
1370428_x_at	-2.12	0.043874	RT1-A2; RT1-A3; RT1-EC2	RT1 class Ia, locus A2; RT1 class I, locus A3; RT1 class Ib, locus EC2
1389302_at	-2.12	0.047707	Ino80c	INO80 complex subunit C
1375529_at	-2.12	0.037078	Cbr4	carbonyl reductase 4
1367468_at	-2.12	0.027204	Scand1	SCAN domain-containing 1
1388583_at	-2.11	0.039572	Cxcl12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
1393361_at	-2.11	0.044805	Snrnp25	small nuclear ribonucleoprotein 25 (U11/U12)
1371658_at	-2.11	0.036094	Emc8	ER membrane protein complex subunit 8
1369975_at	-2.11	0.037911	Trnau1ap	tRNA selenocysteine 1 associated protein 1
1381190_at	-2.1	0.027847	Lmo7	LIM domain 7
1390500_at	-2.1	0.035039	Aftph	aftiphilin
1367585_a_at	-2.1	0.028148	Atp1a1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, alpha 1 polypeptide
1375924_at	-2.1	0.026206	Fabp12	fatty acid binding protein 12
1394003_at	-2.09	0.034301	LOC100362333; Pole3	DNA-directed DNA polymerase epsilon 3; polymerase (DNA directed), epsilon 3, accessory subunit
1386871_at	-2.09	0.027204	Gpx4	glutathione peroxidase 4
1374254_a_at	-2.09	0.047588	Tmem205	transmembrane protein 205
1376792_at	-2.09	0.031954	Eva1a	eva-1 homolog A
1398946_at	-2.09	0.048707	Mrps16	mitochondrial ribosomal protein S16
1375056_at	-2.08	0.036334	Ociad2	OCIA domain containing 2

1369788_s_at	-2.08	0.027466	Jun	jun proto-oncogene
1370202_at	-2.08	0.042515	Pla2g16	phospholipase A2, group XVI
1370224_at	-2.08	0.029022	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
1388300_at	-2.08	0.038919	Mgst3	microsomal glutathione S-transferase 3
1390125_at	-2.08	0.038375	Tm9sf1	transmembrane 9 superfamily member 1
1395815_at	-2.08	0.017091		
1372368_at	-2.08	0.027204		
1377831_at	-2.08	0.027204		
1377310_at	-2.08	0.047588		
1398831_at	-2.07	0.022584	Psemb4	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 4
1370950_at	-2.07	0.047667	Ppap2b	phosphatidic acid phosphatase type 2B
1388410_at	-2.07	0.027204	Ugp2	UDP-glucose pyrophosphorylase 2
1368762_at	-2.07	0.032584	Ubd	ubiquitin D
1371780_at	-2.07	0.031887	Kdelr2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2
1388930_at	-2.07	0.037971	Tmem123	transmembrane protein 123
1389524_at	-2.06	0.029022	Ythdf3	YTH domain family, member 3
1368863_at	-2.05	0.032407	Nme3	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase 3
1371647_at	-2.05	0.04721	Tm9sf3	transmembrane 9 superfamily member 3
1389381_at	-2.05	0.030433	Sqstm1	sequestosome 1
1386990_at	-2.05	0.042443	Ebp	emopamil binding protein (sterol isomerase)
1370086_at	-2.05	0.021416	Fgg	fibrinogen gamma chain
1370232_at	-2.05	0.035444	Ivd	isovaleryl-CoA dehydrogenase
1367999_at	-2.05	0.022565	Aldh2	aldehyde dehydrogenase 2 family (mitochondrial)
1389296_at	-2.05	0.030958	Emc2	ER membrane protein complex subunit 2
1398750_at	-2.05	0.047668	Calr	calreticulin
1368360_at	-2.05	0.038375	Plg	plasminogen
1372261_at	-2.05	0.027443		
1392897_at	-2.04	0.041334		
1371073_at	-2.04	0.03281	B4galt1	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1
1375516_at	-2.04	0.029022	Ndufc2	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2
1368230_a_at	-2.04	0.039302	Ndufaf3	NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 3
1372599_at	-2.03	0.019923	Mgst2	microsomal glutathione S-transferase 2
1372813_at	-2.03	0.034702	Mien1	migration and invasion enhancer 1-like; similar to chromosome 17 open reading frame 37;
1382440_at	-2.03	0.042946	Daglb	diacylglycerol lipase, beta
1373947_at	-2.03	0.049207	Dpt	dermatopontin
1369986_at	-2.03	0.024007	Hagh	hydroxyacyl glutathione hydrolase
1388326_at	-2.03	0.027204	Ndufs8	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8
1372156_at	-2.03	0.045686	Tmem97	transmembrane protein 97
1367656_at	-2.03	0.039285	Psemb7	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 7
1375977_at	-2.02	0.039572	Cetn2	centrin, EF-hand protein, 2
1374439_at	-2.02	0.022584	Yipf3	Yip1 domain family, member 3
1372130_at	-2.02	0.043668	Arfgef1	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1 (brefeldin A-inhibited)

1396203_at	-2.02	0.027466	Mios	missing oocyte, meiosis regulator, homolog (Drosophila)
1387856_at	-2.02	0.028269	Cnn3	calponin 3, acidic
1398260_a_at	-2.02	0.035569	Serpind1	serpin peptidase inhibitor, clade D (heparin cofactor), member 1
1387816_at	-2.01	0.027466	Igfals	insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit
1388679_at	-2.01	0.037191	Tbc1d14	TBC1 domain family, member 14
1382325_at	-2.01	0.023497	Gcat; LOC100910685	glycine C-acetyltransferase; 2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase, mitochondrial-like
1373011_at	-2.01	0.027204	Fam134b	family with sequence similarity 134, member B
1388593_at	2.01	0.040252		
1391525_at	2.01	0.040997		
1395092_at	2.02	0.042456	Rbm39	RNA binding motif protein 39
1391006_at	2.03	0.037508		
1396225_at	2.04	0.037508		
1382742_at	2.04	0.037508		
1390360_a_at	2.05	0.020325	Safb2	scaffold attachment factor B2
1390048_at	2.05	0.03281	Srrm2	serine/arginine repetitive matrix 2
1371884_at	2.05	0.03281	Ttc3	tetratricopeptide repeat domain 3
1382500_at	2.06	0.029064		
1373260_at	2.07	0.037191	Caprin2	caprin family member 2
1383359_at	2.08	0.034852	Lnx2	ligand of numb-protein X 2
1384380_at	2.08	0.048707		
1375774_at	2.09	0.035989		
1380285_at	2.1	0.038375	Chrd	chordin
1397370_at	2.1	0.042442		
1383239_at	2.11	0.04765	Zcchc7	zinc finger, CCHC domain containing 7
1384098_at	2.12	0.035173	Rnf125	ring finger protein 125
1382551_at	2.14	0.045121	Itsn2	intersectin 2
1390383_at	2.14	0.028704	Plin2	perilipin 2
1394817_at	2.14	0.04912		
1390423_at	2.16	0.041705	Mycbp2	MYC binding protein 2, E3 ubiquitin protein ligase
1367718_at	2.16	0.038919	Chkb	choline kinase beta
1372868_at	2.16	0.037508	Tor3a	torsin family 3, member A
1383315_at	2.17	0.028119	Tsku	tsukushi, small leucine rich proteoglycan
1381625_at	2.18	0.037476		
1387190_at	2.2	0.047375	Dgka	diacylglycerol kinase, alpha
1373211_at	2.2	0.029022	Fbxw4; LOC100911855	F-box and WD repeat domain containing 4; F-box/WD repeat-containing protein 4-like
1395599_at	2.2	0.039617		
1384146_at	2.2	0.044745		
1394717_at	2.21	0.048707		
1372524_at	2.23	0.049427	Lpin1	lipin 1
1378015_at	2.24	0.03281	Ccl21	chemokine (C-C motif) ligand 21
1372495_at	2.24	0.043081	Vps9d1	VPS9 domain containing 1
1384125_at	2.25	0.019923	Kmt2e	lysine (K)-specific methyltransferase 2E

1368036_at	2.25	0.026206	Ptprf	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F
1375453_at	2.25	0.042946	Gpatch8	G patch domain containing 8
1375442_at	2.26	0.03725	Mphosph10	M-phase phosphoprotein 10 (U3 small nucleolar ribonucleoprotein)
1371250_at	2.26	0.027204	Pf4	platelet factor 4
1388039_a_at	2.26	0.032782	Gabbr1	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1
1379797_at	2.26	0.038047		
1387154_at	2.27	0.019923	LOC100912228; Npy	pro-neuropeptide Y-like; neuropeptide Y
1384738_at	2.27	0.034559		
1382298_at	2.29	0.031954	Zbtb40	zinc finger and BTB domain containing 40
1381321_at	2.29	0.017091		
1371558_at	2.3	0.037971	Nisch	nischarin
1394728_at	2.31	0.035869		
1379990_at	2.35	0.034593		
1390375_at	2.38	0.045302	Akap8l	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like
1377969_at	2.4	0.033019	LOC100910650	uncharacterized LOC100910650
1377801_at	2.4	0.042839	Slx4	SLX4 structure-specific endonuclease subunit
1389137_at	2.4	0.046421		
1383517_at	2.41	0.03725		
1395819_at	2.41	0.042442		
1376313_at	2.43	0.027466	Tpcn2	two pore segment channel 2
1379200_at	2.44	0.03281	Dzip3	DAZ interacting zinc finger protein 3
1389436_at	2.45	0.027204	Mss51	MSS51 mitochondrial translational activator
1378361_at	2.46	0.014203	Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7
1374531_at	2.49	0.027204	Slc6a6	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 6
1379481_at	2.51	0.036208	Pabpn1	poly(A) binding protein, nuclear 1
1375925_at	2.52	0.027204		
1371065_at	2.55	0.042472	LOC688090; RT1-Bb	similar to RT1 class II histocompatibility antigen, B-1 beta chain precursor (RT1.B-beta(1)); RT1 class II, locus Bb
1381129_at	2.55	0.042442	LOC100913004	uncharacterized LOC100913004
1386718_at	2.58	0.031493	Akr1c19	aldo-keto reductase family 1, member C19
1393246_at	2.58	0.041334	Zmynd10	zinc finger, MYND-type containing 10
1387203_at	2.59	0.032901	Gckr	glucokinase (hexokinase 4) regulator
1381555_at	2.59	0.039983		
1378522_at	2.59	0.045048		
1396155_at	2.6	0.027443		
1377377_at	2.62	0.048113		
1373287_at	2.64	0.036943	Atoh8	atonal homolog 8 (Drosophila)
1372727_at	2.64	0.032403		
1395278_at	2.68	0.041505		
1377192_a_at	2.69	0.027466	Clpx	caseinolytic mitochondrial matrix peptidase chaperone subunit
1382504_at	2.7	0.047618	Chd7	chromodomain helicase DNA binding protein 7
1387908_at	2.71	0.034301	Rasd1	RAS, dexamethasone-induced 1
1390263_at	2.74	0.038974	Gnas	GNAS complex locus

1398394_at	2.77	0.027204		
1398861_at	2.8	0.026461	Nxf1	nuclear RNA export factor 1
1368452_at	2.82	0.027204	Abcc6	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 6
1388924_at	2.84	0.030037	Angptl4	angiopoietin-like 4
1384080_at	2.88	0.042515	Greb1l	growth regulation by estrogen in breast cancer-like
1372699_at	2.91	0.047069	Zfp775	zinc finger protein 775
1389957_at	2.92	0.019923	Ttc3	tetratricopeptide repeat domain 3
1377588_at	2.92	0.048042		
1395211_s_at	2.94	0.034812	Svil	supervillin
1381175_at	2.94	0.045306	Sltm	SAFB-like, transcription modulator
1374364_at	2.95	0.044438	Fam193b	family with sequence similarity 193, member B
1385713_at	2.96	0.037508	Akap8l	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like
1393759_at	2.99	0.048113		
1397164_at	3.04	0.038313	LOC100912446	uncharacterized LOC100912446
1398566_at	3.08	0.027204		
1371595_at	3.1	0.023497	LOC100912446	uncharacterized LOC100912446
1374159_at	3.11	0.038919	Als2cl	ALS2 C-terminal like
1377014_at	3.27	0.042515	Nim1k	NIM1 serine/threonine protein kinase
1393564_at	3.32	0.047588	Dzip3	DAZ interacting zinc finger protein 3
1380807_at	3.6	0.042342		
1380464_at	3.7	0.021941		
1373718_at	4.03	0.019923	Tubb2a	tubulin, beta 2A class IIa
1397722_at	4.14	0.027204		
1381732_at	4.51	0.036419		
1393852_at	5.5	0.049174	Vps37b	vacuolar protein sorting 37 homolog B (S. cerevisiae)
1383439_at	6.26	0.044906	Npas2	neuronal PAS domain protein 2
1368692_a_at	7.64	0.025426	Chka	choline kinase alpha
1377516_at	9.11	0.029917		

Anexo VII: Protocolo LC-MS/MS

Plataforma de Proteòmica, Parc Científic de Barcelona

Protein ID results (LC-MSMS)

Procedure

1. Automatic in-gel digestion

In-gel tryptic digestion was performed in the automatic protein digestion system InvestigatorTM Progest (Genomic Solution). Briefly, the SDS-band gels were washed with ammonium bicarbonate (25mM NH₄HCO₃) and acetonitrile (ACN). Immediately, the sample was reduced (DTT 10mM; 30 min, 56°C) and alkylated (iodoacetamide 55mM; 21°C, 30 min, in the dark). Afterwards, the sample was digested with porcine trypsin (Sequence grade modified Trypsin, Promega; 80ng trypsin/sample; 37°C overnight 16h). Finally, the resulting peptide mixture was extracted from gel matrix with 10% formic acid (FA) and ACN, and dried-down.

2. LC-MSMS analysis

The dried-down peptide mixture was analyzed in a nanoAcquity liquid chromatographer (Waters) coupled to a LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) mass spectrometer. Tryptic peptides were resuspended in 1% formic acid solution and an aliquot was injected for their chromatographic separation. Peptides were trapped on a Symmetry C18TM trap column (5µm 180µm x 20mm; Waters), and were separated using a C18 reverse phase capillary column (75 µm Oi, 25 cm, nanoAcquity, 1.7µm BEH column; Waters). The gradient used for the elution of the peptides was 0 to 40 % B in 20 minutes, followed by gradient from 40% to 60% in 5 min (A: 0.1% FA; B: 100% ACN, 0.1%FA), with a 250 nL/min flow rate.

Eluted peptides were subjected to electrospray ionization in an emitter needle (PicoTipTM, New Objective) with an applied voltage of 2000V. Peptide masses (m/z 300-1700) were analyzed in data dependent mode where a full Scan MS in the Orbitrap with a resolution of 60,000 FWHM at 400m/z. Up to the 10th most abundant peptides (minimum intensity of 500 counts) from each MS scan were selected and then fragmented using CID (collision induced dissociation) in a linear ion trap (LTQ) using helium as collision gas, with 38% normalized collision energy. Generated raw data were collected with Thermo Xcalibur (v.2.2).

3. Database search

The software Thermo Proteome Discover (v.1.4.1.14) was used to perform a search by the Sequest HT search engine against Uniprot green plants (v.january2015) or Swiss-Prot database (v.March2015). Both target and a decoy database were searched to obtain a false discovery rate (FDR), and thus estimate the number of incorrect peptide-spectrum matches that exceed a given threshold.

The following search parameters were applied:

Database/Taxonomy:	Uniprot Viridiplantae (v.january2015) or SwissProt (v.March2015)
Enzyme:	trypsin
Missed cleavage:	2
Fixed modifications:	carbamidomethyl of cystein
Variable modificacions:	oxidation of methionine
Peptide tolerance:	10 ppm and 0.6 Da (respectively for MS and MS/MS spectra)
Percolator Target FDR (Strict):	0.01; Validation based on: q-Value

To improve the sensitivity of the database search, Percolator (semi-supervised learning machine) was used in order to discriminate correct from incorrect peptide spectrum matches. Percolator assigns a q-value to each spectrum, which is defined as the minimal FDR at which the identification is deemed correct. These q values are estimated using the distribution of scores from decoy database search.

4. ID results

Attached as Excel files, please find the results as lists of proteins. The results have been filtered, so only proteins identified with at least 2 high confidence peptides (FDR ≤ 0.01) are included in the list.

Anexo VIII: Opciones de análisis de Cufflinks

TopHat v2.0.9 (Bowtie v2.1.0)

- FASTQ Quality Scale: Illumina v1.5 (PHRED64)
- Anchor length: 8
- Maximum number of mismatches that can appear in the anchor region of spliced alignment: 0
- The minimum intron length: 70
- The maximum intron length: 50000
- Minimum isoform fraction: 0.15
- Maximum number of alignments to be allowed: 20
- Minimum intron length that may be found during split-segment (default) search: 50
- Maximum intron length that may be found during split-segment (default) search: 500000
- Number of mismatches allowed in each segment alignment for reads mapped independently: 2
- Minimum length of read segments: 20
- Bowtie 2 speed and sensitivity: Sensitive (slower)

Cufflinks v 2.1.1

- Number of importance samples generated for each locus during abundance estimation: 1000
- Number of iterations allowed during MLE of abundances: 5000
- Assembly options:
- Prefix for transcripts in reported GTF: CUFF
- Minimum isoform fraction: 0.1
- Pre-mRNA fraction: 0.15
- Maximum intron length: 300000
- Alpha value for the binomial test used during false positive spliced alignment filtration: 0.001
- Small anchor fraction: 0.09
- Minimum fragments per transfrag: 10
- The number of bp allowed to enter the intron of a transcript when determining if a read or another transcript is mappable with it: 8
- Maximum genomic length allowed for a given bundle: 3500000
- Minimum intron length: 50
- Minimum average coverage required to attempt 3' trimming: 10
- The fraction of average coverage below which to trim the 3' end of an assembled transcript: 0.1

Cuffmerge v2.1.1

- Discard isoforms with abundance below this (0-1): 0.1

Cuffdiff v2.1.1

- Minimum per-locus counts for significant testing: 10
- Library size estimation for normalization: Normalize by hits to known transcripts
- False Discovery Rate: 0.05

Anexo IX: Programa Redfin 2D gel image analysis

Information about the image analysis

The images in this experiment were analyzed using the Ludesi Redfin Solo protocol. In this approach, spot detection and image segmentation takes place in a composite image and the same spot positions and borders are then applied in all images, after compensation for geometric distortions. The advantages of this protocol is its simplicity and that every detected protein spot will be assigned a volume in each image. A disadvantage is that some spots may be assigned misshaped/misaligned borders, leading to an incorrectly measured spot volume. The results may later be quality controlled by inspection in the individual images and errors can be manually corrected.

Image registration and alignment

The first step is to register corresponding points in the gel images, based on features or patterns that can be seen in the image. Using this information, the images can be aligned and geometrically transformed (warped) so that corresponding protein spots appear at the same position in the warped images. The spots should overlap when the warped images are stacked on top of each other. Ludesi Redfin Solo uses a semi-automatic approach, where a human indicates corresponding points in the images, which may then be improved by computer algorithms. One gel is selected as the reference gel, and all other gels are aligned/warped to it.

Composite image

A composite image (consensus image or fusion image) is created by merging all the gel images into a single representative image. This image will then contain all the spots from the individual gels. In order to avoid artifacts, such as cracks or large stains, from being included in the composite image it is possible to choose to exclude some images, or image regions, when creating the fusion image.

Spot detection

Spot detection involves using algorithms to detect all real protein spots in the images, while avoiding falsely detecting anything in the images that does not represent a true spot. The sensitivity of the spot detection algorithm is adjusted to work well with the specific images. The detected spot positions should be checked for both falsely detected spots and undetected spots.

Segmentation

In the image segmentation step, it is determined what region in the images contains each protein spot. The region outline (spot border) should encompass all of the stained area belonging to the spot and nothing from nearby spots. In the Redfin Solo protocol, spot borders are determined in the composite image and are then applied, after warping, to all the individual images. After this, verification and adjustment of spot positions and borders can be done in each individual image.

Quantification

Quantification is the process of measuring the cumulative staining intensity contained within a spot which in turn corresponds to the relative protein volume. This involves calculating the local background level around a spot, and subtracting this background level from the staining level contained within the spot as defined by the spot border. The result is a calculation of the total, background corrected, staining level of the spot.

Normalization

Normalization is the process of making these spot volumes comparable between gel images in the face of technical differences in staining, scanning, sample volume, and so on.

Ludesi uses a method of normalization that works with gel pairs. The algorithm computes a normalization factor for each gel and uses it to normalize the spot volumes in that gel:

- For each gel pair that has been matched, all matches between the two gels are extracted. The top 50% matches, based on the spot volumes, are kept.
- A spot volume ratio is calculated between each kept spot pair match. A pair-wise normalization factor between the gels is computed by taking the median of these ratios. This ensures robustness and accuracy even if the project contains up to 50% regulated spot volumes.
- Each gel normalization factor is computed by optimizing an over-determined equation system, resulting from the pair-wise normalization factors.
- Finally, the spot volumes in each gel are multiplied with the corresponding gel normalization factor.

